

Wrocław, 08.10.2024

dr hab. n. med. Izabela Łaczmńska
Zakład Diagnostyki Molekularnej Nowotworów
e-mail: izabela.laczmanska@dcopih.pl
tel. 71/368 96 72

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Pawła Potockiego
pt. „ *Results of targeted treatment in patients with colon cancer*” („*Wyniki leczenia
celowanego u chorych na raka jelita grubego*”)
promotor: prof. dr hab. n. med. Piotr Wysocki

Choroby nowotworowe są od wielu lat przedmiotem intensywnych badań naukowych, czego efektem jest zrozumienie wielu mechanizmów komórkowych leżących u ich podstaw, a co za tym idzie, odkrycie markerów molekularnych i rozwój terapii celowanych. Ze względu na różnorodność i zmienność nowotworów poznanie ich biologii, genów krytycznych dla ich inicjacji i progresji oraz zmian, którym te geny podlegają, wciąż pozostaje i pozostanie aktualnym tematem badawczym. Co więcej, pojawienie się i rozwój nowych technik molekularnych, takich jak np. sekwencjonowanie następnej generacji (Next Generation Sequencing, NGS) sprawia, że badania te są coraz bardziej powszechne i tańsze, a kolejne odkrycia na tym polu – pożądane, nie tylko ze względów naukowych, ale także społecznych i ekonomicznych.

W Polsce nowotwory są drugą co do częstości przyczyną zgonów. Rak jelita grubego (RJG) jest trzecim co do częstości nowotworem złośliwym u mężczyzn, a drugim co do częstości u kobiet w Polsce. Pojawia się zwykle po 50 roku życia i nie daje na początku objawów niepokojących pacjenta. Za czynniki ryzyka w przypadku tego nowotworu uważa się m.in.: wiek, predyspozycje dziedziczne, otyłość, stosowanie używek, złą dietę i brak aktywności fizycznej. Niechęć społeczna do kolonoskopii (mimo, że od 2000 roku jest ona

bezpłatna od 40 przy obciążeniu rodzinnym, lub 50 roku życia i nie wymaga skierowania) skutecznie obniża odsetek RJG wykrywanych na wczesnych etapach rozwoju.

Diagnostyka molekularna u pacjentów z RJG wykonywana z użyciem komórek nowotworowych (najczęściej tkanka utrwalona w formalinie, zatopiona w parafinie, ang. formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) skupia się obecnie na ocenie statusu molekularnego genów *RAS*, ocenie rearanzacji genów *NTRK1/2/3* (terapia agnostyczna) oraz ocenie niestabilności mikrosatelitarnej (ang. microsatellite instability, MSI).

Rozwój terapii celowanych i optymalizacja algorytmów leczenia chorób nowotworowych są niezwykle istotnym tematem badań klinicznych. Dokładne poznanie zależności pomiędzy profilem molekularnym tkanki nowotworowej a takimi cechami klinicznymi jak lokalizacja guza, jego zdolność do przerzutowania, odpowiedzią na zastosowane leczenie i innymi może się przyczynić do wypracowania skuteczniejszych schematów terapeutycznych. Podjęcie tego tematu przez doktoranta jest w świetle powyższych informacji wysoce uzasadnione.

Całość rozprawy doktorskiej została opatrzona autoreferatem wprowadzającym w temat podjęty przez Doktoranta. Podzielony jest on na klasyczne sekcje: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Piśmiennictwo.

Doktorant zacytował łącznie 92 pozycje literaturowe, z których 43,5% zostało opublikowanych w ostatnich 5 latach.

Rozprawę doktorską stanowią 2 oryginalne prace oryginalne opublikowane w międzynarodowych czasopismach z Listy Filadelfijskiej o łącznym współczynniku oddziaływania **IF (2023) 9,4** (280 pkt. MNiSW). W obu artykułach Doktorant jest pierwszym a zarazem korespondencyjnym autorem. W obu pracach Doktorant miał istotny udział w zaplanowaniu pomysłu i koncepcji badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. Praca nr 1, opublikowana w maju 2023 była cytowana 5 razy, a praca nr 2 opublikowana we wrześniu 2023 roku była cytowana 1 raz.

Cel projektu

Doktorant podjął się w grupie pacjentów z RJG określenia zależności pomiędzy cechami klinicznymi, patologicznymi i molekularnymi ze szczególnym naciskiem na takie cechy jak lokalizacja guza pierwotnego w poszczególnych odcinkach jelita grubego, profil molekularny tkanki nowotworowej i odpowiedź na leczenie celowane.

Material

W pracy nr 1 (Potocki PM, Wójcik P, Chmura L, et al. **Clinical Characterization of Targetable Mutations (BRAF V600E and KRAS G12C) in Advanced Colorectal Cancer-A Nation-Wide Study**. Int J Mol Sci. 2023 May 22;24(10):9073. PMID: 37240418) materiałem do badań patologicznych i molekularnych były tkanki FFPE uzyskane od pacjentów z RJG w 107 różnych ośrodkach. W pracy nr 2 (Potocki PM, Wiśniowski R, Haus D, et al. **The Impact of Sidedness on the Efficacy of Anti-EGFR-Based First-Line Chemotherapy in Advanced Colorectal Cancer Patients in Real-Life Setting-A Nation-Wide Retrospective Analysis (RACER)**. Cancers (Basel). 2023 Sep 1;15(17):4361. PMID: 37686636) również użyto tkanek FFPE tym razem uzyskanych z 16 ośrodków onkologicznych. Łączna liczba przebadanych molekularnie próbek wynosiła 7798, co jest imponującą liczbą.

Wszyscy pacjenci podpisali formularz świadomej zgody, a badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (decyzja nr 1072.61202.41.2022).

Dane zgromadzone i analizowane przez doktoranta obejmowały: dane demograficzne, kliniczne (w tym zastosowane leczenie), patologiczne (rozpoznanie patologiczne) i molekularne (ocenę wariantów istotnych klinicznie w genach *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* oraz ocenę MSI). Badania molekularne były wykonane w jednym laboratorium, uczestniczącym co roku w zewnętrznlaboratoryjnych programach kontroli jakości w renomowanych europejskich organizacjach, co znacząco podnosi wartość uzyskanych wyników.

Metody

Doktorant podczas prowadzonych badań dokonał retrospektywnej analizy danych: demograficznych, klinicznych, patologicznych i molekularnych.

Analizie poddano dane uzyskane łącznie dla 7798 pacjentów z których ostatecznie włączono do badania 7604 pacjentów diagnozowanych w latach 2017-2019. Należy podkreślić niezwykle wysoką liczebność grupy badanej, która stanowiła około 29% ogółu populacji chorych na RJG w tym czasie w Polsce. Analiza wariantów istotnych klinicznie (mutacji) w genie *KRAS* (ekson 2, 3, 4), *NRAS* (ekson 2, 3, 4) i *BRAF* (ekson 15) została wykonana z użyciem sekwencjonowania Sangera.

Wyniki

W pracy nr 1 Doktorant i wsp. wykazali, że istnieje szereg korelacji pomiędzy danymi demograficznymi i klinicznymi a prawdopodobieństwem występowania wariantu o istotnym znaczeniu klinicznym w genie *BRAF* NM_004333.6:c.1799T>A (p.Val600Glu) (starsza nazwa V600E). Dodatnią korelację wykazano między innymi dla płci żeńskiej, kilku typów histologicznych, stopnia złośliwości G3 i G3-4, prawostronnej lokalizacji guza i innych. Ponadto wykazano zależności pomiędzy lokalizacją guza a występowaniem wariantu o istotnym znaczeniu klinicznym w genie *KRAS* NM_004985.5:c.34G>T (p.Gly12Cys) (starsza nazwa G12C).

W pracy nr 2 Doktorant i wsp. wykazali, że lokalizacja guza pierwotnego w poszczególnych odcinkach jelita grubego jest skorelowana z wrażliwością na leczenie pierwszej linii oraz profilem molekularnym tkanki nowotworowej. Analiza ta obejmuje dane uzyskane od 842 pacjentów z 16 ośrodków onkologicznych, co jest imponującą liczbą w tego rodzaju analizie w Polsce.

Wnioski

Podjęty przez Doktoranta temat badawczy ma charakter poznawczy i może mieć implikacje kliniczne. Doktorant wykazał się szeroką wiedzę teoretyczną i kliniczną, czego niezaprzeczalnym dowodem jest opublikowanie rezultatów badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej w czasopiśmie o łącznym współczynniku oddziaływania IF 9,4 (280 pkt. MNiSW).

Wątpliwości i sugestie

1. Cel pracy [str. 39-40] służy określeniu hipotezy badawczej, natomiast w przedstawionym manuskrypcie zawiera on również krótkie omówienie obu publikacji Doktoranta, które jest w tej sekcji niepotrzebne i utrudnia zrozumienie celowości podjętych badań.
2. Zastosowano niewłaściwy zapis wariantów. Obecnie obowiązujący jest zapis wg. Human Genome Variation Society (HGVS).
3. Nazwy genów powinny być pisane kursywą.
4. W świetle prowadzonych na świecie badań klinicznych z zastosowaniem inhibitorów pan-KRAS, lub inhibitorów G12D brakuje w przedstawionej rozprawie analizy rodzaju wykrytych wariantów genu *KRAS* w odniesieniu do zgromadzonych danych klinicznych. Czy Doktorant, dysponując imponującą liczbą wyników badań genetycznych w tym zakresie, planuje taką publikację? Brakuje także danych uzyskanych dla genu *NRAS* (z wyjątkiem podania odsetka próbek z wariantem), które były wykonane (jak pisze Doktorant) dla grupy badanej.
5. Brak jest w przygotowanej rozprawie spisu skrótów, który ułatwiłby czytanie i analizę tekstu.
6. W bardzo wielu miejscach po akapitach brakuje odnośników literaturowych.
7. Właściwe byłoby także odniesienie się do obowiązującej klasyfikacji wariantów wg. AMP: Li MM, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017 Jan;19(1):4-23. PMID: 27993330.
8. Doktorant stosuje w napisanym po polsku autoreferacie skróty angielskich nazw jak CRC (colorectal cancer), gdy właściwe byłyby polskie skróty, np. RJG (rak jelita grubego), lub polskie terminy, jak np. w przypadku zastosowania angielskich skrótów RCC czy LCC. Częste są także „kalki” z języka angielskiego, np. „nadpobudliwe kinazy” [str. 29].

9. Doktorant używa nieprawidłowego (choć niestety dość powszechnego w tekstach popularno-naukowych) terminu „dziedziczne zespoły wielonowotworowe”, czy „dziedziczny rak jelita grubego” podczas gdy są to dziedziczne predyspozycje do nowotworów. Recenzent zwraca na ten błąd szczególną uwagę, ponieważ doktorant jest lekarzem.
10. Wielokrotnie stosowane są skróty myślowe, które negatywnie wpływają na jakość przedstawionej pracy, jak np. „Podczas gdy błonnik ze zbóż był związany z ochroną przed CRC, błonnik na bazie owoców, warzyw i roślin strączkowych już nie” [Wstęp, str. 19]. Na korzyść Doktoranta przemawia fakt, że w opublikowanych artykułach naukowych z zakresu doktoratu uniknięto takich sformułowań.
11. Również termin „terapia anty-EGFR” to skrót myślowy, który nie powinien być stosowany w tekście naukowym. Sugeruję w przyszłości użycie terminu „terapia/leczenie z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych (skierowanych) przeciwko EGFR”.
12. Na stronie 21 błędnie zaliczono gen *MSH3* do grupy genów związanych z zespołem Lyncha.
13. Proszę Doktoranta również o wyjaśnienie, dlaczego badania molekularne wariantów w genach *KRAS*, *NRAS* i *BRAF*, były prowadzone metodą sekwencjonowania Sangera, gdzie z definicji metoda ta ma niższą czułość niż np. qPCR, czy NGS.
14. Moim zdaniem wykazanie korelacji pomiędzy pobraniem materiału z przerzutu do ośrodkowego układu nerwowego a zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia wariantu genu *KRAS* ze względu na małą liczbę próbek (n=5) wydaje się być zbyt daleko posuniętym wnioskiem.

Wymienione powyżej liczne błędy redakcyjne i nieliczne zastrzeżenia wpływają wprawdzie negatywnie na odbiór przedstawionego manuskryptu, nie umniejszają jednak w żadnym stopniu dokonań Doktoranta.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Pawła Potockiego ma charakter poznawczy i może mieć istotne implikacje kliniczne. Zakres przedstawionych badań spełnia

wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Autor wykazał szeroką wiedzę teoretyczną i kliniczną oraz skuteczne (co jest w mojej opinii godne podziwu) współdziałanie w zakresie gromadzenia danych z wieloma klinicystami i naukowcami z renomowanych ośrodków klinicznych i/lub naukowych w Polsce. W mojej opinii doktorant udowodnił także, że posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską lek. Pawła Potockiego, która w mojej ocenie **spełnia warunki** określone w artykule 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie lek. Pawła Potockiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. Izabela Łaczmajska

KIEROWNIK
Zakładu Diagnostyki Molekularnej Nowotworów

dr hab. n. med. Izabela Łaczmajska