

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Kostrzewskiej-Poczekaj

„Analiza amplifikowanych regionów chromosomów zawierających potencjalne onkogeny w płaskonabłonkowym nowotworze krtani”

Nowotwory złośliwe krtani są rakami, których zdecydowana większość ma podłoże środowiskowe związane z paleniem tytoniu i spożywaniem wysokoprocentowych alkoholi, jednakże mechanizm procesów indukcji, promocji i inwazji zmian prowadzących do złośliwych guzów krtani jest stosunkowo słabo poznany. Mechanizm ten oczywiście powinien uwzględniać konstitucję genetyczną, w której w takim kontekście najważniejszą rolę odgrywają protoonkogeny i ich aktywne formy, onkogeny, geny supresji transformacji nowotworowej (supresory) oraz geny mutatorowe. W przypadku nowotworów o tak silnej konotacji środowiskowej, jak rak krtani, należy brać po uwagę także geny odpowiadające za metabolizm zarówno ksenobiotyków, jak i substancji endogennych. Zatem w przypadku raka krtani mamy istotne czynniki sprawcze - palenie tytoniu i picie wysokoprocentowych napojów alkoholowych, oraz podłoże genetyczne, z co najmniej czterema grupami genów, mogących mieć znaczenie dla indukcji i rozwoju tego nowotworu. Jest to obraz dość złożony, a sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że płaskonabłonkowy rak krtani może mieć podłoże wirusowe (HPV) i występować u osób, nigdy niepalących ani niepijących. Dlatego też podjęcie przez Promotora Pana Profesora Krzysztofa Szyftera, światowej klasy specjalistę mutagenezy środowiskowej, którego badania od lat zawierają elementy transformacji nowotworowej krtani oraz Doktorantki mgr inż. Magdaleny Kostrzewskiej-Poczekaj tematu znaczenia obszarów genomu mających szczególne znaczenie w patogenezie raka krtani uważam za uzasadnione.

Tytuł pracy odpowiada jej tematowi, choć ja zastąpiłbym słowo „analiza” słowem „znaczenie”. Spis treści jest kompletny i odzwierciedla rozsądny podział rozprawy na rozdziały i podrozdziały. „Wykaz skrótów”, zawierający w zdecydowanej większości akronimy i innego rodzaju symbole, jest trochę za skromny w stosunku do liczby symboli używanych w pracy i znajduje się w końcowej części rozprawy, co utrudnia korzystanie z niego.

Praca rozpoczyna się od Wstępu, w którym Autorka w kolejnych podrozdziałach krótko charakteryzuje płaskonabłonkowego raka krtani (LSCC) pod względem epidemiologicznym, przytacza dane na temat jego etiologii, a następnie w podrozdziale 3. opisuje proces transfor-

macji nowotworowej. Pisząc o tym, że „Proces transformacji można podzielić na cztery podstawowe etapy: inicjacji, promocji, progresji oraz metastazy.”, lepiej byłoby dać „trzy podstawowe etapy: inicjacji, promocji i progresji”, jako że progresja jest rozumiana, jako inwazja i metastaza oraz nie wszystkie nowotwory złośliwe w chwili obserwacji/badania wykazują aktywność metastatyczną. Podrozdział ten zawiera więcej dyskusyjnych fragmentów, na przykład ten o „nagomadzeniu uszkodzeń w systemach naprawy DNA”, które, przynajmniej dla mnie wynika to z tekstu Autorki, są składnikami każdej transformacji nowotworowej. Przecież nie o to chodzi - czasem zmiany w genach istotnych dla transformacji nowotworowej nie obejmują genów naprawy DNA. W ogóle, autorka skupia się głównie na mutacjach, zapominając o aspektach epigenetycznych transformacji nowotworowej, które mogą odgrywać szczególnie istotną rolę w etapach promocji i progresji. Dalej Autorka wymienia model progresji nowotworów głowy i szyi w powiązaniu ze zmianami genetycznymi, zaproponowany przez Califano i wsp. Szkoda, że Autorka nie pokusiła o 2-3 zdania charakterystyki tego modelu. W ostatnim paragrafie tego podrozdziału Pani Kostrzevska-Poczekaj wymienia najczęstsze zmiany chromosomalne obserwowane w nowotworach głowy i szyi. We fragmencie tym nie podoba mi się określenie „przyrost materiału genetycznego”, z co najmniej dwóch względów - po pierwsze sam „przyrost” nie jest równoznaczny z „amplifikacją”, a o to tutaj chyba chodzi, po drugie - o jakim „materiale genetycznym” mowa? Tytuł następnego podrozdziału „Rola genów supresji nowotworowej i onkogenów” zmusza do domysłów, czego dotyczyć ma ta rola. Pierwszy paragraf tego podrozdziału jest dyskusyjny, bo ekspresja ekspresją, ale kluczowe znaczenie ma aktywność produktów białkowych tych genów, która nie zawsze przekłada się na ekspresję. Dalej Autorka opisuje onkogeny mające znaczenie w nowotworach głowy i szyi oraz mechanizmy ich aktywacji. Pojawia się tu problem terminologiczny - czy onkogenem „się jest”, czy „się bywa”. Jeżeli Autorka w tytule pracy użyła określenia „potencjalne onkogeny”, to pisząc o aktywacji, powinna raczej używać terminu „protoonkogeny”. Pomimo tych dyskusyjnych fragmentów, ten rozdział pracy jest napisany dobrze i zrozumiale. W rozdziale tym Autorka przedstawia także wybrane do analizy w pracy obszary chromosomalne, czyniąc to w podrozdziale 9. „Wybór genów do analizy”. Następnie Autorka opisuje charakterystykę wybranych obszarów chromosomalnych. Szkoda, że Autorka nie tworzyła strony ilustracyjnej tej części pracy według dobrze przemyślanej koncepcji - ryciny, pomimo, że w zdecydowanej większości, jeśli nie wszystkie, „nieautorskie”, powinny mieć jednak elementy tekstowe w języku polskim; kuriozalna w takim kontekście jest Ryc. 7, w której część elementów tekstowych jest po polsku, a część po angielsku. Pomimo tych i innych niedoskonałości oraz niefortunnnych sformułowań, jestem pełen podziwu dla tej części pracy, w której Autorka wykazała dużą wiedzę, a przede wszystkim zrozumienie nietrywialnych problemów związanych z rolą onkogenów w transformacji nowotworowej.

Następny rozdział "Cele" nie jest niestety najlepiej napisany. Rozpoczyna się on niefortunnym zdaniem, że „Celem niniejszej rozprawy jest analiza...”. Otóż analiza nie powinna być

celem pracy, co zaznaczałem przy omawianiu tytułu, gdyż jest ona raczej narzędziem dla osiągnięcia celu. Przede wszystkim jednak sformułowanie celu powinno być poprzedzone postawieniem hipotezy badawczej, odpowiednio uzasadnionej. Hipotezy takiej można się doszukiwać w podrozdziale 9., w którym podano uzasadnienie wyboru regionów chromosomalnych badanych w pracy, jednak hipoteza powinna być sformułowana krótko i zostać wyeksponowana. Dalej niestety też nie jest lepiej, bo ze złożenia pierwszego zdania z pierwszym punktem mamy, że analiza była prowadzona poprzez weryfikację. Ciekawe. W punktach 1 i 2 Autorka pisze o „wybranych genach”, w punkcie 3 - o „badanych genach”, a w punkcie 4 - o „wybranych onkogenach”. Dobrze byłoby rozszyfrować te pojęcia, np. w pierwszym zdaniu tego rozdziału, przypisując zbiorowi genów określoną nazwę i konsekwentnie ją stosując. W punktach 1 i 2 powinny być bliżej, bądź najlepiej *explicite*, określone „linie komórkowe”. Punkt 4 jest wyjątkowo niefortunnie sformułowany - nie chodzi przecież o podjęcie próby, lecz właśnie o to, czego ta próba dotyczy, czyli określenia związku z amplifikacją i/lub ekspresją „wybranych onkogenów” z parametrami guza.

Następny rozdział „Materiał” dobrze opisuje linie komórkowe oraz przypadki kliniczne rozważane w pracy. Szczególne korzystne wrażenie robi liczba linii komórkowych używanych w pracy - 17, choć liczba przypadków klinicznych, 64, w kontekście zakresu prowadzonych badań, budzi także duże uznanie. Przyjrzyjmy się teraz kontroli. Jeżeli idzie o liczbę kopii, to jak pisze Autorka, grupa kontrolna był DNA wyizolowany z krwi 7 dawców. Chyba czegoś tu nie rozumiem, bo albo Autorka chciała określić liczbę kopii badanych genów w populacji ogólnej - jeżeli tego nie wiadomo, to 7 osobników, to trochę mało w porównaniu z 64 grupy badanej, albo powinna badać tę liczbę w tkance docelowej, albo w materiale otrzymanym podczas laryngektomii, określanym jako „czysty onkologicznie”.

Następny rozdział „Metody” jest napisany poprawnie i może być wykorzystany przy próbach powtórzenia, czy też rozszerzenia cyklu badań Doktorantki. W wielu miejscach opisy poszczególnych procedur mogłyby być skrócone, bez utraty kluczowych informacji. Bardzo korzystną stroną pracy jest zastosowanie techniki porównawczej hybrydyzacji genomowej z użyciem mikromacierzy (*array-CGH*), ale także sekwencjonowanie, immunohistochemia i fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* wpływają na bardzo korzystną ocenę zbioru metod zastosowaną przez Autorkę dla realizacji tematu rozprawy. Łącznie rozdziały „Materiał” i „Metody” to 28 stron (!). Nie ulega wątpliwości, że jego objętość odzwierciedla potężną pracę włożoną przez Doktorantkę w realizację rozprawy, jednakże należałoby się zastanowić nad jego skróceniem, przez częstsze odwoływanie się do opisów zamieszczonych w piśmiennictwie. Rozdział ten niepotrzebnie opisuje szczegółowo niektóre procedury, co byłoby znakomite, jako element opracowania dydaktycznego lub metodologicznego. Szczególnie dotyczy to procedur z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym. Swoją drogą, na str. 37 - nie „metodą Chomczyńskiego”, lecz raczej „metodą podaną przez Chomczyńskiego i Sacchi”.

Wyniki z *array-CGH* wskazują na trafność wyboru obszarów genomu do badań, zresztą nie może być inaczej. Wyniki te są przedstawione bardzo czytelnie w postaci tabel z opisem położenia regionów amplifikacji i graficznymi reprezentacjami analizy *array-CGH* oraz średnie wartości współczynnika $\log_2\text{ratio}$. Szkoda tylko, że Autorka tu i wcześniej nie pokusiła o polskie nazwy analizowanych genów. Wyniki analizy FISH ilustrowane są także bardzo dobrej jakości zdjęciami z mikroskopu fluorescencyjnego (Ryc. 15-17). Dla mnie szczególnie interesującym wątkiem pracy jest poszukiwanie mutacji genu *PIK3CA*, którego nadekspresję obserwowała Doktorantka najczęściej, i którego liczba kopii była silnie pozytywnie skorelowana z jego ekspresją, lecz tylko w przypadku linii komórkowych, dla wycinków z guzów krtani korelacja ta była słabsza. Metodą pirosekwencjonowania i klasycznego sekwencjonowania Autorka stwierdziła występowanie heterozygotycznej mutacji 1633G>A. Wynik ten doprowadził Autorkę do wniosku, że amplifikacja i mutacja aktywująca stanowią dwa niezależne mechanizmy leżące u podstaw nadekspresji genu *PIK3CA*. Bardzo wartościowe wyniki, znakomicie opisane i ilustrowane (Ryc. 23 i 24), otrzymała Autorka stosując techniki immunohistochemiczne. Podsumowując - wyniki uzyskane przez Panią Magister Inżynier są wynikami bardzo wartościowymi, znakomicie przedstawionymi i opisanymi.

Następny rozdział rozprawy to „Dyskusja”. Rozpoczyna się ona od wzmianki o znaczeniu profilu epigenetycznego komórki dla aktywacji onkogenów. Uważam, że w ogóle w rozprawie „wątek epigenetyczny” potraktowany jest marginalnie i nie tłumaczy tego jego brak jako przedmiotu. Dalej dyskusja jest prowadzona dogłębnie i rzeczowo - Doktorantka analizuje szczegółowo i dogłębnie swe wyniki, porównuje z wynikami podobnych badań wykonanych w innych ośrodkach, rozważa mechanizmy mogące leżeć u podstaw zaobserwowanych korelacji, tłumaczy ich brak. Jednakże w stosunku do dużego zakresu otrzymanych w pracy wyników, dyskusja ma raczej skromny charakter.

Następny rozdział rozprawy „Wnioski” nie jest najlepiej skonstruowany, przede wszystkim dlatego, że trudno szybko się zorientować na podstawie wniosków, jak zostały zrealizowane cele pracy, co jest ważne przy selektywnym odbiorze rozprawy. Powiem więcej - większości wniosków mają się nijak do celów pracy. Co gorsza, w większości są one powtórzeniem uzyskanych wyników, przedstawianych w dwóch poprzednich rozdziałach. Jak jest znaczenie wniosku w punkcie 5?

Streszczenie rozpoczyna się od niefortunnego sformułowania o pochodzeniu nowotworów. Wyniki są opisane bardzo skrótowo, podobnie jak materiał i metody. Brak wniosków. Cennym uzupełnieniem pracy jest streszczenie w języku angielskim, jednak nie jest ono wolne od wad, które wymieniłem dla streszczenia w języku polskim.

Następny rozdział pracy to „Wykaz skrótów”, którego niefortunna lokalizację już wskazywałem. Dalej następuje „Spis tabel i rycin”.

Wykaz piśmiennictwa (Rozdział XII. "Literatura") zawiera 178 pozycji dobrze dobranych na poparcie cytowanych faktów i tez i jest w zasadzie jednolicie przedstawione w wykazie.

Na końcu pracy znajdują się załączniki z charakterystyką linii komórkowych, pacjentów biorących udział w badaniach, odczynników chemicznych oraz wynikami cząstkowymi niektórych analiz, co stanowi o wysokiej wartości dokumentacyjnej rozprawy.

Praca napisana jest na ogół poprawnym językiem, a drobne potknięcia są chyba do uniknięcia, ale nie wpływają one na ogólne korzystne wrażenie na temat języka pracy.

Bardzo dużą zaletą pracy jest wykonywanie badań na liniach komórkowych i materiale klinicznym.

Resumując, Pani Magister Inżynier Magdalena Kostrzewska-Poczekaj wykonała „kawał dobrej roboty” - rozprawa doktorska to sukces jej promotora prof. dr hab. Krzysztofa Szyftera i Doktorantki. Mam duże uznanie dla ogromu Ich pracy, a czytanie rozprawy stymulowało mnie ciągle do intelektualnego wysiłku, którego efektem były pytania i uwagi do Autorki przedstawione w recenzji. Myślę, że fakt ten także dobrze świadczy o rozprawie.

Stwierdzam, że przedstawiona przez mgr inż. Magdalenę Kostrzewską-Poczekaj rozprawa za-tytułowana „Analiza amplifikowanych regionów chromosomów zawierających onkogeny w płaskonabłonkowym nowotworze krtani” jest bardzo dobrą pracą i spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim. Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Kostrzewskiej-Poczekaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. Janusz Błasiak

