

Łódź, 19 czerwca 2023 roku

Dr hab. n. med., prof. uczelni Agnieszka Siejka
Kierownik Kliniki Endokrynologii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Sylwii Paszek pt. „Status metylacyjny
wybranych genów w raku piersi”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani Mgr Sylwii Paszek została przygotowana pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. n. med. Izabeli Zawlik (promotor) oraz dr hab. n. med. Ewy Kaznowskiej (promotor pomocniczy) w kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego. Praca doktorska dotyczy oceny statusu metylacyjnego promotorów wybranych pięciu genów (*MGMT*, *BRCA1*, *CDH1*, *ITGA4*, *MEG3*) w raku piersi. Metylacja genów jest jednym z mechanizmów powstawania zmian epigenetycznych, czyli procesów regulacji ekspresji genów bez ingerencji w sekwencję DNA. W pracy analizowano czy komórki raka piersi charakteryzuje zmieniony stopień metylacji wybranych promotorów genów. Dodatkowo podjęto próbę ustalenia czy status metylacji może służyć do oceny ryzyka raka piersi, a także zbadano czy istnieje korelacja pomiędzy metylacją promotora genu a parametrami klinicznymi, takimi jak: wiek w momencie postawienia diagnozy, wielkość guza, podtyp histologiczny raka piersi oraz stopień zajęcia regionalnych węzłów chłonnych. Do badania zakwalifikowano 106 kobiet z rakiem piersi hospitalizowanych w Wielospecjalistycznym Wojewódzkim Centrum Onkologii i Traumatologii w Łodzi oraz w Klinicznym Szpitalu Wojewódzkim Nr 1 im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie w latach 2011-2018. Wśród tych kobiet u 59 był to TNBC a 47 nonTNBC (NTNBC), Grupę kontrolną stanowiło 11 kobiet, u których nie wykryto zmian patologicznych.

W opisie grupy NTNBC pojawia się następująca informacja: „18 przypadków było Luminal A, 10 luminal B, 3 HER2+, a pozostałe 16 przypadków – nie określono podtypu, ze względu na brak danych, ale nie był to TNBC”. Może należało napisać, że był to NTNBC bez określenia podtypu nowotworu – byłoby to bardziej zrozumiałe.

Klinika Endokrynologii
Centralny Szpital Kliniczny UM w Łodzi

92-213 Łódź | ul. Pomorska 251
tel. (042) 201-44-20 | fax. (042) 201-43-41
e-mail: agnieszka.siejka@umed.lodz.pl
www.umed.pl |

Praca ma charakter retrospektywny. Badania molekularne w całości wykonano w Laboratorium Biologii Molekularnej Przyrodniczo-Medycznego Centrum Badań Innowacyjnych Uniwersytetu Rzeszowskiego.

Temat podjęty w pracy doktorskiej jest aktualny i ma znaczenie w określeniu roli zmian epigenetycznych w rozwoju i przebiegu raka piersi.

Praca ma typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na rozdziały: wstęp, założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, spis rysunków i tabel, spis załączników, piśmiennictwo oraz streszczenie (w języku polskim i angielskim). Praca liczy 124 strony, zawiera 5 rycin, 23 tabele i 28 wykresów obrazujących w większości uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej wyniki oraz 2 załączniki: zgody Komisji Bioetycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i Uniwersytetu Rzeszowskiego. Piśmiennictwo obejmuje 187 pozycji literaturowych pochodzących głównie z ostatnich lat z dominacją literatury anglojęzycznej.

Rozprawa doktorska napisana jest starannie. Wstęp pracy jest podzielony na kilka podrozdziałów, w których Doktorantka opisuje epidemiologię, etiologię i klasyfikację raka piersi oraz przybliża informacje na temat genów, które podlegają analizie w Jej pracy doktorskiej. Krótko charakteryzuje mechanizmy epigenetyczne. Wstęp stanowi zwięzłą analizę aktualnego stanu wiedzy na temat podjętego problemu badawczego uzasadniając celowość podjętych badań. Główny cel podjętych badań został jasno sformułowany. Ogólnym celem pracy była analiza statusu metylacji promotorów pięciu genów (*MGMT*, *BRCA1*, *CDH1*, *ITGA4*, *MEG3*). Wybór tych genów oparty o dane literaturowe wskazujące, że zmienność epigenetyczna ich promotorów może mieć znaczenie dla raka piersi.

Szczegółowe cele pracy zostały przedstawione w sześciu jasno sformułowanych punktach i poprawność ich sformułowania nie budzi wątpliwości.

W rozdziale „Materiały i metody” podano kryteria włączenia do grupy badanej i grupy kontrolnej. Do badania włączono tkanki pochodzące od 106 pacjentek z rakiem piersi hospitalizowanych w Wojewódzkim Wielospecjalistycznym Centrum Onkologii i Traumatologii, szpitalu im. Kopernika w Łodzi oraz Klinicznym Szpitalu wojewódzkim Nr

1 w Rzeszowie w latach 2011-2018. Materiał badany stanowiły tkanki mrożone lub tkanki FFPE (utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie).

Ocena metylacji genów i ekspresji wybranych genów w komórkach raka piersi została przeprowadzona przy użyciu nowoczesnych metod biologii molekularnej, a poszczególne techniki zostały szczegółowo omówione w podrozdziale 3.2. Wszystkie zastosowane w pracy etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane w kontekście spełnienia założonych celów pracy doktorskiej. Zastosowane w pracy metody analizy statystycznej są adekwatne dla rozwiązania problemów badawczych. W opisie reakcji RT-PCR na stronie 48 Doktorantka pisze „Kolejno dodano mieszaninę reagentów w objętości 3 ul i 6 ul (niższe stężenia RNA)” – którą objętość dodano do niższych stężeń RNA?

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w uporządkowany sposób, a liczne tabele i ryciny ułatwiają analizę wyników. W efekcie prowadzonych badań stwierdzono różnice w częstości występowania metylacji określonych genów. Stwierdzono istotność statystyczną dla częstości metylacji promotora genu *ITGA4* w całej grupie raka piersi w porównaniu z grupą kontrolną, w której nie stwierdzono metylacji w żadnej z badanych prób. Z kolei metylacja *BRCA1* występowała częściej w grupie TNBC w porównaniu z pozostałymi grupami. Metylacja promotora genu *MEG3* występowała częściej w grupie NTNBC w porównaniu do grupy TNBC oraz kontrolnej (na granicy istotności statystycznej). Dla pozostałych genów (*MGMT*, *CDH1*) nie stwierdzono istotnych różnic. Na stronie 78 wykresie nr 25 przedstawiono względny poziom ekspresji *MEG3* w grupach ze zmiennym stopniem złośliwości histologicznej – jednakże zaprezentowano tylko stopnie G2 i G3 – dlaczego nie uwzględniono G1?

Zaobserwowano, że wiek pacjentek z rakiem piersi był wyższy niż w grupie kontrolnej, co pokrywa się z obserwacjami klinicznymi i danymi z literatury. Wykazano, że metylacja *MGMT* oraz *ITGA4* częściej występuje u starszych pacjentek i koreluje z wiekiem; nie stwierdzono takiej korelacji dla genów *BRCA1* oraz *CDH1*. W odniesieniu do stopnia złośliwości (cecha G, grading) wykazano, że brak metylacji promotora genu *MGMT* częściej występuje przy stopniu G3. Ciekawa jest obserwacja związana z ekspresją genów referencyjnych. Doktorantka stwierdziła istotnie niższy poziom ekspresji genu *GAPDH* w grupie TNBC w porównaniu do NTNBC, jednocześnie

wskazując, że to gen *ACTB* jest genem referencyjnym dla dalszych badań. Szkoda, że w dyskusji nie rozwinęto bardziej tego tematu.

Dyskusja jest napisana w sposób rzeczowy i wnikliwy. Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały skonfrontowane z najnowszymi wynikami opublikowanych badań o podobnej tematyce. Dyskusja w pełni ukazuje bardzo dobre zorientowanie pani Mgr Sylwii Paszek w aktualnej literaturze dotyczącej roli zmian epigenetycznych w patogenezie nowotworów. Bardzo ciekawe są podjęte w dyskusji analizy dotyczące metylacji genu *MGMT* w odniesieniu do potencjalnych możliwości terapeutycznych i być może zastosowania środków alkilujących w przyszłości w leczeniu raka piersi, głównie TNBC. Warto podkreślić, że Doktorantka krytycznie odnosi się do swoich wyników, wskazuje na ograniczenia swojej pracy badawczej i na konieczność przeprowadzenia badań na większą skalę (przy uwzględnieniu większej liczby pacjentek). Bardzo interesująca jest obserwacja, że w grupie kontrolnej nie obserwowano w żadnej próbce metylacji genu *ITGA4*, w przeciwieństwie do grup raka piersi i to zarówno TNBC (22%) jak i NTNBC (44,68%). Być może będzie to początek do podjęcia dalszych kroków badawczych i uwzględnienia tych zmian w procesie diagnostyczno-prognostycznym raka piersi? Analizując uzyskane wyniki Doktorantka słusznie wnioskuje na temat potencjalnego zastosowania klinicznego uzyskanych przez siebie wyników (diagnostycznego, np. metylacja *ITGA4* w wolnokrążącym DNA; terapeutycznego, np. metylacja *BRCA1* a wrażliwość na pochodne platyny w raku piersi; prognostycznego – np. ekspresja *MEG3*)

Wnioski zostały prawidłowo sformułowane w oparciu o omówione wyniki i nie budzą żadnych zastrzeżeń.

Obowiązkiem recenzenta jest wskazanie także pewnych niedociągnięć w przedstawionej do oceny pracy. Część z nich wskazano powyżej, pozostałe mają niewielkie znaczenie, ale w przypadku pisanie pracy doktorskiej nie powinny być się zdarzyć; są to pojedyncze błędy językowe (np. kilkakrotnie powtarza się słowo „nie mniej jednak ” zamiast niemniej jednak; słowo „z pośród” zamiast „spośród”, czy też gramatyczne jak np. „dodano 700 ul RWT zawierający sól guanidyny”.., zamiast „zawierającego sól guanidyny”. Na stronie 66 z wykresu demonstrującego „stopień złośliwości histologicznej w zależności od statusu metylacji promotora genu *MGMT* w

grupie TNBC wynika, że częściej występuje stopień G3, jeśli gen jest metylowany, podczas gdy w opisie wyników zawarto informację (strona 65), że gen niemetylowany.

Niedociągnięcia te nie zmniejszają wysokiego poziomu merytorycznego przedstawionej do oceny pracy doktorskiej.

Podsumowując, wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej, a drobne błędy edytorskie i uwagi przedstawione w recenzji nie umniejszają mojej wysokiej oceny tej pracy. Niniejsza praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autorki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego i umiejętności krytycznej analizy uzyskanych wyników. Przedstawiona do oceny praca doktorska pt.: „Status metylacyjny promotorów wybranych genów w raku piersi” spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim dlatego wnoszę o dopuszczenie Pani Sylwii Paszek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani Mgr Sylwii Paszek.

KIEROWNIK
Kliniki Endokrynologii
Katedry Endokrynologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Agnieszka Siejka
Dr hab. n. med. Agnieszka Siejka