

II Katedra i Klinika Ginekologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Kierownik Kliniki: *Prof. dr hab. n. med. Tomasz Rechberger*

20-954 Lublin, ul. Jaczewskiego 8; Tel. +48/81 7244 686, Fax. +48/81 7244 849

Lublin 1/17/2015

Ocena dysertacji doktorskiej lek. med. Kingi Książakowskiej-Łakomej
p.t. „Wpływ mutacji mtDNA na system oksydacyjnej fosforylacji w procesie
powstawania raka błony śluzowej macicy” wykonanej w Klinice Chirurgii
Ginekologicznej ICZMP w Łodzi pod kierunkiem naukowym

Prof. dr hab. n. med. Jacka R. Wilczyńskiego

Rak błony śluzowej trzonu macicy jest, w chwili obecnej, jednym z najczęściej występujących nowotworów narządu rodnej kobiety na całym świecie. W Polsce, według Krajowej Bazy Danych Nowotworowych, odnotowano w 2012 roku 5426 nowych przypadków zachorowania na ten nowotwór, zaś ponad 1100 kobiet zmarło z powodu raka. Wzrost częstości wykrywania raka błony śluzowej trzonu macicy związany jest z wieloma czynnikami, wymienionymi przez Autorkę (strona 14) we wstępie dysertacji. Warty podkreślenia jest fakt występowania różnych (dwóch a przez niektórych Autorów opisywanych trzech) podtypów raka endometrium, opisanych, po raz pierwszy, na podstawie tylko badań klinicznych przez Bokhmana w roku 1983 (*Gynecol Oncol* 1983;15:10-17). Powstawanie raka endometrium jest procesem wieloetapowym, w którym znaczącą rolę odgrywają liczne zaburzenia nie tylko w onkogenach (np. *K-ras*), ale także w genach supresorowych (np. *TP53*) oraz w genach systemu naprawy DNA (np. *hMLH1*). W ostatnich latach zwraca się także szczególną uwagę na badania wrodzonych oraz somatycznych mutacji oraz polimorfizmy w mitochondrialnym DNA (mtDNA), które

mogą predysponować nie tylko do powstawania ale także do progresji procesu nowotworowego w obrębie ludzkiego endometrium. Jednymi z badanych genów są *MT-CO1* i *MT-CO3*, które kodują podjednostki enzymu oksydazy cytochromu c stanowiące rdzeń kompleksu IV, jednej ze składowych łańcucha oddechowego. Jak pisze Autorka na stronie 35 dysertacji „zarówno mutacje, jak i polimorfizmy genów *MT-CO* mogą zaburzać składanie kompleksu oksydazy cytochromu c, przyczyniając się do uszkodzenia łańcucha oddechowego oraz zaburzeń metabolicznych komórki.” Badania zaburzeń genów *MT-CO* w stanów przednowotworowych jak również w raku endometrium są nieliczne (strony 37-39), wskazując na powiązanie mutacji *MT-CO1/MT-CO3* ze wzrostem produkcji ROS oraz z nad-produkcją enzymów antyoksydacyjnych. W związku z powyższym, zaproponowany temat dysertacji doktorskiej wydaje się bardzo interesujący, wpisując się w problematykę badań zaburzeń mtDNA w nowotworach narządu rodowego kobiety, w tym w raku endometrium.

W przedstawionej mi do oceny dysertacji doktorskiej lekarz medycyny Kinga Książakowska-Łakoma podjęła się trudu badań nad znaczeniem wybranych mutacji i polimorfizmów genów *MT-CO1* i *MT-CO3* u 100 pacjentek leczonych operacyjnie z powodu pierwotnego gruczolakoraka błony śluzowej trzonu macicy. Dokonała także oceny zależności pomiędzy stwierdzanymi zaburzeniami genetycznymi a częstością występowania nowotworu endometrium, kliniczno-prognostycznymi wykładnikami zaawansowania raka jak również oceną wartości prognostycznej wykrytych zmian.

Przedstawiony do recenzji manuskrypt składa się z 127 stron starannie przygotowanego wydruku komputerowego z szeregiem tabel, wykresów oraz kolorowych rycin. Poniżej pozwolę sobie, w skróconej formie, poddać analizie treść recenzowanej dysertacji doktorskiej.

Na początku pracy, Autorka przedstawiła spis zastosowanych w pracy skrótów, tłumacząc je w oryginalnej pisowni. Oceniana dysertacja odbiega od standardów prac, albowiem na wstępie Autorka zaprezentowała polskie i angielskie streszczenia. Pozwoliło

to Recenzentowi zapoznać się z materiałem oraz metodyką pracy, jak również przeanalizować, w formie skróconej, wyniki i wnioski doktoratu.

We wstępie dysertacji, szczegółowo i ze znanstwem Autorka omówiła epidemiologię, ocenę histopatologiczną oraz szczegółową klasyfikację (według TNM strona 20 oraz najnowszą klasyfikację FIGO z roku 2009 na stronie 21) raka endometrium. Bardzo dokładnie przedstawiła strukturę i funkcję mitochondriów, ze zwróceniem szczególnej uwagi na budowę łańcucha oddechowego oraz przebieg oksydacyjnej fosforylacji. Prezentacja genomu mitochondrialnego, ubarwionego bardzo ładnymi, kolorowymi rysunkami (np. rysunek 3 na stronie 31), wprowadza Czytelnika w badane zagadnienie. Podrozdział p.t. „Zaburzenia genomu mitochondrialnego w procesie karcinogenezy” może zostać opublikowany jako praca pogładowa w czasopiśmie z „listy filadelfijskiej”. Biorąc pod uwagę fakt iż „... dotychczas ukazało się niewiele publikacji poświęconych wpływowi mutacji genów *MT-CO* na system fosforylacji oksydacyjnej w rozwoju raka endometrium..(strona 37), zaproponowany temat dysertacji jest nowatorski. W wstępie Autorka nie ustrzegła się nielicznych błędów (np. nadekspresja genu *Bcl-2*, czy produktu białkowego genu?), które wymagają korekty przed wysłaniem pracy do druku.

Celem pracy była ocena danych klinicznych oraz anatomopatologicznych 100 kobiet operowanych z powodu gruczolakoraka błony śluzowej trzonu macicy w Klinice Chirurgii Ginekologicznej/Klinice Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej ICZMP w Łodzi w latach 2007-2014. Poddano analizie mutacje oraz warianty wykrytych podczas analizy fragmentów genów *MT-CO1* i *MT-CO3* w grupie badanej oraz w grupie kontrolne (n=25, pacjentki z rozrostami endometrium bez atypii komórkowej). Uzyskane dane molekularne porównano z częstością występowania oraz danymi kliniczno-anatomopatologicznymi nowotworów endometrium jak również odniesiono do przeżycia kobiet.

Grupa badana obejmowała 100 skrawków uzyskanych od chorych z rozpoznaniem rakiem endometrioidalnym błony śluzowej trzonu macicy w różnym stopniu zaawansowania według FIGO (IA-IVA) i o różnym stopniu złośliwości (G1-G3). Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji do Spraw Etyki Badań Naukowych ICZMP

w Łodzi nr 3/2011 z dnia 9.3.2011 r (strona 127). Szczegółowo Doktorantka opisała procedury izolacji DNA, PCR z podaniem sekwencji użytych starterów, oraz sekwencjonowaniem produktów amplifikacji. Dodatkowo przykładowy wynik wykrytej mutacji T9450C w genie *MT-CO3* zaprezentowano na rysunku 6. Recenzent nie znalazł informacji gdzie Doktorantka wykonywała badania molekularne (Katedra, Zakład); myślę ponadto, iż dobrze jest przedstawić nazwy Producentów stosowanych odczynników – w niektórych czasopismach jest to wymagane. Analiza statystyczna uzyskanych wyników została przeprowadzona prawidłowo, stosując ogólnie przyjęte testy.

Rozbudowane wyniki – prezentowane na 48 stronach wydruku komputerowego – pozwalają na szczegółowe zapoznanie się z badanymi cechami. Charakterystyka populacji przedstawiona jest w postaci tabel oraz kolorowych, kołowych wykresów (bardzo ładna prezentacja wyników). Dokonano bardzo dokładnego porównania cech klinicznych pacjentek z obu badanych grupach, stwierdzając różnice w wieku chorych (strona 52), wieku wystąpienia ostatniej miesiączki (strona 54), BMI (strona 55), obecności/niewystępowania nadciśnienia tętniczego (strona 59), oraz palenia papierosów (tytoniu) (strona 61). Grupa badana została dobrana prawidłowo, o czym świadczą istotne statystycznie różnice przeżywalności kobiet w zależności oraz stopnia histologicznego zaawansowania zmiany czy klasyfikacji FIGO. W modelu proporcjonalnego hazardu Coxa, tylko współczynnik BMI oraz stopień zaawansowania schorzenia według FIGO były niezależnymi czynnikami prognostycznymi (Tabela 32, strona 75). W przeprowadzonych badaniach molekularnych, wykryto mutację synegistyczną T9540C w genie *MT-CO3* u 69-letniej kobiety z wysokozróżnicowanym nowotworem błony śluzowej trzonu macicy w stopniu IA według FIGO. W pracy zaprezentowano szereg kolorowych rysunków (strony 83-86) z wykrytymi mutacjami/polimorfizmami w genach *MT-CO1/MT-CO3*. Warto w tym miejscu podkreślić (strona 90), iż „...pozostałych pięć zmian zostało opisanych po raz pierwszy w niniejszej pracy doktorskiej”, co świadczy o **nowatorskim** charakterze prezentowanych danych.

W dyskusji, na 9 stronach dysertacji, Autorka szczegółowo przeanalizowała dane kliniczne i anatomopatologiczne badanej populacji kobiet, odnosząc uzyskane wyniki do

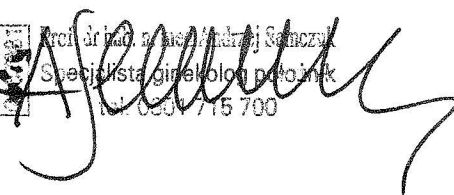
przeżycia badanej grupy stosując metodę Kaplan-Meiera i test log-rank. Wykazano iż BMI oraz stopień zaawansowania raka według najnowszej klasyfikacji FIGO są niezależnymi czynnikami prognostycznymi w badanej grupie pacjentek z rakiem endometrioidalnym. Wykryto, oprócz mutacji germinalnej T9540C w genie *MT-CO3*, liczne warianty w badanych genach, które obecne były tak w grupie badanej (10%), jak i w grupie kontrolnej (8%). Autorka w sposób szczegółowy przeanalizowała częstość występowanie wariantów badanych genów w różnych nowotworach u człowieka, jednakże nie wykonała analizy statystycznej ze względu na ograniczoną częstość wykrycia powyższych zmian w badanych grupach.

Wnioski z niniejszej dysertacji, w formie opisowej (strony 101-103), wskazują na występowanie wariantów genów *MT-CO1* i *MT-CO3* w badanej populacji pacjentek operowanych z powodu raka endometrium. W prezentowanej pracy zawarta jest ocena danych klinicznych jako czynników predysponujących do zachorowania na raka błony śluzowej trzonu macicy. W świetle danych, bardzo ciekawy jest wniosek 3 ze strony 103, w którym Autorka stwierdziła iż „... kobiety z nadwagą żyją dłużej niż kobiety z prawidłową masą ciała..”. W opinii Recenzenta, wniosek ten wymaga wyjaśnienia w dysertacji.

Spis piśmiennictwa (strony 104-122), wykaz tabel (strony 122-124), wykaz wykresów (strony 124-125), wykaz rycin (strony 125-126) oraz kserokopia Komisji Etyki Badań Naukowych ICZMP w Łodzi (strona 127) znajdują się na końcu dysertacji. Bardzo bogata i starannie przygotowana bibliografia, w liczbie 220 pozycji literatury, ułożona jest według kolejności cytacji danej pracy w dysertacji. Recenzent zwrócił uwagę na cytacje prac pochodzących z Instytutu Genetyki i Biotechnologii Uniwersytetu Warszawskiego z którym współpracował.

Podsumowując, dysertacja lek. med. Kingi Książkowskiej-Łakomej p.t. „Wpływ mutacji mtDNA na system oksydacyjnej fosforylacji w procesie powstawania raka błony śluzowej macicy” jest bardzo starannie przygotowanym i zredagowanym opracowaniem badającym wybrane czynniki kliniczno-anatomopatologiczne oraz zaburzenia w genach *MT-CO1* i *MT-CO3* w starannie wyselekcjonowanej grupie kobiet operowanych z

powodu raka błony śluzowej trzonu macicy. Uzyskane dane wskazują na występowanie, w ograniczonym zakresie, wariantów badanych genów tak w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej. Autorka stwierdziła iż „... obecność zmian w genach *MT-CO1* i *MT-CO3*, charakterystycznych dla innych typów nowotworów, nie jest czynnikiem ryzyka dla raka endometrium..”. Wartość BMI oraz stopień zaawansowania raka według FIGO są niezależnymi czynnikami prognostycznymi. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki oraz ich prezentację oraz nowatorski charakter części uzyskanych danych wnoszę do Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. med. Kingi Książakowskiej-Łakomej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wyróżnienie pracy nagrodą będzie odzwierciedleniem bardzo wysokiego poziomu merytorycznego prezentowanych danych, jak również ich nowatorskiego charakteru. Recenzent ma także nadzieję na publikację w najbliższej przyszłości wyników badań w czasopiśmie naukowym z „listy filadelfijskiej” np. w Mitochondrion (IF=3.249).


Prof. dr hab. n. med. Kinga Książakowska-Łakomej
Specjalista ginekologii położnictwa
tel. 0201 715 700