

Ocena pracy doktorskiej

Praca doktorska pani mgr Elżbiety Byliny pt.: *"Analiza czynników kliniczno-patologicznych i molekularnych związanych z nawrotami nowotworów podścieliskowych przewodu pokarmowego (GIST) – ocena wiarygodności różnych systemów klasyfikacji ryzyka"* została wykonana w Centrum Onkologii - Instytucie im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa. Promotorem jest prof. Piotr Rutkowski, Kierownik Kliniki Nowotworów Tkanek Miękkich i Kości.

Trafność podjętej problematyki i jej oryginalność.

Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (GIST) są stosunkowo rzadkie, a ich leczenie uległo istotnej zmianie w dobie terapii celowanych molekularnie. Podstawowym sposobem leczenia GIST jest radykalne leczenie chirurgiczne, niestety u niemal połowy pacjentów dochodzi do nawrotu choroby. W takiej sytuacji zasadne jest pytanie o rolę leczenia uzupełniającego, w tym w leczeniu miejscowo nieresekcyjnych i/lub przerzutowych GIST. Dane literaturowe wskazują na istotną różnicę w ryzyku nawrotu choroby, czasie przeżycia wolnego od choroby i przeżycia całkowitego między grupą leczoną i nie leczoną Imatynibem. Jednak zasady stratyfikacji pacjentów GIST do grup ryzyka i wdrożenia leczenia Imatynibem są nadal w trakcie ustalania.

Jako cel niniejszej pracy wyszczególniono 4 punkty, obejmujące: trzy zagadnienia skupiające się na metodyce badań: 1) analiza czynników rokowniczych (kliniczno-patologicznych i molekularnych) w odniesieniu do nawrotów choroby po leczeniu operacyjnym pierwotnie resekcyjnych GIST (przeżycia wolne od choroby – DFS); 2) analiza przeżyć całkowitych (OS) chorych po leczeniu radykalnym zmiany pierwotnej (i ewentualnie leczeniu inhibitorami kinaz tyrozynowych (IKT) w przypadku nawrotu GIST); 3) Analiza profilu molekularnego GIST oraz ocena wpływu na przeżycie wolne od nawrotu choroby (DSF) oraz na przeżycia całkowite (OS). Podsumowaniem tych analiz wydaje się być punkt 4) Porównanie wiarygodności klinicznej opracowanych dotychczas klasyfikacji oceny ryzyka nawrotu choroby po leczeniu radykalnym, z ewentualną próbą nowej klasyfikacji uwzględniającej genotyp pierwotnego GIST.

Inhibitor kinazy tyrozynowej - Imatynib stosowany jest jako leczenie uzupełniające w GIST u pacjentów o wysokim ryzyku nawrotu. Problemатyczny jest wybór leczenia u pacjentów z ryzykiem pośrednim, a przede wszystkim otwarta pozostaje kwestia kwalifikacji pacjentów do właściwej grupy ryzyka z uwzględnieniem czynników molekularnych, warunkujących oporność/wrażliwość na Imatynib. Zaproponowany temat rozprawy doktorskiej jest bardzo aktualny i stanowi ciągły przedmiot dyskusji w światowej literaturze zagadnienia. Jednocześnie problem jest istotny tak z punktu widzenia poznawczego, jak i możliwej użyteczności klinicznej uzyskanych wyników.

Poprawność formalno-językowa

Praca licząca 80 stron przedstawiona jest w klasycznym układzie rozdziałów i podrozdziałów z uwzględnieniem *Wstępu* (Wprowadzenie), *Celu pracy*, *Materiałów i Metod*, *Wyników*, *Dyskusji*, *Wniosków i Piśmiennictwa* oraz *Streszczenia* w języku polskim i angielskim. Praca zawiera 15 przejrzystych tabel i 35 poglądowych rycin. Układ pracy jest poprawny, a struktura podziału treści – odpowiednia.

Załączony *Wykaz skrótów* ułatwia śledzenie przedstawionych zagadnień. Brak jest tu tłumaczenia skrótu ROC; pojawiła się też niedokładność tłumaczenia skrótu WT - w polskiej terminologii przyjęto się stosować sformułowanie „typ dziki” (nie zaś „dziki typ”).

Praca napisana jest zasadniczo poprawnym językiem, jednak nie jest wolna od uchybień. Niekiedy składnia/logika/gramatyka zdań utrudnia zrozumienie intencji Autorki. Przykłady: Str.9: zdanie „*Oczywiście kwestią do dyskusji pozostaje leczenie uzupełniające imatynibem u chorych na GIST o pośrednim ryzyku nawrotu, która z obecnych klasyfikacji oceny ryzyka nawrotu powinna być używana, jak również czy należy stosować leczenie uzupełniające w GIST o genotypach o małej wrażliwości na imatynib.*” wydaje się być niefortunna zbitką niezależnych zdań. Na str. 38. w opisie Ryciny 14 zdanie "(...) stwierdzono negatywny wpływ OS:(...)" powinno brzmieć "negatywny wpływ na OS: (...)". Szczególnie dolegliwe jest to w rozdziale *Dyskusja*, gdzie jasne precyzowanie stwierdzeń ma kluczowe znaczenie. I tak, na str. 61 rozdzielenie zdania podsumowującego "*Reasumując (...)*" na trzy zdania proste, znacznie ułatwiłoby percepcję. Na str.62 w zdaniu "*Również DiMateo (...) GIST z obecnością mutacji punktowej lub insercji KIT mogą mieć lepszy przebieg kliniczny niż mutacje (powinno być: przypadki z mutacją) w eksonie 9 KIT (...)*" Liczne przykłady wskazują, że dbałość językowa nie jest najmocniejszą stroną doktorantki. Sugerowałabym używanie krótkich, możliwie prostych stwierdzeń w miejsce zawiłych zdań wielokrotnie złożonych. Pomocne byłoby również stosowanie akapitów, dla oddzielenia poszczególnych części *Dyskusji*.

W większości tekstu brak jest zaznaczenia kursywą zwrotów obcojęzycznych, (np. str. 7. „ang. „wild type”). Pojawiają się też błędy literowe (np. str.8 „*kliku badań*” zamiast „kilku badań” , na str. 9 „*index mitotyczny*” zamiast „indeks mitotyczny”, str. 78 "*Chorzy, u których stwierdzono (...) nie powinni otrzymywać **leczenie** uzupełniającego (...)*"), czy też wynikające z niestaranności edytorskiej (na str. 47 „*oraz wielkość zmiany pierwotnej >5*” (brakuje cm.). Pojawiają się też liczne błędy interpunkcyjne (np. na str. 27 „*od sierpnia2013*” – brak spacji).

Ryciny i wykresy są przejrzyste i pomocne w zrozumieniu przedstawianych treści, jednak też nie są wolne od uchybień. Do błędów wpływających z niestaranności zaliczam między innymi: na str. 13. w Tab.3. jako liczbę mitotyczna podano „06.paź” (?), a na str. 32 w Tab. 9 w kolumnie *Przeżycia*

5-letnie znalazła się wartość „20.kwi” (?!). O niedbałości edytorskiej świadczą też niepoprawne opisy niektórych rycin: np. str. 25 Rycina 2: znak „%” nie powinien być używany w tytule, symbol jest nieodłącznie związany z poprzedzającą cyfrą, zaś w tekście należy go zastąpić słowem „odsetek” lub „procent”; na str. 29 Ryc.6 oraz str. 36 Ryc. 11 – niepełny opis osi Y. Należy też zwrócić uwagę, że nazwy genów powinny być konsekwentnie pisane kursywą, do czego autorka nie zawsze się stosuje (np. str. 62, druga linijka: "GIST z obecnością mutacji **KIT**", czy poniżej " w eksonie 9 **KIT**").

W *Dyskusji* i *Wnioskach* niepotrzebnie podawane są wartości p (np. <0,001), nie jest to przyjęte ani konieczne.

Ocena metodologiczna

Stosunkowo zwarty **Wstęp**, napisany został na podstawie adekwatnych źródeł literaturowych i jasno ukazuje podstawy obecnej wiedzy w zakresie pracy. Autorka sprawnie posługuje się źródłami literaturowymi, przytaczając 96 pozycji piśmiennictwa, w tym trzy prace, w których jest współautorką. Cytowane źródła stanowią bardzo dobre odniesienie do omawianej problematyki. Szkoda jednak, że stosunkowo mało jest najświeższych materiałów porównawczych: najnowsze zacytowane źródła literaturowe to dwie prace z 2018 roku, jedna z 2017 – pozostałe są starsze. Przejrzyste ilustracje i tabele są zaletą prezentowanej pracy.

Pewne wątpliwości budzi przedstawienie zagadnienia zaburzeń molekularnych. Być może wynika to z niedoskonałości językowej opisu, jednak podstawowe zależności pomiędzy obecnością/brakiem zaburzeń w obrębie genów *KIT* i *PDGFRA* w GIST zostały opisane nie w pełni adekwatnie. Np. na str. 7 zdanie „Zdecydowana większość GIST charakteryzuje się występowaniem mutacji aktywującej protoonkogenu *KIT* (około 70-80%), **oraz** genu *PDGFRA* (...)” sugeruje równoczesną obecność obu tych mutacji, co nie jest prawdą; powinno być: „Zdecydowana większość GIST charakteryzuje się występowaniem mutacji aktywującej protoonkogenu *KIT* (około 70-80%) **lub** genu *PDGFRA* (...)”. Następnie na str.9 niezręczny opis zaburzenia w 11 eksonie genu *KIT* „ z obecnością delekcji lub **insercji delekcji**” miał zapewne znaczyć „delekcji lub **złożonej delekcji z insercją**”. W dalszym ciągu na str. 16 „obecność dwóch wzajemnie wykluczających się mutacji w genach *KIT* i *PDGFRA*” powinno być opisane jako „obecność wzajemnie wykluczających się mutacji w genach *KIT* i *PDGFRA*”. O ile aktywacja wymienionych tu protoonkogenów w wyniku opisanych mutacji jest bezdyskusyjna, to ich nadmierna ekspresja, wskazana w kolejnym zdaniu – już nie. Zagadnienie to nie zostało w pracy rozwinięte. Ponadto, w opisie miejsc rzadziej zmutowanych w genie *PDGFRA* zabrakło wymienionego eksonu 14.

W rozdziale **II. Materiał i metody** opisano grupę badaną (697 chorych - liczba w pełni wystarczająca) i zakres wykonanych analiz. W opisie metod statystycznych zabrakło informacji, gdzie

(przez kogo?) została wykonana statystyka. Czy obliczeń dokonała Autorka samodzielnie, przy użyciu wymienionych narzędzi statystycznych?

Nie zostało wyjaśnione czemu analizie molekularnej poddano tylko 291 przypadków. Jak rozumiem, autorka korzystała z dostępnych wyników uprzednio wykonanych badań molekularnych, a nie robiła je osobiście (co należałoby zaznaczyć). Stąd zapewne pojawiły się błędy: na str. 21 nastąpiła pomyłka podczas wymieniania eksonów poddanych analizie: powinno być: "*Analizie molekularnej poddano eksony 9, 11, 13 i 17 genu KIT oraz eksony 12, 14 i 18 genu PDGFRA*".

Wykorzystując wyniki wykonanych badań molekularnych (nawet z przed kilku lat) można by rozważyć ich przedstawienie zgodnie z aktualną nomenklaturą HGVS (2019). W miejsce zapisów "*delecja 557-558*" oraz "*D842V*" powinno być: p.(W557_K558del) oraz p.(D842V) podobnie na Ryc. 2 i w dalszej części pracy. Dla jasności wyводу Autorka powinna również zaznaczyć (najlepiej już we *Wstępie*), że delecja p.(W557_K558del) czyli 557-558 dotyczy aminokwasów (tj. kodonów czyli trójek nukleotydów), a nie pojedynczych nukleotydów.

III. Cele pracy. Trzy pierwsze wymienione cele w obecnym brzmieniu stanowią raczej opis zastosowanej metodyki. *Analiza* jest metodą, która ma doprowadzić do oceny badanych zależności. Poprawne sformułowanie celu mogłoby brzmieć np. *1. Ocena zależności nawrotu choroby od kliniczno- patologicznych i molekularnych czynników rokowniczych*. Abstrahując od sformułowania, cele badawcze są poznawczo atrakcyjne, a rozwiązanie postawionych problemów może mieć istotne znaczenie w praktyce klinicznej.

W rozdziale **IV. Wyniki** przedstawiono, rezultaty przeprowadzonych analiz jednoczynnikowych w kontekście przeżycia wolnego od nawrotu choroby (DSF) oraz przeżycia całkowitego (OS) oraz rezultat analiz wieloczynnikowych. Uzyskano interesujące i istotne wyniki. Dla DSF znamienność statystyczną wykazano dla zmiennych: płeć, indeks mitotyczny, wielkość guza pierwotnego, lokalizacja, zakres chirurgii, pęknięcie guza, obecność dwu z mutacji genu *KIT* (str. 29, Tab. 9 oraz Ryciny 7-13). Czynniki mające negatywny wpływ na OS to liczba mitoz, wielkość guza pierwotnego, marginesy chirurgiczne, pęknięcie guza oraz wiek (Str. 38, Tab.10 oraz Ryciny 15-19). Rycina 14 jest błędnie podpisana (omawiana jest wartość OS a nie DSF). Brakuje też ryciny przedstawiającej zależność wiek vs OS.

IV.2. W tym podrozdziale wszystkie tytuły Tabel 11-13 są niepełne: np. w Tab. 11.: *Wyniki analizy wieloczynnikowej (czego? brak przydawki, por. rozbiór logiczny zdania) mających wpływ na DSF*. Nie jest jasne, jakie czynniki zostały włączone do modelu: czy lokalizacja, marginesy chirurgiczne i pęknięcie guza są brane pod uwagę? W analizie jednoczynnikowej (log-rank) uzyskiwały one wartości znamienne, natomiast brak ich w Tab. 13. - opis tabeli jest skąpy, a dyskusja nie wyjaśnia tego punktu. Na str. 62 doktorantka, omawiając czynniki mające wpływ na OS stwierdza, że liczba

mitoz, wielkość guza, pęknięcie guza oraz wiek okazały się być istotne w analizie wieloczynnikowej (niezgodność do wyjaśnienia). Wykazane niejasności mogłyby być rozwiane przy nieco szerszym opisie tabel w rozdziale *Wyniki*. Całkowicie brak jest opisu wpływu analizowanych czynników na OS (Tabele 13 i 14). Natomiast ważnym elementem uzyskanego wyniku jest potwierdzenie, że w modelu uwzględniającym genotyp GIST, czynnikiem negatywnym jest obecność mutacji innej niż *PDGFRA*.

Podrozdziały **IV.3. Porównanie dokładności modeli klasyfikacji oceny ryzyka nawrotu GIST** oraz **IV.4. Nowy model klasyfikacyjny z uwzględnieniem analizy mutacji dla przeżyć wolnych od nawrotu choroby** są mocnymi punktami pracy. Ich omówienie w rozdziale *Wyniki* jest wysoce skondensowane, co jednak uzupełnia dostatecznie odpowiednią część *Dyskusji*. Podsumowanie tej części pracy stanowi Tabela 15, komplementarna do Tab. 7 ze *Wstępu*.

Pierwsza część rozdziału **V. Dyskusja** jest w zasadzie rozszerzeniem wstępu, a dopiero od podrozdziału **V.1.** rozpoczyna się właściwa dyskusja wyników własnych na tle literatury. Autorka umiejętnie konfrontuje wyniki własne z danymi literaturowymi, sprawnie posługując się bogatą faktografią przedmiotu. Poza dyskusją znalazła się - widoczna w analizie wieloczynnikowej DSF - ciekawa kwestia wartości lokalizacji zmiany pierwotnej i mutacji p.(D842V) w eksonie 18 genu *PDGFRA*. W analizie nieuwzględniającej mutacji (Tab. 11) lokalizacja GIST w żołądku zmniejszała prawdopodobieństwo nawrotu o 50% (HR 0,5 vs 1). W analizie uwzględniającej mutację (Tab. 12) ta zależność zanika, pojawia się natomiast wyraźne zmniejszenie ryzyka wznowy o ok. 60% (HR 0,41) u pacjentów z mutacją p.(D842V) w eksonie 18 genu *PDGFRA* wobec obecności mutacji p.(W557_K558del) w genie *KIT* (HR 1). Być może mutacja p.(D842V) lepiej opisuje ryzyko wznowy niż lokalizacja, co może być ważnym wnioskiem z tej pracy (zawarty we Wniosku 3.), a ponadto jest zachętą do dalszych dociekań w tym zakresie.

Najbardziej użyteczną, w mojej opinii, częścią *Dyskusji* są podrozdziały 3. i 4., porównujące stosowane klasyfikacje oceny ryzyka nawrotu GIST i klasyfikację z włączoną do systemu rokowniczego analizą mutacji, u pacjentów po uprzedniej resekcji guza pierwotnego. Autorka potwierdza w niej, że włączenie statusu mutacji do oceny ryzyka może skutecznie uzupełniać kliniczne kryteria stratyfikacji pacjentów do leczenia uzupełniającego z zastosowaniem inhibitorów kinaz tyrozynowych, a także leczenia choroby zaawansowanej i przerzutowej.

VI. Wnioski Doktorantka skupiła się w pracy na uzyskaniu odpowiedzi na konkretne zagadnienia zwerbalizowane w rozdziale Cel pracy, realizując to zadanie odpowiednio.

Nieoczekiwanie w **Streszczeniu**, w sekcji *Wnioski* pojawił się element nieomawiany wcześniej, tj. znaczenie wariantu *wild-type*. W analizie (Tab.12) czynnik ten nie jest istotny statystycznie ($p=0.13$), stad wniosek tu zawarty wydaje się nieuprawniony.

Podsumowanie

Celem pracy była ocena wpływu wybranych czynników na przeżycie wolne od nawrotu choroby (DSF) oraz na przeżycia całkowite (OS) oraz porównanie wiarygodności klinicznej opracowanych dotychczas klasyfikacji oceny ryzyka nawrotu choroby po leczeniu radykalnym, a także próba nowej klasyfikacji uwzględniającej genotyp pierwotnego GIST.

Materiał do badań był wystarczający, przy czym należy docenić fakt zgromadzenia obfitych danych wyjściowych do analizy. Opis tabel w tekście jest niezwykle lakoniczny, co w pewnej mierze rekompensują fragmenty rozdziału *Dyskusja*, gdzie omawiane są najistotniejsze z uzyskanych danych. Wydaje się, że niektóre z wyników zasługują na szerszą i bardziej szczegółową analizę, co prawdopodobnie jest zamiarem Autorki w przyszłości. Doktorantka skupiła się w pracy na uzyskaniu odpowiedzi na konkretne zagadnienia, zwerbalizowane w rozdziale **Cel pracy**, realizując to zadanie.

Doktorantka w przyszłości powinna zwrócić szczególną uwagę na kompatybilność opisu uzyskanych wyników z zakresem dyskusji i sformułowanych wniosków ze streszczeniem, które powinny być zbieżne.

Reasumując: przedstawiona praca podejmuje ciekawy i ważki temat. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki dostarczyły interesujących danych, pozwalających na sformułowanie konkluzywnych wniosków. Przedstawione przeze mnie szczegółowe uwagi miały głównie na celu poprawienie jakości prezentowania uzyskanych wyników, tak aby ułatwić przygotowanie publikacji opartej na niniejszej rozprawie. Uzyskane wyniki w pełni na to zasługują i ich publikacja może stać się ważnym przyczynkiem w dyskusji dotyczącej skutecznego wykorzystania oceny czynników molekularnych w praktyce klinicznej dla GIST.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu oceny pracy pani mgr Elżbiety Byliny pt.: *"Analiza czynników kliniczno-patologicznych i molekularnych związanych z nawrotami nowotworów podścieliskowych przewodu pokarmowego (GIST) – ocena wiarygodności różnych systemów klasyfikacji ryzyka"* stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 poz. 1789, z późn. zm.) w zw. Z ustawą z dn 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 ze zm).

dr hab. n. med. Barbara Pieńkowska-Grela, prof.inst.

PROFESOR INSTYTUTU, KOORDYNATOR
Samodzielnej Pracowni Cytogenetyki
CENTRUM ONKOLOGII-INSTYTUTU
im. Marii Skłodowskiej-Curie
w Warszawie
dr hab. n. med. Barbara Pieńkowska-Grela

Warszawa, 10 stycznia 2020