

Dr hab. Monika Frączek, prof. IGC PAN
Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Kingi Linowieckiej

pt.: „Badanie ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w procesy aktywnej demetylacji DNA w raku piersi”, wykonanej w Katedrze Biochemii Klinicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr. hab. Marka Foksińskiego

Rak gruczołu piersiowego jest najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym u kobiet. W Polsce stanowi drugą pod względem częstości przyczynę zgonów z powodów onkologicznych. Wysoka heterogenność tego nowotworu i wciąż utrzymująca się tendencja wzrostowa współczynnika zachorowalności na raka piersi skłania do poszukiwań nowych schematów diagnostyczno-terapeutycznych. Jednym z ważnych i interesujących aspektów molekularnego podłoża złożonej biologii raka piersi są mechanizmy związane z epigenetyczną kontrolą ekspresji genów, wśród których centralną pozycję zajmują procesy metylacji DNA. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że profil zmian metylacji DNA kluczowych genów powiązanych z występowaniem raka piersi, może mieć znaczący udział w procesie inicjacji tego nowotworu. Co więcej, może być on charakterystyczny dla typu biologicznego raka piersi i z tego powodu sugeruje się jego rolę w ocenie skuteczności podejmowanej interwencji terapeutycznej. Koncepcja wykorzystania markerów metylacji do wczesnego diagnozowania raka piersi czy przewidywania odpowiedzi pacjentek na leczenie wymaga jednak dalszych badań i potwierdzenia, zwłaszcza w odniesieniu do stosunkowo słabo jeszcze poznanych procesów aktywnej demetylacji DNA, a mających kluczowy wpływ na wzór metylacji. W tym kontekście, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Linowieckiej bardzo dobrze wpisuje się w aktualny nurt badań nad podłożem molekularnym raka piersi.

Układ redakcyjny pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. Zasadniczy trzon pracy zawiera 139 stron maszynopisu, na który składa się 6 rozdziałów tj. wstęp, cele pracy, materiały i metody, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz piśmiennictwo. Proporcja między poszczególnymi rozdziałami została zachowana. Rozprawę uzupełniają

streszczenia w języku polskim i angielskim, spis skrótów, wykaz tabel oraz rycin. Na końcu rozprawy zamieszczono kopię zgody Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań.

Wstęp został napisany zwięzłym i treściwym językiem. Doktorantka w sposób bardzo czytelny i przejrzysty omówiła podstawy epigenetycznej regulacji aktywności genów, kładąc nacisk na mechanizmy metylacji i aktywnej demetylacji DNA. W kolejnych podrozdziałach Autorka szczegółowo opisuje procesy, które mogą prowadzić do zaburzeń funkcjonalnych białek zaangażowanych w demetylację DNA i tym samym do zmian we wzorze metylacji DNA. W dalszej części pracy Doktorantka omawia problematykę kliniczną raka piersi, w tym sytuację epidemiologiczną, modyfikowalne i niemodyfikowalne czynniki ryzyka, klasyczne czynniki prognostyczne i predykcyjne oraz obecnie stosowane zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w zależności od podtypu biologicznego raka piersi. W ostatniej części wstępu przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat udziału mechanizmów epigenetycznych w procesie kancerogenezy w raku piersi. Uważam, że część teoretyczna rozprawy bardzo dobrze uzasadnia podjęcie tematu badawczego i argumentuje wybór panelu genów i metabolitów związanych z aktywną demetylacją DNA do badań. Warto również podkreślić, że wszystkie zagadnienia zostały omówione z wykorzystaniem bogatego i aktualnego piśmiennictwa.

Ogólnym celem pracy doktorskiej było zbadanie czy w leukocytach kobiet z rakiem piersi występują zmiany w poziomie ekspresji genów i kluczowych metabolitów związanych z aktywną demetylacją DNA w porównaniu do kobiet zdrowych. Uwzględniając występowanie różnych profili metylacji w zależności od podtypu biologicznego raka piersi, Doktorantka postawiła sobie dodatkowe cele zbadania czy leczenie neoadjuwantowe może powodować zmiany w poziomie ekspresji genów i produktów aktywnej demetylacji DNA oraz czy badane geny i molekuly mogą stanowić potencjalny czynnik prognostyczny raka piersi. Warunkiem realizacji tych ambitnych celów badawczych był dostęp do dobrze scharakteryzowanego materiału klinicznego. Warunek ten został spełniony dzięki współpracy z Centrum Onkologii im. Prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy. Do badań pozyskano krew od 60. kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi (w czterech punktach czasowych) oraz od 33. kobiet zdrowych. Dodatkowo, od 22. pacjentek z rakiem piersi pobrano również materiał z tkanki guza i jego obrzeży. Uważam, że zastosowana w pracy liczebność grup, badawczej i kontrolnej, jest w pełni wystarczająca, by zapewnić odpowiednią moc statystyczną uzyskanych wyników badań, co w dużym stopniu warunkuje ich późniejszą interpretację. W tym miejscu mam uwagę natury formalnej. Informacja o liczebności grup powinna znaleźć się w rozdziale „Materiał i metody”, w pierwszym jego podrozdziale pt.: „Charakterystyka grupy badawczej”, a nie dopiero w opisie wyników.

Część eksperymentalna pracy została dobrze zaplanowana. Do badania poziomu transkryptu genów wykorzystano ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym, klasyczną technikę stosowaną w biologii molekularnej. Do ilościowej oceny poziomów 5-metylocytozyny i jej pochodnych użyto czułej wysokosprawnej techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas, co podnosi wartość naukową rozprawy. Chociaż zabrakło mi w pracy ryciny z przykładowym wynikiem dla badanych próbek, dla potwierdzenia jakości uzyskiwanych chromatogramów. Uwagę zwraca natomiast rzetelny i bardzo szczegółowy opis zastosowanych procedur, który może być punktem odniesienia przy próbach powtórzenia czy kontynuacji badań. Drobna uwaga formalna do tej części pracy dotyczy zastosowania wielu wykazów odczynników i sprzętu laboratoryjnego, które przedstawiono oddzielnie dla każdej kolejnej opisywanej procedury. Zastosowanie jednego wykazu pozwoliłoby na uniknięcie niepotrzebnych powtórzeń.

Wyniki badań zostały opracowane bardzo starannie i stanowią obszerną część całej rozprawy. Ten 52-stronicowy rozdział został podzielony na 14 podrozdziałów, uwzględniających analizę poziomów ekspresji genów i zmodyfikowanych zasad azotowych pod kątem licznych danych klinicznych, które obejmowały stopień zajęcia węzłów chłonnych, wielkość guza, stopień zaawansowania nowotworu, podtyp biologiczny raka piersi czy stopień remisji guza po leczeniu chemioterapeutycznym. Wyniki przedstawiono w 23. czytelnych tabelach i na 22. rycinach, które zostały poprzedzone opisami, co bardzo ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z ogromną ilością danych statystycznych. W tym miejscu wymieniam kilka znalezionych błędów edytorskich w tej części rozprawy: strona 62, na rycinie 5 dla poziomu transkryptu dla genu izoformy drugiej dehydrogenazy izocytrynianowej zamieniono miejscami dane dla kobiet z grupy kontrolnej i z rakiem piersi; strona 66, w opisie wyników w grupie kobiet z zajęciem węzłów chłonnych obserwowano niższy, a nie jak podano, wyższy poziom 5-metylocytozyny, 5-hydroksymetylocytozyny, 5-formylocytozyny i 5-hydroksymetylouracylu oraz odpowiednio wyższy, a nie jak podano, niższy poziom 5-karboksycytozyny i deoksyurydyny.

W szerokiej i wszechstronnej dyskusji Doktorantka rzetelnie odniosła się do uzyskanych wyników, umiejętnie konfrontując je z doniesieniami innych autorów. Pragnę w tym miejscu podkreślić, że całość rozprawy została napisana w oparciu o imponujący wykaz 376 pozycji piśmiennictwa, które zostało trafnie dobrane i zacytowane, co dodatkowo podkreśla bardzo dobrą znajomość podjętego problemu badawczego przez jej Autorkę oraz podnosi wartość pracy. Mały niedosyt budzi jedynie brak w zakończeniu dyskusji wskazania konieczności prowadzenia dalszych badań i ewentualnych sugestii, co do kierunku/ów, w jakich mogłyby być one prowadzone.

MF

Na podstawie uzyskanych wyników, Doktorantka wyciągnęła wnioski, które w całości odpowiadają zrealizowanym celom. Wnioski te są w pełni uzasadnione i stanowią inspirację do dalszych poszukiwań naukowo-badawczych. Ich potencjalny aspekt praktyczny jest bardzo mocną stroną rozprawy i odpowiada na aktualną potrzebę poszukiwania nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, które mogłyby stanowić potencjalne narzędzie do planowania leczenia oraz rozwoju nowych terapii raka piersi, zwłaszcza w dobie personalizacji leczenia chorób nowotworowych.

Pod względem merytorycznym pracę oceniam wysoko. Badania zostały wykonane na dobrze scharakteryzowanym materiale klinicznym. Doktorantka przeanalizowała szeroki panel parametrów molekularnych, a ich wartości skorelowała z licznymi danymi klinicznymi, prowadząc do ciekawych i nierzadko nowatorskich wniosków o potencjale aplikacyjnym. Trudno nie zgodzić się ze stwierdzeniem Doktorantki, że *„wyniki prezentowane w niniejszej pracy po raz pierwszy obejmują całościową analizę poziomu ekspresji genów oraz produktów procesów aktywnej demetylacji DNA w raku piersi”*. Z praktycznego punktu widzenia szczególnie interesujące wydają się być obserwowane zmiany w procesach aktywnej demetylacji DNA podczas leczenia chemioterapią neoadjuwantową. Wyniki te rzucają nowe światło na rolę procesów epigenetycznych w regulacji skuteczności powszechnie stosowanych chemioterapeutyków.

Rolą recenzenta jest wskazanie również słabych punktów rozprawy doktorskiej. Za taki można uznać dość liczne błędy literowe w całym tekście rozprawy, co muszę przyznać, jest trochę irytujące, bo praca jest napisana dojrzałym językiem naukowym. Nie mam wątpliwości, że po korekcie edytorskiej praca w pełni kwalifikuje się do opublikowania w dobrych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Przedstawione uwagi redakcyjne w żadnym stopniu nie umniejszają mojej wysokiej oceny merytorycznej rozprawy doktorskiej. Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w rozwój wiedzy teoretycznej i praktycznej w obszarze złożonej biologii raka piersi.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Kingi Linowieckiej spełnia wszystkie ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Kingi Linowieckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość poznawczą wyników badań oraz ich wydźwięk praktyczny i społeczny wnioskuję o jej wyróżnienie.

Monika Trzepek