

Beata Nowakowska
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka

Recenzja pracy doktorskiej Mgr Joanny Dejewskiej pt. „**Genomiczny profil oporności na antracykliny w dziecięcych ostrych białaczkach**”

Przedstawiona mi do recenzji praca dotyczyła poszukiwania markerów oporności na antracykliny w dziecięcych ostrych białaczkach. Białaczki są heterogenną grupą chorób i stanowią około 30% przypadków chorób nowotworowych u dzieci. Ostre postaci białaczek stanowią najczęstszą formę białaczek i wymagają szybkiego podjęcia jak najskuteczniejszej i najlepiej spersonalizowanej terapii. Etiologia tej grupy chorób wciąż nie jest do końca poznana. Wiadomo jednak, że czynniki genetyczne obok czynników środowiskowych, mają ogromny wpływ na powstanie choroby oraz odpowiedź na stosowane leki. Uzasadnia to potrzebę badań nad patogenezą ostrych białaczek i dalszego poszukiwania leczenia, odpowiadającego profilowi genetycznemu pacjenta.

Praca doktorska Pani mgr Joanny Dejewskiej, wykonana pod kierunkiem prof. Pana Dr hab. Andrzeja Tretyny oraz Pani dr n. med. Joanny Szczepanek, miała na celu określenie genomicznych i transkryptomicznych determinantów oporności na wybrane leki antracyklinowe. Badania zostały przeprowadzone u pacjentów pediatrycznych u których stwierdzona została ostra białaczka, za pomocą technik mikromacierzy. Przeprowadzono analizę na poziomie DNA, zmian ekspresji genów, analizę ontologiczną pod kątem funkcji genów oraz ich szlaków komórkowych. Praca jest dobrze napisana, ma klasyczny układ z podziałem na wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję oraz wnioski, z zachowaniem odpowiednich proporcji tekstu. Podana literatura jest bardzo bogata i zawiera 304 pozycje, z czego większość jest bardzo aktualna. Czytając rozprawę można dostrzec ogrom pracy włożony w badania, co potwierdzają otrzymane wyniki oraz bogata, dobrze poprowadzona dyskusja, w której doktorantka odnosi wyniki swojej pracy do obecnego stanu wiedzy. Praca doktorska dokumentuje również biegłość mgr Joanny Dejewskiej w posługiwaniu się technikami biologii molekularnej. Sama rozprawa niestety nie jest wolna od szeregu mankamentów.

We Wstępie swojej pracy mgr J. Dejewska w sposób bardzo kompetentny i uporządkowany prezentuje wszystkie informacje dotyczące etiologii, podziału, oraz leczenia białaczek, jak również opisuje stosowane w badaniach techniki mikromacierzy. Moje uwagi do tej części pracy są raczej redaktorskie i nie mają wpływu na ogólną ocenę rozprawy. Na stronie 10 oraz 16, Doktorantka opisuje częstość występowania danego typu białaczek, gdzie częstość zachorowania szacuje się na „3,9 przypadków”, lub „1,5 przypadku”. Pamiętając, że „przypadek” odnosi się do pojedynczego pacjenta, takie procentowe przedstawianie danych (choć popularne w literaturze), mogłoby być zastąpione przez podanie danych w innej formie. Druga czysto redakcyjna uwaga to stosowanie skrótów myślowych typu: „mutacje *WT1*”, zamiast „mutacje w genie *WT1*”. Już jakiś czas temu zastąpiono również zwrot „upośledzenie umysłowe” „niepełnosprawnością intelektualną” (strona 36).

Cel pracy jest jasno sformułowany.

Więcej uwag mam do części Materiały i Metody. Rozpoczynając od grupy badanych pacjentów: W badaniach za pomocą techniki aCGH wzięło udział 46 pacjentów, natomiast w badaniach za pomocą mikromacierzy ekspresyjnych 55 pacjentów. Walidacji wyników dokonano u 155 pacjentów. Rozkład pod względem płci, wieku oraz diagnozy przedstawiony jest w tab. 7. „Charakterystyka kliniczna pacjentów uczestniczących w poszczególnych etapach badań”. Niestety z tabeli tej nie wynika, czy i jaka grupa pacjentów, biorących udział w pierwszym etapie (aCGH) została zakwalifikowana do etapu drugiego badania (macierze ekspresyjne). To samo dotyczy grupy na której przeprowadzono badania walidacyjne.

We Wstępie, opisując metodę mikromacierzy ekspresyjnych, mgr J. Dejewska napisała: „Mikromacierze ekspresyjne to szklana płytka z naniesionymi fragmentami kwasów nukleinowych (sond), do których specyficznie wiążą się cząsteczki DNA.” Natomiast w rozdziale Materiały i Metody, Doktorantka opisuje przez siebie wykonane badanie gdzie wykorzystuje do hybrydyzacji RNA (cRNA), co jest o tyle zastanawiające, że wcześniej wykonała reakcję odwrotnej transkrypcji (strona 59). Być może jest to kolejny skrót myślowy Autorki lub nie do końca rozumiem zastosowaną technikę, ale jeśli rzeczywiście wykorzystane było RNA, to chętnie usłyszałabym wytłumaczenie dlaczego nie stosowano cDNA.

Niezrozumiałe jest dla mnie również jak przeprowadzano podstawową analizę na podstawie której wybrano 21 genów których ekspresja była zaburzona

(uwzględniono geny, dla których wykazano krotność zmiany powyżej 2 oraz istotność statystyczną – podrozdział 3.5.5.11). Co było właściwą kontrolą dla pacjentów z lekooporności? Czy było to porównanie pacjentów opornych do wrażliwych? Niestety nie ma opisu tej analizy w rozdziale Materiały i Metody.

W podrozdziale 3.5.6 Weryfikacja wyników, Doktorantka napisała, że zmiany w poziomie ekspresji badano zarówno w grupie pacjentów oraz w niezależnej grupie. Przy czym, ta „niezależna grupa” w żaden sposób nie jest scharakteryzowana.

Z uwag redakcyjnych w tej części rozprawy, na stronie 53 źle podany jest numer genomu referencyjnego.

W rozdziale Wyniki, w tabeli 14 przedstawiono najczęstsze zmiany cytogenetyczne zidentyfikowane w grupie badanych pacjentów. Nigdzie niestety nie mogłam znaleźć przedstawienia liczbowego, u ilu pacjentów wykryto którą zmianę. Brak mi również porównania ekspresji u pacjentów z daną aberracją do pacjentów bez tej aberracji. Wiadomym jest, że aberracje strukturalne, takie jak delecje czy duplikacje zmieniają poziom ekspresji genów nie tylko w obrębie regionu który uległ rearanżacji, ale również wpływają na ekspresję innych genów, leżących w pobliżu lub też w innych regionach genomu.

W kolejnych podrozdziałach Wyników, opisane są bardzo szczegółowo wyniki analiz klasyfikacji genów oraz szlaków komórkowych w różnych profilach oporności. Część z opisów powinna zostać przeniesiona do Dyskusji. A same wyniki zaprezentowane być może w formie tabel dla ich lepszej przejrzystości. Zabrakło mi integracji wyników otrzymanych metodą aCGH i mikromacierzy ekspresyjnych.

Dyskusja spełnia wymagania jakie stawiane są przed tego typu rozdziałem. Jest bardzo szczegółowa i napisana w odniesieniu do publikacji naukowych. Na wnioski składają się dwa dość ogólne punkty i jeden punkt ze szczegółowym wskazaniem na prawdopodobne markery oporności na antracykliny. Punkt ten odpowiada założonemu celowi pracy.

Podsumowując, praca przedstawia potencjalne markery i szlaki komórkowe które zostały skorelowane w rozprawie, ze zjawiskiem oporności na leki. Zrozumienie mechanizmów oporności oraz identyfikacja nowych wariantów genomu będą niewątpliwie bardzo pomocne w opracowaniu skutecznych, spersonalizowanych terapii. Dlatego ważne jest aby wyniki przedstawione przez Doktorantkę zostały opublikowane w formie publikacji naukowej. Z obowiązku recenzenta więc zwróciłam

uwagę na pewne niedociągnięcia i błędy, szczególnie te, które utrudniają zrozumienie wyników otrzymanych przez mgr J. Dejewską.

Na podstawie powyższej recenzji wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, o dopuszczenie mgr Joanny Dejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa 07.06.2023