



Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra Perinatologii i Ginekologii
Klinika Perinatologii i Chorób Kobięcych
Department of Perinatology and Gynecology,
Poznan University of Medical Sciences
Division of Perinatology and Women's Diseases

Prof. dr hab. Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz

Poznań, 12.02.2016.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
PT. ANALIZA MUTACJI I POLIMORFIZMÓW W GENIE *RET* U CHORYCH Z DZIEDZICZNYM I
SPORADYCZNYM RAKIEM RDZENIASTYM TARCZYCY
MGR INŻ. MARTY KACZMAREK-RYŚ

Osiągnięcia z ostatnich lat pokazały, że analiza genetyczna staje się istotnym elementem rozważań nad etiologią zmian karcinogennych, jak również nieodzowną częścią diagnostyki chorób nowotworowych. Jedną z przyczyn tego zjawiska jest z pewnością gwałtowny rozwój technik molekularnych umożliwiających nowoczesną diagnostykę i leczenie. Ustalenie podłoża molekularnego danego nowotworu daje szansę na znalezienie substancji aktywnej działającej na określony rodzaj komórek nowotworowych. Z drugiej strony analiza genetyczna pozwala na charakterystykę nowych markerów chorób nowotworowych, co daje potencjalną możliwość doboru optymalnego sposobu leczenia. Przede wszystkim jednak należy podkreślić wagę diagnostyki molekularnej w dziedzicznych chorobach nowotworowych. Umożliwia ona identyfikację osób obciążonych wysokim ryzykiem nowotworu na długo przed rozwojem choroby, pozwalając tym samym na wdrożenie odpowiedniej profilaktyki.

Rak rdzeniasty tarczycy jest nowotworem neuroendokrynnym wywodzącym się z okołopęcherzykowych komórek C tarczycy. Jego rozwój jest związany z mutacjami protoonkogenu *RET*, które są wykrywane u większości pacjentów z rodzinnym typem występowania tej choroby. Fenotypową heterogenność przebiegu klinicznego raka rdzeniastego tarczycy powiązano z różną lokalizacją substytucji aminokwasów w łańcuchu białka *RET*. Jednak w zależności od badanej populacji doniesienia dotyczące wpływu wariantów genetycznych genu *RET* na zwiększone ryzyko rozwoju raka rdzeniastego tarczycy pozostają sprzeczne.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja ma układ typowy, na który kolejno składają się rozdziały: Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie w j. polskim i angielskim, Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo oraz Spis Tabel i Rycin. Dodatkowo rozprawę doktorską uzupełniono o 3 dodatki i 2 załączniki oraz Wykaz osiągnięć naukowych uzyskanych przez doktorantkę w trakcie realizacji pracy doktorskiej i w pracy zawodowej. W całości rozprawa zawarta jest na 157 stronach.

We **Wstępie** Autorka rozprawy doktorskiej przedstawiła charakterystykę gruczolu tarczowego, hormonów tarczycy, raka rdzeniastego tarczycy. Szczegółowo omówiona została epidemiologia, klasyfikacja, diagnostyka kliniczna i obrazowa, a także stosowane w tej chorobie metody terapeutyczne. Z medycznego punktu widzenia daje to szeroki obraz omawianego problemu, a także podkreśla zasadność przeprowadzonych przez Autorkę badań. W dalszej części Wstępu bardzo wnikliwie opisano gen *RET*. Wszystkie informacje są poparte licznymi cytowaniami z aktualnej literatury oraz częściowo zobrazowane poprzez starannie wykonane ryciny.

Cele pracy sformułowano poprawnie, wskazując na molekularną i kliniczną charakterystykę grupy 142 chorych z rakiem rdzeniastym tarczycy z regionu Wielkopolski oraz ich rodzin. Istotnym celem pracy jest opracowanie testów dla szybkiego i taniego wykrywania najczęstszych mutacji genu *RET*. Nie mniej ważnym celem jest analiza zależności pomiędzy genotypem a fenotypem w badanej grupie pacjentów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w pracy zbadano siedem wybranych polimorfizmów w genie *RET*, zarówno w grupie badanej chorych z rakiem rdzeniastym tarczycy, jak również w populacji polskiej.

Rozdział **Materiał i metodyka** zawiera informacje dotyczące charakterystyki grupy badanej i populacyjnej oraz zastosowanych w pracy metod badawczych. Wątpliwość wzbudza natomiast bardzo lakoniczny opis pacjentów zakwalifikowanych do analizy. Autorka rozprawy doktorskiej podała w zasadzie jedynie dane dotyczące liczebności pacjentów w poszczególnych podgrupach. Imponujący jest natomiast szczegółowy i świadczący o dużej znajomości tematu opis metod badawczych. Kolejno scharakteryzowano izolację DNA metodą z izotiocyanianem guanidyny, oczyszczanie preparatów DNA do analizy HRM, ocenę ilościową i jakościową preparatów DNA, amplifikację eksonów genu *RET* do pirosekwencjonowania, sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym, wykrywanie zmian punktowych DNA techniką PCR-HRMA, amplifikację fragmentów genu *RET* do sekwencjonowania oraz sekwencjonowanie produktów PCR przy użyciu sekwenatora MegaBACE. Metody statystyczne zastosowane w pracy zostały dobrane prawidłowo.

Fragment dotyczący **Wyników** przeprowadzonych przez Autorkę badań zasługuje na ogromne uznanie i świadczy o dojrzałości naukowej mgr inż. Kaczmarek-Ryś. Zwraca uwagę bardzo czytelne przedstawienie otrzymanych wyników. Dużą zaletą tego fragmentu recenzowanej rozprawy doktorskiej jest prezentacja wyników w postaci licznych, starannie wykonanych tabel oraz rycin. W mojej ocenie Wyniki stanowią bardzo dobry i merytorycznie poprawny fragment dysertacji. Kolejno opisano rezultaty pirosekwencjonowania, omówiono optymalizację metody, przedstawiono wyniki analiz HRM, analizę fragmentów genu *RET*, w których najczęściej występują mutacje przy zastosowaniu pirosekwencjonowania i techniki HRMA. Przedstawiono analizę sekwencji kodującej genu *RET* u chorych z rakiem rdzeniastym tarczycy, u których nie zidentyfikowano mutacji w eksonach: 8, 10, 11, 13-16, analizę wybranych wariantów polimorficznych genu *RET* oraz analizę częstości występowania rozpatrywanych wariantów polimorficznych w badanych grupach. Bardzo interesujące z punktu widzenia klinicysty są podrozdziały dotyczące korelacji genotypów polimorficznych *loci* z klinicznym obrazem choroby u chorych ze zidentyfikowaną mutacją w genie *RET* oraz u pacjentów ze sporadycznym rakiem rdzeniastym tarczycy. Dodatkowo przeprowadzono także analizę haplotypów. Ponownie chciałabym podkreślić ogromny wkład pracy, który zapewne włożono w wykonanie szczegółowych tabel w tej części dysertacji.

Znaczna część **Dyskusji** skupia się na umiejętnym omówieniu otrzymanych wyników oraz porównaniu ich do doniesień innych autorów. Bardzo istotny wydaje się fragment dotyczący efektywności przyjętej w analizie metodyki badań. W dalszej kolejności przedstawiono rozkład mutacji genu *RET* w badanej grupie i innych populacjach, a także znaczenie wariantów polimorficznych tego genu. Wielu informacji, które znajdują odzwierciedlenie w praktyce klinicznej dostarcza podrozdział dotyczący rodzaju mutacji w genie *RET* i obrazu klinicznego raka rdzeniastego tarczycy. Rozważania zawarte w tym fragmencie potwierdzają zasadność przeprowadzonych badań. Co więcej wykazano tutaj, że informacje uzyskane z badań molekularnych, analizy biochemicznej oraz oceny klinicznej są niezbędne dla zapewnienia właściwego prowadzenia terapii u pacjentów z wczesnym lub zaawansowanym rakiem rdzeniastym tarczycy. Sposób napisania przez Autorkę Dyskusji potwierdza Jej zdolność do prawidłowej, rzetelnej pod względem merytorycznym analizy otrzymanych wyników.

Wnioski w liczbie 9 odpowiadają na postawione wcześniej cele pracy. Wnioski te częściowo mają charakter kliniczny i są bardzo dobrym przykładem efektywnego połączenia badań klinicznych z naukami podstawowymi. Ciekawym spostrzeżeniem jest odmienne spektrum mutacji w badanej grupie pacjentów od opisanych w innych populacjach i wynikająca z tego potrzeba charakterystyki odrębnych populacji z uwagi na często występujące różnice. Wnioski wskazują na częstsze występowanie mutacji w eksonach 13 i 14 genu *RET* u chorych bez obciążonego wywiadu rodzinnego, a także na technikę HRMA (analiza eksonu 13 i fragmentu eksonu 14 w jednej reakcji multipleks) jako optymalnego testu dla wykrywania mutacji genu *RET* u pacjentów z pozornie sporadycznym rakiem rdzeniastym tarczycy z regionu Wielkopolski. Bardzo istotny jest wniosek dotyczący korelacji genotypu z fenotypem wskazujący na wcześniejsze występowanie choroby i jej wieloogniskowy charakter u pacjentów ze zidentyfikowaną mutacją genu *RET*, niższy wiek pacjentów w momencie wystąpienia choroby i zwiększone ryzyko występowania guzów chromochłonnych nadnerczy w przypadku obecności mutacji p.C634R, jak również późny rozwój choroby przy obecności mutacji p.Y791F. Odnotowano także częstsze występowanie sporadycznego raka rdzeniastego tarczycy u kobiet, a także zwiększoną skłonność do rozwoju kamicy żółciowej u pacjentów z tym typem nowotworu. Są to informacje, które z powodzeniem można wykorzystać w praktyce, optymalizując leczenie i odpowiednie je planując.

Piśmiennictwo zostało podane poprawnie, w ogólnie przyjęty sposób. Zebrane pozycje w pełni wiążą się z omawianym w rozprawie doktorskiej tematem i co istotne, w większości pochodzą z ostatnich kilku lat. Streszczenie w języku polskim i angielskim w całości odpowiada treści pracy.

W podsumowaniu podkreślić należy, że praca stanowi znakomite połączenie nauk klinicznych i zdobyczy nowoczesnej biologii molekularnej. Podjęto tutaj ważny i niezmiernie ciekawy problem z pogranicza medycyny oraz analizy genetycznej, a badania poparto właściwymi przesłankami naukowymi. W przedstawionej dysertacji Autorka udowodniła, że dysponuje rozległą wiedzą w temacie podjętych badań, jak również, że opanowała szereg metod najnowszej generacji w zakresie biologii molekularnej. Właściwie przeprowadzone wnioskowanie świadczy natomiast, że Autorka swobodnie potrafi przejść od analizy do syntezy. Akuratnie dobrana literatura przedmiotu wskazuje na rozległe studia Doktorantki w wybranym przez siebie temacie badań. W całości rozprawy doktorskiej należy uwypuklić

bardzo staranne opracowanie oraz jej przejrzysty układ poprzez przedstawienie wyników w licznych rycinach i tabelach.

W świetle powyższych uwag zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Kaczmarek-Ryś do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na umiejętne połączenie materiału klinicznego pozyskanego od reprezentatywnej licznie grupy pacjentów populacji polskiej ze starannie zaplanowanymi badaniami genetycznymi, zastosowaną nowoczesną metodykę i właściwe, wnioskowanie o charakterze wybitnie klinicznym wnoszę również o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej.

Poznań, dnia 12.02.2016

.....
