

RECENZJA PRACY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Lekarz Agaty Dutkowskiej

pt. „Ocena znaczenia diagnostycznego wybranych zmian molekularnych genów *FHIT* i *RARβ*
(region „hot spot mutation“) w niedrobnokomórkowym raku płuca”

wykonanej pod kierunkiem prof. zw. dr hab. med. Adama Antczaka w Klinice Pulmonologii
i Alergologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 1 im Norberta Barlickiego w Łodzi

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska porusza problem niezwykle istotny dla rozumienia procesów warunkujących rozwój niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP), a zwłaszcza badań nad identyfikacją i wprowadzeniem do praktyki klinicznej wiarygodnych biomarkerów diagnostycznych. Wskazuje się powszechnie, że niska czułość aktualnie dostępnych badań przesiewowych znacząco utrudnia wczesne wykrycie tej choroby i jest jedną z głównych przyczyn wysokiej śmiertelności. Tymczasem, jak dowodzą aktualne dane epidemiologiczne, rak płuca jest najgroźniejszą spośród wszystkich chorób onkologicznych, zarówno pod względem zapadalności, jak i liczby zgonów.

Przedmiotem badań autorki była analiza profilu metylacji i ekspresji wybranych genów supresorowych o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym i/lub prognostycznym w NSCLC. Autorka skupiła się na ocenie zmian molekularnych genów *RARβ* i *FHIT* zlokalizowanych na krótkim ramieniu 3 chromosomu, ze względu na swoje krytyczne znaczenie dla kancerogenezy znanym jako „hot spot mutation site”. Produkty białkowe obu genów mają znaczący udział w kluczowych procesach komórkowych tj. naprawie DNA, regulacji cyklu komórkowego i proliferacji. Znane są publikacje wskazujące na powiązanie zaburzeń funkcji tych genów z rozwojem NDRP.

W przedstawionej do recenzji pracy Doktorantka podjęła się analizy wybranych mechanizmów regulacji genetycznej i epigenetycznej, a w szczególności poziomu ekspresji, metylacji promotorowej genów *FHIT* i *RARβ* oraz poziomu immunoekspresji białka Fhit w tkance nowotworowej w kontekście ich potencjalnej wartości diagnostycznej. Warto podkreślić szczególną wagę poznawczą tak nakreślonego planu pracy w kontekście trudności klinicznych związanych z efektywną, wczesną identyfikacją chorych na raka płuca.

Praca ma układ klasyczny, składa się z 80 stron tekstu nie licząc piśmiennictwa. We Wstępie Doktorantka syntetycznie przedstawiła etiopatogenezę raka płuca, skupiając się na

roli czynników genetycznych, a zwłaszcza krytycznym znaczeniu zjawiska niestabilności genetycznej. Przejrzyście scharakteryzowała kluczowe dla procesów nowotworzenia znaczenie regionu 3p i zlokalizowanych w jego obrębie genów supresorowych, a w szczególności genu FHIT (3p14.2) oraz RAR β (3p24.2). Należy podkreślić celny dobór i doskonałe przygotowanie zawartych we *Wstępie* grafik i tabel, które znakomicie uzupełniają tekst i pomagają w jego odbiorze. W mojej opinii zabrakło jedynie wyczerpującego i przekonującego uzasadnienia wyboru tych konkretnych genów jako przedmiotu badań niniejszej pracy, a zwłaszcza wskazania na jakiej podstawie Autorka oczekuje, iż zmiany w ich obrębie mogą mieć znaczenie diagnostyczne, a nawet prognostyczne. Stanowiłoby ono naturalne dopełnienie i podsumowanie dowodu logicznego dobrze przeprowadzonego w tej części pracy.

W oparciu o treści ujęte w pierwszej części pracy, Doktorantka sformułowała *Główny Cel* badań, którym była ocena wartości diagnostycznej i prognostycznej badanych zmian genetycznych w regionie 3p w niedrobnokomórkowym raku płuca. Cel planowała osiągnąć poprzez kilkietapową analizę istotnych z poznawczego punktu widzenia *Celów szczegółowych*, czyli badanie 1/ ekspresji genów FHIT i RAR β oraz immunoekspresji białka Fhit w tkance niedrobnokomórkowego raka płuca, 2/ jakościowej i ilościowej oceny stopnia metylacji regionów promotorowych genów FHIT i RAR β w tkance NDRP, 3/ zależności pomiędzy poziomem metylacji promotorowej badanych genów a poziomem ich ekspresji 4/ zależności pomiędzy poziomem ekspresji genów FHIT i RAR β oraz immunoekspresji białka Fhit oraz 5/ poziomem metylacji promotorowej FHIT i RAR β , a typem histopatologicznym NSCLC, stopniem jego zaawansowania (wg skal TNM, AJCC) oraz charakterystyką demograficzno-kliniczną chorych, określaną przez wiek, płeć oraz nikotynizm i liczbę paczkolet.

W rozdziale *Materiał i metody* Autorka prawidłowo przedstawiła charakterystykę 60 chorych od których pozyskano materiał tkankowy do badań. Biorąc pod uwagę znaczące zróżnicowanie morfologii badanych guzów nowotworowych (57% - rak płaskonabłonkowy, 35% - rak gruczołowy, 8% - rak wielkokomórkowy), jak również ich stopnia zaawansowania (20% - T1, 55% - T2, 25% - T3-4) moje wątpliwości budzi liczebność tak dobranej grupy. W opisie zastosowanych metod analizy statystycznej Autorka nie ujęła informacji, czy wykonano ocenę oczekiwanej wielkości próby, która jest konieczna dla oceny jej siły i wiarygodnego wnioskowania statystycznego. Poważnym uchybieniem jest również w moim odczuciu brak opisu procedury zabezpieczania materiału (świeżo mrożony?, formalina+parafina?, czas i

warunki utrwalania) niezwykle ważnej w kontekście badań nad RNA. Brak też kluczowej informacji, na jakiej podstawie dobierano tkankę kontrolną. Trudno mi uwierzyć, iż autorka oparła się jedynie na ocenie makroskopowej chirurga, choć jedynie taką informację znalazłam w charakterystyce materiałów. Konieczne byłoby oczywiście wykonanie mikroskopowej oceny histopatologicznej materiałów uznanych za prawidłowe.

W rozdziale *Materiał i metody* Autorka bardzo starannie i wyczerpująco omówiła też nowoczesne i różnorodne techniki laboratoryjne wykorzystane w realizacji projektu. Szeroki wachlarz zróżnicowanych, prawidłowo dobranych metod, począwszy od izolacji RNA i DNA, przez łańcuchową reakcję polimerazy analizowanej w czasie rzeczywistym, jakościową i ilościową ocenę metylacji regionów promotorowych badanych genów, aż po klasycznego reakcję immunoenzymatyczną, jest niewątpliwym atutem pracy. Prawidłowo zaprojektowane prace badawcze oraz dobrze dobrana metodologia realizowana na poziomie tkankowym, komórkowym i subkomórkowym niewątpliwie podnoszą wartość uzyskanych przez Doktorantkę wyników.

Autorka uzyskała interesujące z poznawczego punktu widzenia *Wyniki*, które przedstawiła w 12 tabelach i na 14 rycinach, w sposób jasny i zrozumiały.

W pierwszej części pracy Doktorantka porównała ekspresję genów *RAR β* i *FHIT* w tkance NSCLC oraz makroskopowo niezmienionej, wykazując iż w badanej serii materiałów była ona bardzo zróżnicowana i wysoce heterogenna. Autorka nie wykazała istotnego statystycznie zróżnicowania ekspresji genu *FHIT* oraz *RAR β* pomiędzy tkanką nowotworową, a kontrolną. Jednak w obu typach materiałów stwierdzono istotne różnice względem kalibratora, co wydaje się oczekiwane w kontekście historii palenia wśród większości badanych. Doktorantka wskazała natomiast na silne znamienne różnice w ekspresji genu *FHIT* pomiędzy wszystkimi podtypami histologicznymi guza, a dla genu *RAR β* jej osłabienie, istotnie różne pomiędzy niektórymi podtypami NDRP (rak płaskonabłonkowy vs gruczołowy). Nadekspresję *FHIT* najczęściej obserwowano w podtypie gruczołowym oraz istotnie częściej w całej grupie kobiet. Badania potwierdziły też znaczące rozbieżności wyników oznaczenia białka Fhit będącego produktem badanego genu, w poszczególnych typach histopatologicznych NSCLC, co implikuje między innymi jego małą wartość różnicującą.

W drugiej części pracy lekarz Anna Dutkowska dokonała oceny zjawiska metylacji regionów promotorowych, wykazując jego częstą frekwencję dla badanych genów *FHIT* i *RAR β* zarówno w tkance nowotworowej, jak i kontrolnej. Obecność przynajmniej jednego metylowanego

allelu *RAR β* obserwowano odpowiednio w 65% i 85%, a genu *FHIT* w 83% i 69% materiałów tkankowych. Znaczące, że w przypadku genu *RAR β* analiza testem Spearmana wykazała znamiennej statystycznie, umiarkowaną ($r=0,67$) dodatnią korelację poziomów metylacji w tkance nowotworowej i makroskopowo niezmienionej, co w mojej opinii jest zgodnie z aktualną wiedzą ze o silnym związku tego zjawiska z nałogiem palenia. Natomiast w poszczególnych podtypach histopatologicznych poziom metylacji promotorowej *RAR β* i *FHIT* nie różnił się istotnie. Nie wykazano również zależności związanej z płcią chorych, wiekiem, a także liczbą paczkolet oraz statusem palenia, co z kolei zaskakuje i może wynikać z niedostatecznej liczebności grupy. Autorka nie zaobserwowała również wzajemnych powiązań pomiędzy stopniem ekspresji, metylacji *FHIT* i immunoekspresji *Fhit* z ekspresją i metylacją promotorową *RAR β* .

Pracę podsumowuje ciekawa *Dyskusja* świadcząca o umiejętności właściwego wykorzystania i interpretacji wyników badań naukowych. Autorka oparła swoje rozważania na dobrze dobranym piśmiennictwie liczącym 110 aktualnych publikacji anglojęzycznych. W tej części pracy Doktorantka celnie przytacza dobrze dobrane przykłady sprzecznych danych publikacyjnych w badanym zakresie tematycznym, co podkreśla wysoki stopień złożoności analizowanego zagadnienia *per se*, jak również uwidacznia problemy związane z interpretacją porównawczą badań naukowych realizowanych za pomocą zróżnicowanych technik laboratoryjnych, zwłaszcza w tak niejednorodnych grupach chorych, jak ta stanowiąca przedmiot badań w niniejszej pracy. Na uznanie zasługuje zawarta w tym rozdziale rzetelna i dogłębna próba analizy czynników, w tym metodologicznych, które mogły wpłynąć na ostateczny kształt uzyskanych wyników, niekiedy tak odmiennych od obserwacji innych autorów i jak się domyślam wstępnej hipotezy badawczej Autorki. Nauka ma jednak to do siebie, że nie zawsze spełniają się oczekiwania badaczy, a prawdziwą sztuką jest wytrwałe poszukiwanie błędów we własnym rozumowaniu i protokole doświadczeń. Ten walor pracy zasługuje na podkreślenie.

Muszę natomiast zwrócić uwagę na mylne stosowanie przez Doktorantkę pojęć *markera predykcyjnego* i *markera prognostycznego*, często utożsamianych w niniejszej pracy z markerem diagnostycznym. *Ex definitione* biomarker predykcyjny określa potencjalną odpowiedź na/efektywność danej terapii, a nie stopień zaawansowania nowotworu (str. 69). Natomiast, biomarker prognostyczny charakteryzuje rokowanie co do przeżycia, niezależnie od stosowanej interwencji terapeutycznej, zwykle nie ma więc charakteru diagnostycznego,

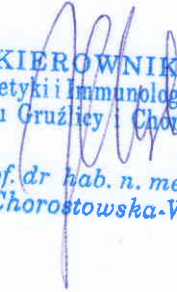
różnicującego tkankę zmienioną nowotworowo od prawidłowej, osobę chorą od zdrowej (str. 70). Zgodnie z akademicką interpretacją tej definicji do oceny faktycznej wartości prognostycznej markera konieczna jest więc jego analiza w kontekście danych dotyczących przeżycia w badanej grupie chorych. Z tego samego powodu mam wątpliwości czy sformułowane przez Autorkę wnioski (nr 2 i nr 4) odwołujące się do wartości prognostycznej badanych zmian genetycznych nie są zbyt daleko idące.

Mając świadomość wagi powyższych zastrzeżeń, uważam jednak, że co do zasady wnioski zostały przez Doktorantkę sformułowane jasno i zwięźle, w sześciu punktach, i odpowiadają celom pracy. Walorem jest zastosowanie tu trybu przypuszczającego, co jak się domyślam służy zaakcentowaniu, iż faktyczna wartość każdego postulowanego biomarkera wymaga weryfikacji, a zwłaszcza walidacji w niezależnych grupach chorych.

Reasumując, praca doktorska lekarz Agaty Dutkowskiej podejmuje istotny problem naukowy. Doktorantka precyzyjnie sformułowała cele badawcze, jak również trafnie dobrała metody badawcze. Wyniki przedstawiła w klarowny sposób. Na uwagę zasługuje dojrzała, krytyczna dyskusja. Chciałabym również wyrazić uznanie dla ładnej i starannej polszczyzny, którą posługuje się Autorka w opisowej części pracy. Jej lektura była prawdziwą przyjemnością. Strona edytorska pracy nie budzi zastrzeżeń.

Przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora nauk medycznych. Wnoszę więc do Wysockiej Rady o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa 19. października 2015r.


KIEROWNIK
Zakładu Genetyki i Immunologii Klinicznej
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc
Prof. dr hab. n. med.
Joanna Chorostowska-Wynimko