

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Christophera Kobierzyckiego

Kraków, dnia 11 grudnia 2014

Recenzowana praca doktorska nosi tytuł „Zastosowanie techniki mikromacierzy tkankowych w poszukiwaniu nowych markerów w rakach gruczołu piersiowego”. Zasadniczą część rozprawy jest cyklem trzech prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. Została opatrzona wstępem, określeniem celu pracy, streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz podsumowaniem i wnioskami. Całość tekstu liczy 36 stron.

Wstęp zaczyna się omówieniem zagadnień epidemiologicznych, które stanowią pewne uzasadnienie tematu podjętych badań. Przetawiono poprawnie dane epidemiologiczne, chociaż zabrakło jednoznacznego stwierdzenia, iż rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet, a tylko ‘jednym z najczęściej rozpoznawanych nowotworów złośliwych’. Następnie zostały scharakteryzowane białka MCM-2 i SATB1; jest to jedynie krótkie wprowadzenie do tego zagadnienia. Najdłuższą część wstępu stanowi omówienie techniki mikromacierzy tkankowych TMA. Omówienie to jest dość skrótowe i niekoniecznie jest jasne dla osoby niezapoznanej z taką techniką. Doktorant jest niewątpliwie entuzjastą metody TMA, co jest widoczne w emocjonalnym tonie wstępu, w którym zabrakło pewnego wyważenia – obok zalet mikromacierzy tkankowych, powinien wymienić także ich wady. Nie można uznać za poprawne językowo stosowania – we wstępie i w innych miejscach – slangowego określenia ‘histiospoty’. Mimo tych zastrzeżeń wstęp przedstawia zagadnienia stosowania TMA poprawnie pod względem merytorycznym. Cytowanych jest 11 pozycji bibliograficznych, z których część to artykuły starsze; są to pozycje klasyczne dotyczące mikromacierzy, natomiast 5 cytowanych artykułów zostało opublikowanych w ostatnich 10 latach.

Celem pracy doktorskiej miały być analiza ekspresji wybranych markerów immunohistochemicznych, szczególnie niestosowanych rutynowo MCM-2 i SATB1 w raku piersi przy wykorzystaniu mikromacierzy tkankowych i porównanie z innymi markerami immunohistochemicznymi oraz cechami histopatologicznymi nowotworów.

Praca „Zastosowanie techniki mikromacierzy tkankowych (TMA) w badaniach nad markerami nowotworowymi w rakach gruczołu piersiowego” została opublikowana w piśmie *Postępy Biologii Komórki*. Czasopismo to ukazuje się w języku polskim, jednak znajduje się na Liście Filadelfijskiej, w ogólnodostępnych bazach danych można znaleźć angielskie streszczenia, a jego impact factor wynosi 0,126. Doktorant jest pierwszym autorem tej publikacji; ma ona charakter pracy pogłądowej; praca zaczyna się omówieniem historii metody mikromacierzy tkankowych oraz opisaniem podstaw tej techniki. Podobnie jak we wstępie, pojawia się niezbyt szczęśliwe, slangowe określenie ‘histiospoty’. Także nie do końca wypada się zgodzić z podanym przez autora zakresem średnic cylindrów tkankowych (0,6-3mm); wprawdzie taki zakres jest najczęściej spotykany (także przez piszącego te słowa), jednak są komercyjnie

dostępne urządzenia spoza tego zakresu (np. 4mm). Niezbyt szczęśliwe jest określenie, iż 'bloczek TMA przechodzi kolejne, typowe etapy preparatyki histologicznej' – autor, doskonale znając zagadnienie ze swej praktyki badawczej opisał w ten sposób – można się domyślać - sporządzenie skrawków, umieszczenie na szkiełkach, zabarwienie itd., podczas gdy czytelnik pozbawiony należytej wiedzy może sądzić, iż materiał należy odwodnić, przepoić ksylenem, zatopić w parafinie itp. Także, wobec niewielkiej popularności techniki mikromacierzy tkankowych w naszym kraju szkoda, że nie uzupełniono tekstu materiałem ilustracyjnym, który umożliwiłby łatwiejsze zrozumienie i zwiększał walor edukacyjny pracy. Mimo tych niewielkich uchybień doktorant rzetelnie przedstawił technikę TMA. Następna część pracy jest poświęcona wybranym markerom stosowanym w raku piersi. Wspomniano tutaj pokrótce wszystkie markery w pełni standardowe (receptory estrogenowy, progesteronowy, HER2, Ki-67, kadheryny), markery powszechni znane, ale nie używane rutynowo w raku piersi (p53, cykliny D1 i E, CD31, CD34, VEGF). Nieco więcej miejsca poświęcono rodzinie białek MCM, które stanowią temat badań własnych autora, mitozynie oraz telomerazie. Szkoda, że omówienie badanych markerów jest – zapewne z powodu braku miejsca – skrótowe. W kolejnej części pracy autorzy wracają do zastosowań mikromacierzy tkankowych i do ich użycia w badaniu markerów nowotworów. Nie jest dla mnie jasne, czemu oba rozdziały dotyczące kwestii technicznych zostały wyodrębnione, a pomiędzy nimi omówiono markery badane w raku piersi; odmienna kolejność części zwiększyłaby czytelność pracy. W odróżnieniu od części pierwszej omówiono zastosowanie mikromacierzy i niektóre wady tej metody. Autorzy nie wspomnieli o typowym problemie jakim jest utrata części materiału z wykonanych preparatów, co jest, moim zdaniem, głównym argumentem przemawiającym za użyciem kilku cylindrów tkankowych dla każdego przypadku, natomiast na podstawie danych z literatury dokładnie omówiono kwestie wiarygodności otrzymywanych wyników. Dla niniejszej pracy, a także dla całej rozprawy doktorskiej kluczowa jest część następna, traktująca o zastosowaniu mikromacierzy tkankowych w badaniu proliferacji w raku piersi. Omówiono tutaj kilka publikacji wykorzystujących mikromacierze tkankowe do badań immunohistochemicznych i hybrydyzacji *in situ* w raku piersi. Jedną z cytowanych prac jest „*Tissue Microarray Technique in Evaluation of Proliferative Activity in Invasive Ductal Breast Cancer*”, następna z pozycji tworzących serię publikacji w recenzowanej rozprawie doktorskiej. Jedyne zamieszczone ilustracje pochodzą właśnie z niej. W ostatnim podrozdziale autorzy ponownie zajęli się kwestiami technicznymi – zastosowaniem mikromacierzy w połączeniu z FISH. Nieco zaskakujące jest, iż po stwierdzeniu, że taka technika jest problematyczna, cytowane są prace sugerujące wysoką wiarygodność hybrydyzacji w połączeniu z TMA. Tekst cytuje 55 pozycji bibliografii, w tym zarówno prace klasyczne, jak aktualne piśmiennictwo; 44 prace powstały mniej niż 10 lat, a 29 mniej niż 5 lat przed napisaniem tekstu. Podsumowując oceniana praca jest wartościowa, chociaż niezbyt uporządkowana i skrótowa. Dłuższe omówienie tematu byłoby znacznie bardziej ciekawe i pouczające, chociaż nie mogłoby się ukazać jako typowy artykuł w czasopiśmie.

Praca „*Tissue Microarray Technique in Evaluation of Proliferative Activity in Invasive Ductal Breast Cancer*” ukazała się w renomowanym międzynarodowym piśmie *Anticancer Research*. Pismo to posiada impact factor 1,879. Wg bazy Web of Science praca była 2-krotnie cytowana przez innych autorów. Doktorant jest jej pierwszym autorem. We wstępie omówiono technikę mikromacierzy tkankowych oraz znaczenie ekspresji Ki-67 i MCM-2 w raku piersi. Celem pracy była analiza i porównanie ekspresji odczynów w kierunku Ki-67 i MCM-2 wykonanych metodą klasyczną i z użyciem mikromacierzy tkankowych. Badany materiał jest stosunkowo niewielki (51 przypadków), lecz wystarczył do uzyskania istotnych statystycznie wyników. Opis stosowanych metod jest dokładny i nie budzi zastrzeżeń. Można jedynie zauważyć, iż pochodzenie materiału określono w pracy jako ‘mammectomy’; jest to określenie poprawne, chociaż nie w pełni jasne, a częściej używa się terminu ‘mastectomy’. Także, w ‘metodach’ opisano ocenę zarówno liczebności dodatnich komórek, jak siły odczynu, podczas gdy w wynikach przedstawiono po prostu ekspresję odczynów jako odsetek dodatnich komórek; oczywiście jest to parametr istotniejszy niż siła odczynu. Autorzy pracy wykazali bardzo znaczne podobieństwo pomiędzy wynikami uzyskanymi za pomocą klasycznych, dużych preparatów histologicznych i mikromacierzy. Wykazali także silną korelację pomiędzy wynikami odczynów w kierunku Ki-67 jak MCM-2, oraz pomiędzy tymi odczynami, a stopniem zróżnicowania nowotworu. W dyskusji omówiono zastosowanie mikromacierzy tkankowych w badaniach naukowych; znaczenie uzyskanych wyników własnych; oraz problemy pojawiające się przy stosowaniu mikromacierzy. Cytowano tutaj pracę Kyndi i wsp. która dotyczyła badania receptorów hormonalnych i HER2 w raku piersi i w której stwierdzono wysoką zgodność pomiędzy pełnymi preparatami tkankowymi i mikromacierzami. Autorzy odnieśli się także do takich kwestii technicznych jak zastosowanie techniki analizy obrazu czy użycie cylindrów tkankowych różnej średnicy. W pracy cytowano 37 pozycji bibliograficznych; 19 prac zostało opublikowanych w ciągu 10, a 11 w ciągu 5 lat przed publikacją artykułu. Cytowane prace ukazały się w renomowanych czasopismach, bibliografia została właściwie dobrana i przygotowana. Otrzymane wyniki są wartościowe i ciekawe, a praca „*Tissue Microarray Technique in Evaluation of Proliferative Activity in Invasive Ductal Breast Cancer*” może z powodzeniem stanowić część osiągnięcia naukowego będącego podstawą przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

Praca „*Expression of SATB1 protein in the ductal breast carcinoma tissue microarrays — preliminary study*” została opublikowana w piśmie *Folia Histochemica et Cytobiologica*. Tutaj także doktorant jest pierwszym autorem. Jest to ważne polskie czasopismo z zakresu histologii i histopatologii, jego impact factor wynosi 1.08. Badanie zostało przeprowadzone na 48 przypadkach; jest to stosunkowo niewielka liczba jak na pracę przeprowadzoną z użyciem mikromacierzy tkankowych, jednak jak zaznaczono w pracy, ma ona charakter badania wstępnego, a uzyskano statystycznie istotne wyniki. Podobnie jak w pracy poprzedniej, pochodzenie materiału określono w pracy jako ‘mammectomy’; jest to określenie poprawne, chociaż częściej używa się ‘mastectomy’; nieco brakuje wyjaśnienia, czy chodzi o zabiegi radykalne, resekcję częściową czy biopsję mammotoniczną, jednak ze względu na to, że analizowane są niemal wyłącznie cechy immunohistochemiczne,

niedopowiedzenie nie wpływa na interpretację wyników. Autor powołuje się na klasyfikację WHO z roku 2003, podczas gdy w chwili gdy praca powstawała, dostępna była nowa wersja systemu WHO (2012), do niej właśnie należałoby się odwołać; termin *'invasive ductal breast cancer'* pozostaje wprawdzie w praktycznym użyciu, jednak w ambitnych publikacjach naukowych powinien zostać zastąpiony nowszym sformułowaniem (*'invasive carcinoma of no special type'*). W pracy używany jest termin *'histologic grade of malignancy'*, będący kalką używanego w niektórych polskich ośrodkach określenia 'stopień histologicznej złośliwości'; moim zdaniem bardziej właściwe i jaśniejsze jest zwykłe *'histologic grade'*. Do wyboru obszaru mającego posłużyć do stworzenia mikromacierzy miano użyć preparatów H+E grubości 7µm; sądzę, że jest to zwykły błąd pisarski i chodzi o 4µm. Nie podoba mi się tłumaczenie nazwy jednej z afiliacji ('Lower Silesian Oncology Center'), jednak nie zależy to od doktoranta, a od polityki Centrum Onkologii oraz wydawcy czasopisma. Na marginesie można dodać, że niekiedy zdarzają się jeszcze bardziej dziwaczne sformułowania, jak dosłowne tłumaczenie polskiej nazwy regionu. Celem analizowanej publikacji była ocena relacji pomiędzy ekspresją SATB1 z innymi markerami oraz innymi cechami raka piersi. Owe inne przebadane markery to receptory estrogenowy, progesteronowy oraz marker Ki-67. Do kompletu standardowych markerów raka piersi brakuje jedynie HER2; wobec niezbyt wielkiej próby badanej wyniki mogłyby być niezbyt ciekawe, ale mam nadzieję, że jego ocena i porównanie z SATB1 jest planowana w przyszłych badaniach na pełną skalę. Metody zastosowane do wykonania odczynów i ich oceny nie budzą zastrzeżeń; można jedynie zwrócić uwagę, iż zastosowanie poziomu odcięcia 10% dla dodatnich wyników odczynów w kierunku receptorów estrogenowego i progesteronowego nie odpowiada w pełni progom zalecanym do celów klasyfikacji molekularnej (1% ER, 20% PR); z drugiej strony ciekawsze mogłoby się okazać użycie dla porównania z ekspresją SATB1 większej liczby kategorii, lub danych w postaci zmiennej ciągłej – co byłoby wykonalne i wiarygodne skoro autorzy dysponowali programem do komputerowej analizy obrazu. Analiza statystyczna została przeprowadzona w sposób poprawny; zastosowano współczynnik korelacji Spearmana, podczas gdy w tekście wyników stosuje się oznaczenie 'r', jak dla współczynnika Pearsona; wprawdzie taka pisownia jest obecnie często spotykana w publikacjach, jednak użycie tradycyjnego oznaczenia 'R' podniosłoby nieco czytelność wyników. Uzyskane dane zostały przedstawione w sposób krótki, jasny i zrozumiały, a otrzymana ocena statystyczna jest wartościowa i wypełnia założone cele pracy. W dyskusji omówiono funkcję SATB1 oraz jego rolę w rozwoju raka piersi; przedstawiono też otrzymane wyniki w kontekście danych dostępnych w innych opublikowanych pracach. Przedstawiono sensowne i wyważone wnioski końcowe chociaż nie uważam, by zostało w pełni wykazane, iż 'ekspresja SATB1 ma duże znaczenie dla rozpoznania i leczenia' [przekład własny recenzenta]. Pracę opatrzone 39 pozycjami bibliografii; cytowane prace są aktualne (33 z ostatnich 10 lat, z tego 27 z ostatnich 5 lat) i dobrze dobrane. Jedyne zastrzeżenie może budzić wspomniana powyżej starsza wersja klasyfikacji WHO. W całości pracę "*Expression of SATB1 protein in the ductal breast carcinoma tissue microarrays — preliminary study*" oceniam wysoko, a zastrzeżenia

nie umniejszają jej wartości; może ona z powodzeniem stanowić część cyklu prac tworzących rozprawę doktorską.

W 'Podsumowaniu i wnioskach' doktorant pokrótce omówił wyniki zawarte w trzech publikacjach; omówienie to poprawnie przedstawia owe wyniki, pewną niezręcznością jest jedynie użycie sformułowania 'stopień złośliwości histologicznej G', mogący sugerować istnienie stopni zróżnicowania nowotworów oznaczanych innymi literami. Cztery przedstawione wnioski dotyczą 1) możliwości zastosowania reakcji w kierunku MCM-2 dla oceny aktywności proliferacyjnej; 2) związku ekspresji SATB1 z agresywnością nowotworu; 3) korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi za pomocą klasycznych preparatów histologicznych i mikromacierzy; oraz 4) możliwości praktycznego zastosowania techniki mikromacierzy. Wnioski w tej postaci zostały sformułowane i przedstawione dostatecznie ostrożnie i znajdują uzasadnienie w uzyskanych wynikach. Można jedynie zauważyć, że wniosek 2) został wywiedziony na podstawie danych pośrednich (związek ekspresji SATB1 ze stopniem zróżnicowania i ekspresją pozostałych markerów) i dla zastosowań klinicznych powinien zostać umotywowanych badaniami na większej grupie pacjentów z uwzględnieniem stanu zaawansowania oraz rzeczywistych wskaźników przeżycia. Można żywić nadzieję, że w tym kierunku będą szły następne publikacje doktoranta.

Podsumowując, pracę doktorską lek. Chistophera Kobierzyckiego oceniam wysoko pod względem merytorycznym; szczególnie dotyczy to obu opracowań wyników własnych autora. Opisane powyżej zastrzeżenia i wątpliwości odnoszą się głównie do sposobów formułowania i przedstawienia wyników, natomiast same uzyskane dane są niewątpliwie wartościowe i oryginalne, a wyniki uzasadniają zastosowanie mikromacierzy tkankowych w badaniu raka piersi. Metoda mikromacierzy tkankowych jest wysoce efektywna w uzyskiwaniu wartościowych wyników w badaniach histopatologicznych, a pozostaje zbyt mało znana i stosowana w naszym kraju. Także rak piersi stanowi temat o ogromnym znaczeniu badawczym oraz potencjalnych zastosowaniach praktycznych.

Mając powyższe na uwadze składam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Chistophera Kobierzyckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Krzysztof Okoń
