



ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY w Katowicach

Dr hab. n. med. Jarosław Markowski

Katowice, 25.05.2014r.

Kierownik Katedry i Kliniki Laryngologii

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

40 – 027 Katowice

ul. Francuska 20

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Magdaleny Kostrzewskiej - Poczekaj

**pt.: „Analiza amplifikowanych regionów chromosomów zawierających
potencjalne onkogeny w płaskonabłonkowym nowotworze krtani”**

Choroba nowotworowa jest chorobą o podłożu genetycznym, wynikającą w większości przypadków z nabytych mutacji oraz ze zmian genetycznych, które wpływają na ekspresję genów. W jej rozwoju istotną rolę odgrywa również wpływ czynników środowiskowych. Zgodnie z tą tezą, największą obecnie rolę w badaniach nad biologią molekularną nowotworów odgrywa identyfikacja markerów genetycznych, jakich można użyć do precyzyjnego ustalenia rozpoznania, a następnie możliwości prognozowania przebiegu choroby na podstawie ustalonego profilu genów.

Przebieg kliniczny procesu rozwoju raka płaskonabłonkowego krtani jest obecnie trudny do przewidzenia na podstawie ustalonych kryteriów kliniczno–histopatologicznych. Nie ma do dzisiaj uznanych markerów molekularnych, które można by z dużą dozą pewności stosować przy wczesnym wykrywaniu, prognozowaniu przebiegu, czy też przy wyborze rodzaju terapii raka krtani. Mimo postępów współczesnej biologii molekularnej rak krtani pozostaje nadal słabo zdefiniowanym

nowotworem z punktu widzenia biologii molekularnej i genetyki. Wielu autorów sugeruje, iż stosując globalne modele ekspresji genowej, można zaklasyfikować chorych na raka krtani do poszczególnych podgrup, różniących się przebiegiem klinicznym choroby.

Pierwszym dowodem na to, że nowotwory wywodzą się z zakłóceń natury genetycznej, była obserwacja, że białaczce szpikowej przewlekłej zawsze towarzyszyła translokacja chromosomów. Odkrycie to doprowadziło ostatecznie do wyjaśnienia roli protoonkogenów, a z czasem do opracowania wielostopniowego modelu powstawania raka, najlepiej udokumentowanego dla rozwoju nowotworów okrężnicy, lecz mającego zastosowanie również do powstawania nowotworów głowy i szyi.

Kompleksowy profil ekspresji genów, mający wartość prognostyczną lub identyfikacyjną jako markerów guza, podlegających ekspresji wyłącznie w tkankach raka płaskonabłonkowego regionu głowy i szyi nadal pozostaje nieznan.

Proces kancerogenezy przebiega wieloetapowo i ma charakter bardzo złożony. Powstanie uszkodzeń w DNA natychmiast uruchamia wysokosprawny mechanizm jego naprawy, doprowadzający w określonych warunkach do całkowitego powrotu do prawidłowej cząsteczki DNA. Ponadto tylko uszkodzenie pewnych regionów DNA, w których znajdują się geny czynne w procesie nowotworzenia, powodują transformację nowotworową.

Biorąc pod uwagę z jednej strony ogromne postępy biologii molekularnej stwarzającej nadzieję na ustalenie istotnych klinicznie markerów molekularnych raka krtani, a z drugiej wciąż niezadawalającą skuteczność leczenia raka krtani, utrzymującą się od lat na niezmiennym poziomie 5 – letnich przeżyć w granicach 40 – 50% temat pracy doktorskiej podjęty przez Doktorantkę należy uznać za niezwykle ważny. Fakt, iż corocznie w Polsce zachorowuje na raka krtani ok. 2,5 tysiąca osób nadaje tej pracy również istotny wymiar społeczny.

Poszukiwanie molekularnych uwarunkowań powstawania nowotworów jest obecnie jednym z głównych kierunków badań w onkologii i biologii molekularnej. Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Kostrzewskiej – Poczekaj jest również taką próbą poszukiwania nowych markerów molekularnych stanowiących podłoże rozwoju raka płaskonabłonkowego krtani. Tak więc temat pracy doktorskiej jest bardzo dobrze dobrany, gdyż jest aktualny i nowatorski oraz niesie aspekt nowości i innowacyjności, tak ważny w pracach młodych naukowców.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została przygotowana pod opieką naukową prof. zw. dr hab. Krzysztofa Szyftera, kierownika Zakładu Mutagenezy Środowiskowej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Rozprawę doktorską mgr inż. Magdaleny Kostrzewskiej - Poczekaj przeczytałem z dużym zainteresowaniem. Liczy ona 129 stron maszynopisu i

jest zredagowana w typowym układzie przyjętym dla prac doktorskich. Składa się z 13 rozdziałów ułożonych logicznie z zachowaniem odpowiednich proporcji oraz posiada czytelną oprawę graficzną (zawiera 30 tabel i 25 rycin oraz 9 odrębnych tabel w załączniku), ułatwiającą zapoznanie się z zawartością pracy i uzyskanymi wynikami. Praca jest opatrzona 178 cytacjami pozycji literaturowych z uwzględnieniem wszystkich najważniejszych publikacji odnoszących się do tematu badawczego.

Praca zawiera 25 – stronicowy wstęp omawiający epidemiologię i etiologię płaskonabłonkowych nowotworów krtani oraz proces kancerogenezy i rolę genów supresji nowotworowej i onkogenów wraz z mechanizmami ich aktywacji. Kolejne podrozdziały wstępu omawiają mechanizmy amplifikacji, rodzaje terapii nowotworów krtani oraz geny wybrane do analizy wraz z ich szczegółowym opisem. Jest to swoisty „*state of art*” współczesnej biologii molekularnej raka płaskonabłonkowego regionu głowy i szyi.

Autorka rozprawy sformułowała 4 cele badawcze swojej dysertacji a mianowicie: weryfikację obecności dodatkowych kopii DNA wybranych genów w liniach komórkowych i guzach krtani, sprawdzenie czy wybrane geny wykazują nadekspresję w liniach komórkowych i guzach krtani, korelację liczby kopii DNA z ekspresją badanych genów oraz ustalenie roli wybranych onkogenów poprzez odniesienie wyników molekularnych do parametrów klinicznych i stopnia złośliwości guza. Obszarem badań Doktorantki były trzy regiony chromosomowe wybrane na podstawie powtarzających się amplifikacji wykrytych metodą array-CGH. Stanowi to bardzo nowoczesne podejście do metodyki badań współczesnej biologii molekularnej, twierdzącej, iż nowotwór wynika z postępu (akumulacji) zmian genetycznych. Wzmocnione (amplifikowane) regiony chromosomów mogą zawierać dominujące onkogeny, podczas gdy regiony „usunięte” mogą stanowić skupisko genów supresora nowotworu. Rak płaskonabłonkowy krtani jest często identyfikowany z konkretnymi aberracjami chromosomowymi, które obejmują wzmocnienie konkretnych regionów. Oczywiście ta dysregulacja ekspresji genowej jest bardziej złożona niż prosta zależność pomiędzy aberracjami a ekspresją genową.

Rozdział dotyczący materiału badawczego wykorzystanego w pracy oraz użytych metod i narzędzi badawczych autorka przedstawiła przejrzysto i szczegółowo. W swojej pracy do wyselekcjonowania amplifikowanych genów doktorantka zastosowała wyniki uzyskane metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy. Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu na prowadzenie opisanych badań genetycznych (numer 904/06 oraz numer 164/10).

Zwracają uwagę bardzo rygorystyczne kryteria włączenia do badań pacjentów chorych na raka płaskonabłonkowego krtani zastosowane przez doktorantkę. Zwłaszcza kryterium obecności przynajmniej 60% utkania nowotworowego w przekroju z wycinka guza jest trudne do osiągnięcia. Rak płaskonabłonkowy krtani jest bowiem trudnym materiałem do badań genetycznych ze względu

na fakt, iż utkanie raka płaskonabłonkowego jest poroździelane utkaniem prawidłowej tkanki łącznej, nie jest więc utkaniem homogennym. Kryterium przynajmniej 60% utkania nowotworowego w przekroju z wycinka guza dowodzi dobrej współpracy Doktorantki z histopatologiem, który musiał każdorazowo oceniać fragment pobranego guza. Spełnienie tego kryterium zdecydowanie podnosi wartość pracy, a jej wyniki mogą dzięki temu stanowić punkt odniesienia dla badań genetycznych raka płaskonabłonkowego krtani prowadzonych przez inne zespoły badawcze. Dobór metod badawczych nie budzi zastrzeżeń, jest on adekwatny do postawionych celów, a ich opis świadczy o bardzo dobrym ich opanowaniu praktycznym przez Doktorantkę. Na uwagę zasługuje także bardzo staranny dobór metod statystycznych do analizy wyników badań. Kolejność prezentacji wyników jest jasna i logiczna i stanowi odpowiedź na założenia pracy.

Na podkreślenie zasługuje użycie przez Doktorantkę nowoczesnych technik badań molekularnych, zwłaszcza badań przy użyciu mikromacierzy oligonukleotydowych i fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Technologia mikromacierzy jest nadal stosunkowo nowa i kosztowna, co ogranicza typ i zakres możliwych badań. Potwierdzenie przez Doktorantkę dysregulacji genetycznej w raku płaskonabłonkowym krtani za pomocą technik alternatywnych, takich jak: immunohistochemia, hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* (FISH) czy ilościowe PCR w czasie rzeczywistym ma zasadnicze znaczenie dla dodania wiarygodności i zaufania w stosunku do danych wygenerowanych za pomocą mikromacierzy. Tak kompleksowe podejście Autorki do metodyki badań molekularnych raka krtani stanowi o ogromnej wartości merytorycznej tej rozprawy.

Wyniki badań zostały przedstawione i omówione w odrębnym rozdziale w formie opisowej oraz przejrzystych tabel i rycin, przy których opracowaniu zastosowano właściwe metody analizy statystycznej. Wyniki badań i ich omówienie obejmują 7 podrozdziałów, w których oceniono uzyskane wyniki w zakresie wszystkich celów rozprawy. Doktorantka wykazała się umiejętnością krytycznej i wyważonej oceny uzyskanych wyników oraz formułowania wniosków końcowych, zwłaszcza w sytuacji braku możliwości skonfrontowania ich z danymi z piśmiennictwa.

Sformułowane przez Doktorantkę wnioski odpowiadają ustalonym celom pracy. Wnioski doktorantki identyfikujące trzy nowe geny a mianowicie: gen *PIK3CA* jako wiodący gen amplifikacji w regionie 3q25-q29, gen *FADD* jako gen wiodący regionu 11q13 oraz gen *CRKL* jako gen wiodący regionu 22q11 są oryginalnymi wnioskami autorki, dotychczas nie znanymi i nie opisywanymi w piśmiennictwie poświęconym poszukiwaniom potencjalnych nowych onkogenów w raku płaskonabłonkowym krtani. Jest to oryginalny dorobek Doktorantki na polu poszukiwania nowych markerów molekularnych raka krtani. W każdym przypadku zidentyfikowania genu wiodącego Doktorantka określiła również mechanizmy nadekspresji tych genów, co dodatkowo podnosi wartość pracy. W każdym badanym regionie określono również geny towarzyszące danym aberracjom.

Identyfikacja genów *THPO*, *MUC4* i *MUC20* jako genów towarzyszących amplifikacji regionu 3q25-q29 jest kolejnym oryginalnym wkładem Autorki w proces poznawania biologii molekularnej raka krtani. Dzięki pracy Doktorantki lekarze laryngolodzy oraz onkolodzy zajmujący się problemem raka płaskonabłonkowego głowy i szyi nie mają już wątpliwości, że rak krtani jest schorzeniem o podłożu poligenowym.

Unikalną wartością pracy są zastosowane przez Doktorantkę narzędzia badawcze w postaci mikromacierzy, badań PCR w czasie rzeczywistym do matrycy DNA oraz cDNA, fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* oraz badania immunohistochemiczne wycinków pobranych z tkanki raka płaskonabłonkowego krtani. Te nowoczesne metody badawcze pozwoliło Doktorantce na zrealizowanie programu badawczego zmierzającego do określenia onkogenów w raku krtani.

W podsumowaniu stwierdzam, iż przedłożona mi do oceny praca doktorska mgr inż. Magdaleny Kostrzewskiej - Poczekaj pt. „Analiza amplifikowanych regionów chromosomów zawierających potencjalne onkogeny w płaskonabłonkowym nowotworze krtani” ma charakter pionierski, po raz pierwszy określono trzy nowe geny wiodące mogące mieć istotne znaczenie jako markery nowotworowe raka krtani. Stanowi to istotny naukowo, oryginalny autorski wkład Doktorantki do problematyki badań nad rakiem płaskonabłonkowym krtani. Mam nadzieję, że doktorantka będzie kontynuować podjęte badania mające na celu określenie nowych onkogenów w raku krtani a uzyskane dalsze wyniki na opracowane na większym materiale chorych pozwolą na precyzyjne określenie genów istotnych w nowotworzeniu raka płaskonabłonkowego krtani.

Nie wnoszę żadnych zastrzeżeń merytorycznych ani też uwag redakcyjnych.

Bardzo wysoko oceniam wartość naukową rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Kostrzewskiej - Poczekaj i w związku z tym mam zaszczyt wystąpić do Wysokiej Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wobec bardzo wysokich walorów merytorycznych rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Kostrzewskiej – Poczekaj wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku i poważania



dr hab. n. med. JAROSŁAW MARKOWSKI
specjalista otolaryngolog
specjalista audjolog i foniatra
nr prawa wyk. zawodu 1362850