

KIEROWNIK
Poradni Chorób Płuc i Gruźlicy,
Poradni Chorób Płuc i Gruźlicy dla Dzieci

Prof. dr hab. n. med. Jerzy Kozielski

Katowice 5.luty 2024

Zespół Wojewódzkich Przychodni Specjalistycznych
w Katowicach
PORADNIA CHOROÓB PŁUC I GRUŻLICY
40-038 Katowice, ul. Lompy 16
tel. 32 255-11-65, REGON: 001100382
Cz. I kr-00000013818, Cz. V kr.-01, Cz. VII kr.-005
Cz. VIII kr.-1270 121/100210

Recenzja rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne, mgr Michaliny Kryszczuk pt.: „Ocena statusu mutacyjnego genów układu NRF2-KEAP1 u chorych na operacyjnego niedrobnokomórkowego raka płuca z regionu północno-wschodniej Polski.”

Celem przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej była ocena statusu mutacyjnego genów NFE2L2 oraz KEAP1 u chorych na operacyjnego niedrobnokomórkowego raka płuca. Kodowane przez wyżej wymienione geny białka odgrywają kluczową rolę w przeciwdziałaniu komórki na stres komórkowy, spowodowany zaburzeniem równowagi pomiędzy czynnikami oksydacyjnymi i antyoksydantami. Stres oksydacyjny występuje w wielu stanach patologicznych, między innymi w stanach zapalnych oraz w nowotworach różnych typów, a również podczas terapii przeciwnowotworowych. Konsekwencjami stresu oksydacyjnego są różnorodne uszkodzenia makrocząsteczek oraz struktur komórkowych, które mogą okazać się dla komórki letalnymi. W procesie ewolucji zostały wykształcone mechanizmy, pozwalające na przetrwanie tego rodzaju niebezpieczeństwa. Kluczową rolę w przetrwaniu odgrywa czynnik transkrypcyjny NRF2, który z kolei aktywuje ekspresję wielu komórkowych układów antyoksydacyjnych, umożliwiając w ten sposób powrót do stanu równowagi pomiędzy oksydantami i antyoksydantami. W warunkach fizjologicznych aktywacja czynnika NRF2 jest przejściowa i precyzyjnie regulowana na drodze różnorodnych mechanizmów molekularnych. Kluczową rolę w regulacji odgrywa białko KEAP1, które jest głównym negatywnym regulatorem NRF2.

Ważną właściwością komórek nowotworowych jest zdolność do przetrwania stresu oksydacyjnego, w tym spowodowanego terapią przeciwnowotworową. Właściwość ta wynika z trwałej aktywacji różnorodnych reakcji antyoksydacyjnych. Zgodnie z danymi piśmiennictwa

światowego w wielu przypadkach aktywacja całego układu jest spowodowana stabilizacją białka NRF2 i wynikającym z tego wysokim poziomem ekspresji genów czynników antyoksydacyjnych. Z kolei za stabilizację NRF2 najczęściej odpowiadają swoiste mutacje aktywujące w genie białka oraz mutacje inaktywujące jego główny negatywny regulator KEAP1.

Ze względu na istotną rolę stresu oksydacyjnego w różnych procesach patologicznych zarówno procesy komórkowe odpowiedzi na stres, jak i mechanizmy zaburzające prawidłową odpowiedź są bardzo intensywnie badane, również w nowotworach. Wynikiem tych badań są liczne publikacje oraz prace nad tworzeniem nowych leków o działaniu nacelowanym na kluczowe składniki tych procesów. W związku z powyższym analiza związanych z tematem źródeł literaturowych stanowi duże wyzwanie. Podobnie dane, dotyczące udziału poszczególnych mutacji lub zmian epigenetycznych w aktywacji NRF2 w nowotworach są niejednoznaczne i różnią się w zależności od typu nowotworu, stopnia zaawansowania choroby, populacji chorych i innych czynników. Nieuchronnie prowadzi to do konieczności dalszych prac w kierunku oceny statusu mechanizmów antyoksydacyjnych w nowotworach.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 65 stron oraz zawiera 191 pozycji piśmiennictwa, które dobrane jest w sposób prawidłowy oraz została podzielona na typowe dla dysertacji rozdziały: wstęp, cel i założenia pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, suplement, piśmiennictwo wykaz tabel i rycin.

W niniejszej pracy została przeprowadzona ocena częstości występowania aktywujących czynnik transkrypcyjny NRF2 mutacji w operacyjnym niedrobnokomórkowym raku płuca u chorych z regionu Podlaskiego. Taki wybór pacjentów sprzyja otrzymaniu bardziej jednorodnej grupy chorych ze względu na podobne środowiskowe warunki zamieszania, mające istotne znaczenie w stresie oksydacyjnym.

Badana grupa obejmowała tylko przypadki operacyjne - tkanka guza do badań pobrana w czasie zabiegu radykalnego usunięcia guza u chorych w stadium zaawansowania choroby I-III A. Umożliwiło to wykorzystanie do izolacji DNA świeżo zamrożonych wycinków guza, zamiast tkanek FFPE. Wybór materiału w badaniu był bardzo istotny ze względu na metodę, zastosowaną do detekcji mutacji. Zastosowana została metoda bezpośredniego sekwencjonowania DNA techniką terminacji syntezy łańcucha, nazywana również metodą Sangera. Technika ta jest uznawana za „złoty standard” dla wykrywania różnorodnych mutacji

genowych pod warunkiem rygorystycznego spełnienia szeregu warunków. Jednym z nich jest jakość cząsteczek DNA przeznaczonych do analizy. Odpowiednią jakość w znacznie większym stopniu zapewnia szybkie mrożenie tkanki w porównaniu z utrwaleniem i następnie zatopieniem w parafinie. Po pierwsze, cząsteczki DNA w świeżo zamrożonej tkance pozostawały nieuszkodzonymi, w odróżnieniu od zmian chemicznych wielu zasad azotowych, które nieuchronnie następują pod czas utrwalania tkanki w formalinie i mogą być następnie wykrywane jako mutacje pod czas sekwencjonowania DNA. Po drugie, utrwalenie tkanek w formalinie prowadzi do fragmentacji cząsteczek DNA, które następnie są izolowane w postaci krótkich fragmentów o średniej długości około 200 par nukleotydów. Tak małe rozmiary fragmentów wyizolowanego DNA znacznie utrudniają dalszą analizę w przypadku konieczności zbadania sekwencji wielu obszarów jednego lub kilku genów.

Do analizy uzyskanych sekwencji zastosowano oprogramowanie, zainstalowane w sekwenatorze DNA, a zmiany w sekwencji nukleotydowej (mutacje) względem sekwencji typu dzikiego (referencyjnych) były potwierdzane za pomocą programu bioinformatycznego porównywania sekwencji BLAST Nucleotide NCBI. Wykryte warianty sekwencji analizowano pod względem relacji genotypowo-fenotypowym za pomocą zbioru danych ClinVar NCBI, a warianty złośliwe dodatkowo sprawdzano w Bazie COSMIC, która zawiera informacje dotyczące wykrytych w nowotworach mutacji somatycznych. Wiele wykrytych wariantów sekwencji zostało zakwalifikowanych jako polimorfizmy genetyczne pojedynczego nukleotydu (SNPs) i nie zostały objęte analizą. Takie podejście metodyczne umożliwiło otrzymanie wiarygodnych wyników.

Procedury powyższych badań zostały opisane przez Doktorantkę w sposób bardzo szczegółowy a sposób ich przeprowadzenia nie budzi żadnych zastrzeżeń. Autorka uwzględniła wszystkie niezbędne kontrole ujemne i dodatnie oraz kontrole wewnętrzne jak i zewnętrzne. Tak dokładnie opisane przez Autorkę metody badań niewątpliwie dają możliwość powtórzenia eksperymentu przez inne laboratoria. Możliwość odtworzenia procedury badania jest jednym z ważniejszych kryteriów kwalifikacji jakości przedkładanych prac. Wnioski wyciągnięte przez Autorkę są sformułowane precyzyjnie i odzwierciedlają uzyskane wyniki.

Chciałbym jednak aby Doktorantka poznała moje krytyczne uwagi dotyczące pracy.

I tak:

- Brakuje zarówno we wstępie pracy jak i w opisie materiału przyjętej na świecie klasyfikacji histologicznej raka płuca (podana przez Doktorantkę we wstępie jest nie do przyjęcia). Rozdział drugi powinien mieć tytuł najpierw założenia a później cel pracy .Błędnie przedstawiono

stopień zaawansowania choroby u badanych chorych. 1/3 z nich miała III stopień zaawansowania choroby. Uważam że opis kliniczny chorych jest zbyt powierzchowny. Brak jest informacji co do typów histologicznych niedrobnokomórkowego raka płuca a przecież rak gruczołowy różni się genetycznie od raka płaskonabłonkowego.. Brak jest informacji o zastosowanej chemioterapii. /stopień IIIa przed zabiegiem operacyjnym./ Dane te powinny być podane liczbowo i procentowo i powinny być brane pod uwagę w analizach.

- W pracy Doktorantka szeroko opisuje przyczyny powstawania stresu oksydacyjnego w komórkach układu oddechowego. Nałóg palenia papierosów czy chemioterapia mogą prowadzić do stresu oksydacyjnego, przyczyniając się do transformacji nowotworowej. Analiza w tym względzie byłaby bardzo interesująca.

Przygotowując pracę do druku należałoby moim zdaniem uwzględnić analizę tych w/w czynników, w tym również wieku chorych i stopnia zróżnicowania raka, w aspekcie uzyskanych wyników występowania czynnika transkrypcyjnego NRF2 i mutacji KEAP1.

Pomimo powyższych uwag, przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia ustawowe wymogi na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. Rozprawa doktorska mgr Michaliny Kryszczuk stanowi ważny wkład do badań nad biologią raka płuca. Doktorantka posiada szerokie umiejętności praktycznego posługiwania się zaawansowanymi metodami molekularnymi, w tym metodami sekwencjonowania. Posiada umiejętności właściwej interpretacji wyników wymagających zaawansowanych technik bioinformatycznych i trafnego wyciągnięcia wniosków. Świadczy to o wszechstronnych umiejętnościach badawczych Doktorantki a wiedza i zrozumienie skomplikowanych procesów biologicznych umożliwia kontynuowanie Jej dalszego rozwoju naukowego.

W związku z powyższym wnioskuję do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Michaliny Kryszczuk do dalszych etapów procedury przewodu doktorskiego.

WIELOWNIK
Poradni Chorób Płuc i Gruźlicy,
Poradni Chorób Płuc i Gruźlicy dla Dzieci
Prof. dr hab. n. med. Jerzy Kozłowski
specjalista chorób płuc i alergologii
specjalista fizjologii i klinicznej
lekarz chorób wewnętrznych