

dr hab. n. farm. prof. UM Ewa Balcerczak

Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki

Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej

Międzywydziałowa Katedra

Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek med. Kingi Księżakowskiej-Łakomej pt. „Wpływ mutacji mtDNA na system oksydacyjnej fosforylacji w procesie powstawania raka błony śluzowej macicy” na stopień doktora nauk medycznych.

Praca doktorska Pani Kingi Księżakowskiej-Łakomej jest 126 stronicowym opracowaniem, składającym się z trzech głównych części: pierwszej-teoretycznej zawierającej streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wstęp, części drugiej-praktycznej w której umieszczono cel pracy, materiał i metodykę, wyniki, dyskusję, wnioski. Trzecią część pracy stanowi piśmiennictwo obejmujące 220 pozycji, w tym 72 publikacje z ostatnich 10 lat. Do pracy został dołączony wykaz tabel i wykresów.

Przedstawiona do recenzji praca poświęcona jest: ocenie wybranych mutacji A5935G, G5949A, G6081A, G6267A w genie *MT-CO1* oraz mutacji T9540C genu *MT-CO3* w grupie chorych na raka endometrium oraz w grupie kontrolnej, poszukiwaniu zależności pomiędzy ocenionymi zmianami molekularnymi a cechami klinicznymi charakteryzującymi przypadki składające się na grupę badaną oraz ocenie wartości rokowniczej wykrytych wariantów allelicznych w badanych genach.

Wstęp pracy poświęcony jest omówieniu raka endometrium z uwzględnieniem epidemiologii oraz charakterystyki histologicznej i klinicznej tego nowotworu. W kolejnych podrozdziałach wstępu autorka omówiła budowę i funkcje mitochondriów oraz ich udział w powstawaniu nowotworów. Następnie został scharakteryzowany genom mitochondrialny, z uwzględnieniem genów badanych w pracy. Dość zaskakująco dla czytelnika pojawia się we wstępie rozdział „Haplogrupy” rozdzielający podrozdział poświęcony genom *MT-CO* od rozdziału w którym zostały omówione zaburzenia w genomie mitochondrialnym jakie opisano dotychczas w nowotworzeniu. Podrozdział „Haplogrupy” powinien zostać zamieszczony w innym miejscu.

Na koniec wstępu autorka omawia mutacje i polimorfizmy genów *MT-CO* opisane w raku endometrium oraz innych nowotworach. Autorka nie ustrzegła się w tej części drobnych błędów na przykład na stronie 34 rozdziału „Warianty genów *MT-CO* w komórkach nowotworowych” (którego tytuł powinien być przeredagowany) znajdujemy zdanie „Badacze, sekwencjonując region D-loop oraz (...) ,zaobserwowali występowanie licznych mutacji somatycznych w mtDNA grupy badanej” bez informacji o jaką grupę chodzi. Z piśmiennictwa dowiadujemy się że były to raki endometrium, którym poświęcony jest kolejny podrozdział wstępu.

Z poczucia obowiązku muszę zwrócić uwagę że we wstępie nie znajdujemy informacji o opisanych dotychczas zmianach/zaburzeniach molekularnych w raku endometrium. Informacje takie obok charakterystyki histologicznej i klinicznej zawartej w dysertacji w istotny sposób przybliżyłyby obecny stan wiedzy na temat molekularnych zmian towarzyszących rakowi endometrium i ułatwiłyby realizację celów pracy którymi była ocena wartości rokowniczej i prognostycznej badanych w pracy mutacji/polimorfizmów.

Część doświadczalna pracy obejmuje 51 stron. Doktorantka przeprowadziła badania na dwóch grupach: badanej obejmującej 100 przypadków raka endometrium przechowywanego w postaci bloczków parafinowych oraz kontrolnej obejmującej 25 przypadków rozrostów endometrium bez atypii również utrwalonych w parafinie. Brak w tym miejscu szczegółowej charakterystyki obu grup, dane takie znajdujemy dopiero w dalszej części pracy w rozdziale Wyniki.

Należy podkreślić że Doktorantce, udało się zgromadzić i wybrać dla potrzeb pracy ciekawy materiał składający się na grupę badaną.

W części poświęconej metodyce w sposób dość lakoniczny scharakteryzowano poszczególne metody które posłużyły do uzyskania wyników. Jest to szczególnie widoczne w opisie procedury izolowania DNA.

Rycina 5 którą znajdujemy w części metodycznej, obrazujący produkty reakcji PCR uwidocznione podczas elektroforezy, powinna znaleźć się w części wyniki (nie podano oczekiwanych wielkości produktów), to samo dotyczy Ryciny numer 6.

Na stronie 41 autorka napisała że „wyizolowane z badanego materiału mtDNA zostało poddane łańcuchowej reakcji polimerazy (...) z wykorzystaniem dwóch starterów dla genu *MT-CO1* i *MT-CO3*”. Używamy par starterów, wydaje się że jest to przejęzyczenie Doktorantki gdyż poniżej znajdujemy sekwencje właśnie dla par starterów potrzebnych do amplifikacji genów, a nie pojedynczych starterów.

Informacje zamieszczone na stronie 42 i 43 w części metodycznej powinny znaleźć się we wstępie, nie są to bowiem opisy metod służących do oceny wybranych mutacji/polimorfizmów ale charakterystyka polimorfizmów i ich wpływu na białkowe produkty w wybranych nowotworach.

W dalszej części rozdziału „Materiały i Metody” omówione zostało sekwencjonowanie, nie znajdujemy opisu procedur oczyszczania produktu reakcji PCR przed i po sekwencjonowaniu oraz składu mieszaniny reakcyjnej dla PCR sekwencyjnego (brak stężeń i użytych objętości).

Wyniki uzyskane w recenzowanej pracy zostały udokumentowane w postaci 35 tabel, 23 wykresów oraz rycin przedstawiających: analizy statystyczne, wpływ analizowanych parametrów klinicznopatologicznych na czasy przeżycia oraz obrazy uzyskane podczas sekwencjonowania. Przedstawiona dokumentacja przekonuje, że wszystkie analizy i doświadczenia przeprowadzone zostały właściwie. Sposób prezentacji wyników pozwala śledzić postępy pracy i podjęte próby realizacji jej kolejnych celów. Nie zakłócają tego drobne edytorskie niedociągnięcia. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę że na stronie 82 gdzie scharakteryzowano mutacje synonimiczne, nie zamieszczono wyjaśnienia jakie jest znaczenie tych mutacji, bowiem mutacja „cicha” (milcząca) może mieć wpływ na białko pomimo, że nie zmienia jego składu aminokwasowego.

Dyskusja stanowi wartościowy element recenzowanej pracy. Doktorantka przedstawiła przekonujące omówienie wyników wpływających z własnych badań w porównaniu z danymi dostępnymi w cytowanych publikacjach.

Badania Doktorantki potwierdziły obecność mutacji w pozycji 9540 w genie *MT-CO3* tylko u jednej pacjentki z grupy badanej, w żadnym z przypadków grupy badanej nie wykryto obecności allele zmutowanego dla badanych mutacji w pozycjach 5935, 5949, 6081 oraz 6267 genu *MT-CO1*. Interesujące jest zaobserwowanie przez Doktorantkę podczas sekwencjonowania, w obszarach sąsiadujących z ocenianymi pozycjami, pięciu nowych zmian dotychczas nie opisywanych w piśmiennictwie, które być może są charakterystyczne dla raka endometrium. Ze względu na niską częstość występowania wybranych do badania mutacji nie udało się wykonać analiz porównawczych pomiędzy grupą badaną i kontrolną. W dalszych badaniach (wg recenzenta) liczebność tej ostatniej powinna zostać zwiększona.

Autorka podjęła także próbę oceny wpływu wybranych parametrów klinicznopatologicznych w grupie badanej na czas przeżycia, potwierdzając swoimi wynikami dotychczasowe dane z piśmiennictwa.

Podsumowując chciałabym podkreślić, że dysertacja przedstawiona do recenzji jest interesująca i spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim. Została przygotowana w sposób właściwy, a pojedyncze błędy nie wpływają na jej ostateczną, pozytywną ocenę. Praca wnosi nowe informacje do dotychczasowego stanu wiedzy i otwiera nowe możliwości badawcze.

Wyniki ujęte w pracy nie zostały dotychczas upublicznione. Doktorantka jest pierwszym autorem 3 prac poglądowych oraz współautorką 2 publikacji które nie wchodzą w zakres pracy doktorskiej i 1 publikacji stanowiącej opis przypadku.

Zwracam się przeto z wnioskiem do Rady Wydziału Wojskowo –Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy doktorskiej lek med. Kingi Książakowskiej- Łakomej i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Medycyńskiej Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Mikrobiologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Ewa Balcerzak
dr hab. n. farm. prof. nadzw. Ewa Balcerzak