

Ocena
rozprawy doktorskiej mgr Bartosza Muchy na stopień doktora nauk medycznych
pt.: "Związek naprawy DNA z polimorfizmem genów HRR i NHEJ u pacjentów z
rakiem jelita grubego".

Rak jelita grubego to trzeci najczęściej występujący nowotwór u mężczyzn i drugi u kobiet. Prawie 60% zachorowań występuje w krajach rozwiniętych. Od 1980 roku obserwuje się prawie 4 – krotny wzrost liczby zachorowań u mężczyzn i około 3 – krotny u kobiet. Ryzyko zachorowania na raka jelita grubego istotnie wzrasta wraz z wiekiem. Po 60 roku życia obserwuje się także większe ryzyko zgonów z powodu tego nowotworu.

Etiopatogeneza raka jelita grubego jest bardzo złożona, wieloczynnikowa i nie do końca jasna. Odgrywają tu rolę zarówno czynniki genetyczne, epigenetyczne, jak i środowiskowe. Wyniki badań molekularnych nad nowotworem wskazują, że w procesie jego powstawania zaangażowanych jest kilka szlaków sygnałowych.

Aktualnie wiadomo, że rak jelita grubego to nowotwór bardzo heterogenny, dlatego też konieczne jest poznanie szlaków molekularnych odgrywających istotną rolę w transformacji nowotworowej. Prawidłowa naprawa DNA zapewnia utrzymanie integralności genomu i pełni kluczową funkcję w jego ochronie przed działaniem czynników rakotwórczych, z kolei zaburzenia naprawy poreplikacyjnej błędnie sparowanych zasad prowadzą do niestabilności genomowej i mogą mieć znaczący wpływ na proces kancerogenezy. Zestaw alleli genów kodujących białka może określać indywidualne zdolności usuwania uszkodzeń DNA, dlatego też bardzo istotne jest poznanie wariantów polimorficznych genów związanych z naprawą DNA.

Jednym z możliwych mechanizmów jest naprawa przez rekombinację, która umożliwia usuwanie wielu poważnych uszkodzeń DNA, głównie pęknięć dwuniciowych – rekombinacja homologiczna (HRR) oraz rekombinacja niehomologiczna (NHEJ), ponadto można wyróżnić system łączący cechy HRR i NHEJ.

Mimo znacznego postępu w poznaniu mechanizmów naprawy DNA jaki dokonał się w ostatnich latach, w dalszym ciągu jest to przedmiot wielu badań. Wiedza o tych procesach niewątpliwie pozwoli w przyszłości na skuteczniejsze zapobieganie m.in. chorobom nowotworowym, a także umożliwi opracowanie nowych terapii przeciwnowotworowych, a przede wszystkim inhibitorów enzymów naprawy, które odpowiadają za oporność w leczeniu onkologicznym.

W ten interesujący nurt badań wpisuje się tematyka badawcza podjęta przez mgr Bartosza Muchę.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska ma układ klasyczny, otwiera „Wstęp”, w którym Doktorant przedstawia epidemiologię raka jelita grubego. Podkreśla, że rak jelita grubego jest jedną z wiodących chorób nowotworowych na świecie zarówno pod względem zachorowalności, jak i śmiertelności zwłaszcza w krajach wysokorozwiniętych. Następnie Autor rozprawy charakteryzuje czynniki ryzyka tej choroby, wskazuje że podstawowym

czynnikiem ryzyka jest wiek, charakteryzuje tzw. modyfikowalne i niemodyfikowalne czynniki ryzyka.

W kolejnym podrozdziale Doktorant opisuje podłoże molekularne raka jelita grubego, zaznacza, że jest to choroba heterogenna, opisuje główne szlaki molekularne prowadzące do utraty integralności genomu w rozwoju tego nowotworu, takie jak: niestabilność chromosomowa, niestabilność mikrosatelitarna oraz prowadząca do wyłączenia genów supresorowych globalna hipermetylacja genomu, określana także jako fenotyp metylatorowy wysp CpG.

Następny podrozdział dotyczy szczegółowej charakterystyki uszkodzeń dwuniciowego DNA. Doktorant wskazuje na egzogenne i endogenne źródła pęknięć dwuniciowych DNA, określa częstość występowania tych pęknięć oraz szczegółowo wskazuje na możliwości ich naprawy.

W podsumowaniu tej części pracy należy stwierdzić, że jest ona napisana w sposób niezwykle rzeczowy i przemyślany, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy w tym zakresie.

W kolejnym rozdziale Doktorant formułuje „Cel pracy”. Artur rozprawy przedstawia cztery szczegółowe cele, a mianowicie celem badań była:

- analiza rozkładu polimorfizmu i częstości występowania alleli genów mechanizmu naprawy pęknięć dwuniciowych DNA: RAD 51, XRCC 3, XRCC 4 oraz XRCC 6 w grupie pacjentów z rakiem jelita grubego oraz w grupie kontrolnej osób bez nowotworów,
- analiza związku badanych polimorfizmów z funkcjonalną aktywnością promotorów genów RAD 51, XRCC 3, XRCC 4 oraz XRCCR mechanizmu naprawy pęknięć dwuniciowych DNA w grupie pacjentów z rakiem jelita grubego oraz w grupie kontrolnej osób bez nowotworów.
- analiza efektywności naprawy uszkodzeń DNA przez rekombinację homologiczną – HRR oraz niehomologiczne łączenie końców – NHEJ u pacjentów z rakiem jelita grubego oraz w grupie kontrolnej bez nowotworów,
- ocena możliwości zastosowania uzyskanych wyników w kierunku diagnostyki ryzyka i/lub progresji raka jelita grubego.

Należy stwierdzić, że Doktorant bardzo szczegółowo określił wytyczone zadania badawcze, podjął także próbę oceny możliwości zastosowania uzyskanych wyników w praktyce klinicznej.

W rozdziale „Materiał i Metody” Doktorant charakteryzuje materiał badawczy, a mianowicie: DNA do genotypowania pozyskano z krwi obwodowej osób włączonych do badań, grupę badaną stanowiło 200 chorych z histopatologicznie rozpoznany rakiem jelita grubego. Pacjenci byli hospitalizowani w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. WAM w Łodzi. Stopień zaawansowania nowotworu został opisany w oparciu o system TNM, a następnie na jego podstawie dokonano stopniowania stanu klinicznego. Grupę kontrolną stanowiło 209 osób bez rozpoznanej choroby nowotworowej. Głównym kryterium włączenia do grupy kontrolnej, poza rozpoznaniem raka, był brak historii rodzinnej raka w linii prostej oraz do drugiego stopnia linii bocznej. Spośród grupy badanej oraz kontrolnej wytypowano po 3 osoby z każdej z nich, gdzie część materiału została zużyta do izolacji limfocytów w celu przeprowadzenia eksperymentów mających na celu ocenę efektywności działania systemów napraw pęknięć dwuniciowych DNA przez NHEJ oraz HRR. W eksperymentach użyto dwóch linii komórkowych pozyskanych komercyjnie (HT – 29, CCD 841 CoN). W procedurach związanych z przygotowaniem konstruktów plazmoidowych użyto pozyskanych komercyjnie bakteryjnych komórek kompetentnych *Escherichia coli*. W

procedurach eksperymentalnych zastosowano pięć plazmidów pozyskanych komercyjnie.

Doktorant szczegółowo opisuje metody badawcze zastosowane w pracy, a mianowicie izolację limfocytów, prowadzenie hodowli komórkowych i bakteryjnych. Opisuje transformację komórek kompetentnych *E. coli* metodą szoku cieplnego, transfekcję hodowli komórkowych, transfekcję metodą elektroporacji, izolację DNA (genomowego/plazmidowego), elucję DNA z żelu agarozowego oraz genotypowanie, test TAK oraz analizę regionu promotorowego.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, w której dobór zastosowanych narzędzi badawczych znacząco podnosi wartość rozprawy.

Należy zwrócić uwagę, że wszystkie procedury z użyciem materiału od pacjentów zostały przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej (RNN/784/12/KB)

W podsumowaniu tej części rozprawy należy stwierdzić, że zarówno materiał badawczy, jak i zastosowane metody zostały opisane w sposób wyczerpujący i bardzo szczegółowy. Zastosowane kryteria włączenia do poszczególnych grup są odpowiednie i zgodne z założonymi zadaniami badawczymi. Należy podkreślić, że użyty do ewaluacji efektywności pęknięć dwuniciowych test TAK jest procedurą rozbudowaną i wieloetapową. Zastosowanie tego typu metodologii potwierdza doskonały warsztat Doktoranta w zakresie inżynierii genetycznej i biologii molekularnej.

Uzyskane wyniki zostały podsumowane w postaci 24 tabel oraz 7 rycin, z adekwatnym komentarzem zgodnie z charakterem tego opracowania. Wyniki poddano analizie statystycznej, w której dobór zastosowanych narzędzi badawczych znacząco podnosi wartość rozprawy.

Bardzo dobre wrażenie sprawia rozdział „Dyskusja”, która wskazuje na dobrą znajomość przedmiotu i dojrzałość naukową Doktoranta. Należy podkreślić, że Doktorant krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników, ponadto przedstawia projekt dalszych badań, co świadczy o jego dużym zaangażowaniu w rozwiązanie tego tematu badawczego.

Przedstawione w rozprawie wyniki pozwoliły Doktorantowi na wyciągnięcie trzech wniosków, które w pełni odpowiadają na zadania badawcze postawione w celu pracy. Na uwagę zasługuje stwierdzenie przez Doktoranta, że badane zmienności genetyczne mogą posłużyć w przyszłości do oceny ryzyka wystąpienia raka jelita grubego w kontekście wczesnej prewencji tej choroby nowotworowej.

Cytowane piśmiennictwo obejmuje 541 pozycji, w większości z ostatnich kilku lat.

Doktorant umieścił w pracy streszczenie w języku polskim i angielskim.

Podsumowując, prezentowana przez Pana mgr Bartosza Muchę praca jest dobrze zaplanowana i wykonana. Z obowiązku recenzenta, chcę zwrócić uwagę na kilka drobnych uwag, a mianowicie: brak umieszczenia rozdziału 3.2.12 w spisie treści (opis testów statystycznych), brak wyjaśnienia użycia różnych technik, metod genotypowania dla różnych genów, sondy TaqMan oraz RFLP-PCR, ponadto wiadomo, że polimorfizm pojedynczego nukleotydu jest najczęściej występującym rodzajem wariacji genetycznej. W pracy jednoznacznie nie wyjaśniono jakie zostały przyjęte kryteria wyboru konkretnych polimorfizmów do genotypowania.

Reasumując, wyniki badań uzyskane przez Doktoranta zasługują na miano oryginalnych, nowatorskich, o istotnym znaczeniu naukowym i klinicznym. Praca zwraca uwagę na istotny problem w onkologii klinicznej, zwłaszcza w kontekście starzenia się demograficznego.

Serdecznie gratuluje Autorowi rozprawy oraz Promotorowi wyboru niezwykle ważnego problemu badawczego.

Forma edytorska nie budzi zastrzeżeń, choć nieliczne błędy redakcyjne uszły uwadze Doktoranta.

Rozprawę doktorską magistra Bartosza Muchy oceniam w pełni pozytywnie. Doktorant wykazał się dużą wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością samodzielnego rozwiązania problemu badawczego. Rozprawa spełnia aktualnie obowiązujące warunki ustawowe, jakim powinno odpowiadać rozprawa doktorska.

W oparciu o przedstawioną opinię mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie magistra Bartosza Muchy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na duże walory poznawcze i możliwości wdrożeniowe oraz nowatorski charakter rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

Łódź, 12.04.2017 r.



prof. dr hab. n. med Józef Kędziora