136

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Wioletty Izabeli Wujcickiej „Rola genu supresorowego *WWOX* w nowotworach wieku dziecięcego (nephroblastoma i neuroblastoma)".

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa liczy 135 stron i składa się z 9 rozdziałów tworzących typowy układ. Jest ilustrowana 9 czytelnymi rycinami oraz zawiera 13 tabel. Doktorantka cytuje 243 pozycje piśmiennictwa.

Celem mgr Wioletty Wujcickiej było określenie roli genu *WWOX* w kancerogenezie nerczaka płodowego u dzieci i nerwiaka zarodkowego współczulnego. W tym celu Doktorantka badała częstość występowania delecji w regionie FRA16D, oznaczała metylację promotora genu *WWOX* oraz określała ekspresję tego genu i jej związek z ekspresją genów regulujących apoptozę, cykl podziałowy komórki i kodujących receptory dla czynników wzrostu. Rozprawa stanowi efekt logicznego rozumowania naukowego, a wybrana metodyka jest adekwatna do założeń projektu. Doktorantka po wykonaniu badań potwierdza znaczenie genu *WWOX* w kancerogenezie obydwu badanych nowotworów.

Praca napisana jest niezwykle starannie, bardzo komunikatywnym językiem. Stylistyka jest niemal nienaganna (najbardziej rażącym wyjątkiem jest „obniżenie apoptozy" na str. 9). Autorka unika niepotrzebnych dygresji koncentrując się na zasadniczych wątkach. Ułatwia to śledzenie Jej toku rozumowania i realizacji założeń koncepcji badawczej. Staranność edytorska jest wzorowa. Na przykład, Autorka objaśniając skróty użyła pogrubionej czcionki dla uwypuklenia pierwszych liter nazwy odpowiadającej skrótowi. W tekście rozprawy nie znalazłem żadnych uchybień w pisowni nazw genów lub białek.

We wstępie Doktorantka bardzo wyczerpująco podaje najważniejsze informacje dotyczące nerczaka płodowego u dzieci i nerwiaka zarodkowego współczulnego oraz roli genu *WWOX*. Czytelnik nawet jeśli, tak jak recenzent, nie jest ekspertem w poruszanej tematyce, po lekturze tej części rozprawy nabywa wystarczającej ogólnej orientacji w omawianych zagadnieniach. Pozwala to na zrozumienie założeń badawczych i celu pracy. W kolejnych częściach rozprawy Autorka omawia cele badania oraz materiał i metody. Mgr Wujcicka bardzo wyczerpująco przedstawia metodykę badań a opis przeprowadzania analiz PCR imponuje szczegółowością i świadczy o perfekcyjnym opanowaniu warsztatu badawczego. Zastosowane testy statystyczne nie budzą wątpliwości metodycznych. Wyniki badań przedstawione są w sposób przejrzysty i część z nich jest zawarta w czytelnych tabelach. Kolejną część rozprawy stanowi poprawnie przeprowadzona dyskusja zajmująca 19 stron. Mgr Wioletta Wujcicka w dyskusji z wielką swobodą odnosi uzyskane przez siebie wyniki do wyników innych badaczy – cała ta część świadczy o dogłębnej wiedzy Autorki. Końcowe i główny wniosek podsumowujące rozprawę sformułowane są jasno i odpowiadają przyjętym celom pracy chociaż ich treść prowokuje recenzenta do podjęcia polemiki merytorycznej z Doktorantką o czym wspomnę niżej. Wykaz zastosowanych skrótów ułatwia śledzenie tekstu jednak niepotrzebne jest ponowne objaśnianie skrótów w tekście. Autorka cytuje najważniejsze pozycje piśmiennictwa

światowego, nie pomijając najnowszych doniesień (znalazłem aż 22 pozycje opublikowane w latach 2009-2010). Streszczenie jest wyczerpujące i jednocześnie odpowiednio zwięzłe.

Rzetelne podejście do nałożonych na mnie przez Wysoką Radę Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego obowiązków recenzenta, nakazuje mi wszakże uwypuklić wszystkie wątpliwości i wskazać na nieliczne niejasności rozprawy.

1. Główny wniosek wynikający z rozprawy brzmi: „Gen supresorowy nowotworów *WWOX* jest zaangażowany w kancerogenezę bądź progresję procesu nowotworowego w nerczaku i zwojaku". Nie wdając się w dywagacje dotyczące możliwej przypadkowości stwierdzanych zależności wynikających z małej liczebności badanych grup proponuję odwrócić nieco tok rozumowania Doktorantki.

W porównaniu do ogólnej populacji utrata heterozgotyczności w obrębie regionu FRA16D była obserwowana u 12-18% chorych z nerczakiem płodowym i 9-37% chorych ze zwojakiem zarodkowym współczulnym i nie miała związku ze zmianami w ekspresji *WWOX*. A zatem 82-88% chorych z nerczakiem i 63-91% chorych ze zwojakiem było heterozygotami w obrębie *locus* genu *WWOX*. LOH regionu FRA16D nie może zatem służyć jako argument przemawiający za rolą genu *WWOX* w kancerogenezie badanych nowotworów, ponieważ 63-91% guzów nie wykazywało LOH, a w pozostałych LOH nie przekładał się na zmniejszenie ekspresji *WWOX*.

Metylacja któregokolwiek z dwu miejsc promotorowych genu *WWOX* występowała u 21% chorych z nerczakiem i u 17% chorych ze zwojakiem. Jej związek ze zmniejszeniem ekspresji *WWOX* był bardzo niewielki – wystąpił jedynie w grupie guzów heterozygotycznych w odniesieniu do markera D16S518. Nie stwierdzono zatem jej wstępowania u, odpowiednio, 79% i 83% chorych. Oznacza to, że w przeważającej części guzów nie dochodzi do epigenetycznego wyciszenia ekspresji genu *WWOX* drogą hipermetylacji jego promotora.

Wykazane korelacje (dodatnie lub ujemne) ilości transkryptu *WWOX* z transkryptami niektórych genów regulujących apoptozę, cykl podziałowy i kodujących receptory dla czynników wzrostu mogą po prostu wynikać z działania wspólnych mechanizmów regulujących.

Z powyższych danych zdaniem recenzenta wynika to, że w większości badanych guzów nie ma przesłanek pozwalających na przyjęcie, że gen *WWOX* odgrywa istotną rolę w patogenezie tych nowotworów. Nie znaczy to oczywiście, że nie jest tak w rzeczywistości, jednak ograniczenia wynikające z założeń rozprawy nakazywałyby moim zdaniem sformułowanie nieco ostrożniejszej konkluzji.

Przypuszczam, że entuzjazm młodego badacza i pasja eksperymentatora powodują, że na tym etapie kariery naukowej trudno zdobyć się na bardzo zdystansowaną i chłodną (ale w moim przekonaniu obiektywną) interpretację uzyskanych danych doświadczalnych. Jestem jednak przekonany, że wraz z nabywaniem doświadczenia taka umiejętność pojawi się u Doktorantki.

2. Tytuł podrozdziału 5.2.4 zawiera wzmiankę o oznaczeniach zmian epigenetycznych badanych genów. W podrozdziale 5.2.4.1 oznaczano jednak utratę heterozygotyczności nie będącą (przynajmniej w opinii recenzenta) zmianą epigenetyczną a w 5.2.4.3 i 5.2.4.4 ekspresję *WWOX* i

innych genów, która zależy nie tylko od zmian epigenetycznych. Na stronie 49 (wiersze 12-15 od góry) znalazło się zdanie potwierdzające, że Autorka uznaje delecje i translokacje genu za zmiany epigenetyczne.

3. Sprzeciw budzi używanie określenia „tendencja w kierunku obniżenia ekspresji" (str. 86) jeśli wartość współczynnika p testu statystycznego wynosi np. 0,5637 (przy okazji, podawanie wartości p z dokładnością do 4 miejsc po przecinku jest chyba przesadą). Duża różnica w medianach ekspresji genu pomiędzy grupami najprawdopodobniej zależy od dużego zakresu wartości ekspresji oraz bardzo małej liczebności próbek (podgrupy były określane w zależności od obecności dwóch markerów mikrosatelitarnych oraz metylacji dwóch miejsc promotorowych).

4. Określenie wprost proporcjonalna korelacja (np. na str. 92) używane jako synonim korelacji dodatniej jest oczywistym błędem. Proporcjonalność prosta oznacza, że iloraz dwóch badanych zmiennych ma wartość stałą. Jeśli zatem ekspresja genu X zwiększyłaby się dwukrotnie wiązałoby się to z dwukrotnym zwiększeniem ekspresji genu Y. Chyba nie taką zależność Doktorantka wykazała stosując test Spearmanna. Podobnie błędnie autorka używa określenia korelacja odwrotnie proporcjonalna jako synonimu korelacji ujemnej.

5. Jaki był cel określania kategorii rokowniczych u dzieci z badanymi nowotworami oraz zbierania danych klinicznych (str. 64-66) jeśli Autorka nie zbadała związku ekspresji genu *WWOX* (niezależnie od mechanizmu prowadzącego do jej zmiany) z rokowaniem? Zapewne formalna analiza przeżycia w tak małych liczebnie grupach byłaby trudna do przeprowadzenia ale możliwe było choćby określenie ekspresji *WWOX* czy obecności LOH w obrębie FRA16D u dzieci z nerczakiem w zależności od faktu wystąpienia wznowy lub nie.

6. Dlaczego nie dokonano analizy statystycznej częstości występowania LOH w porównaniu z częstością oczekiwaną? Można było tu zastosować choćby test chi-kwadrat. Przedstawione wyniki stanowią zatem jedynie ilustrację i nie mogą stanowić podstawy do wyciągania jakichkolwiek wniosków.

7. Autorka *de facto* nie badała zawartości białka kodowanego przez gen *WWOX* ponieważ w podrozdziale 6.5 przedstawiono tylko obrazy elektroforezy w żelu wybranych próbek guzów co można potraktować jedynie jako materiał ilustracyjny. Nasuwa się zatem pytanie jaki był cel wykonywania tych oznaczeń skoro nie wnoszą one do rozprawy niczego istotnego?

8. Stwierdzenia w dyskusji na str. 97 są sprzeczne. Z jednej strony przeżywalność (czy Autorka ma na myśli odsetek wyleczeń?) chorych na nerczaka płodowego ma wynosić 90% a z drugiej Doktorantka stwierdza, że dla 25% chorych z tym nowotworem nie ma opracowanej dobrej strategii leczniczej.

9. Autorka z uporem używa w rozprawie obcojęzycznych nazw „nephroblastoma" i „neuroblastoma" zamiast prawidłowych polskich: „nerczak płodowy u dzieci" i „nerwiak zarodkowy współczulny".

10. Biopsja guza kwalifikuje obecnie stopień zaawansowania nerczaka jako III a nie II jak wspomniano na str. 29.

Powyższe uwagi w najmniejszym stopniu nie umniejszają jednak mojej bardzo pozytywnej ogólnej oceny rozprawy mgr Wioletty Izabeli Wujcickiej. Mam nadzieję, że przynajmniej niektóre z tych uwag będą mogły stanowić podstawę do przeprowadzenia przez Doktorantkę skutecznej polemiki z recenzentem w trakcie publicznej obrony. Podkreślić pragnę, że przedstawiona mi do oceny rozprawa niewątpliwie stanowi świadectwo wielkiego zaangażowania jej Autorki w pracę badawczą, którą potrafi wcześniej logicznie zaplanować, staranności, ogromnej erudycji (uderzającej zwłaszcza podczas lektury Wstępu) oraz doskonałego opanowania warsztatu badawczego. Są to przymioty Pani mgr Wioletty Wujcickiej, które budzą mój wielki szacunek i szczery podziw.

Na zakończenie z przyjemnością stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji praca z naddatkiem spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim i w związku z tym za oczywisty uznaję wniosek o dopuszczenie jej do publicznej obrony.

Łódź, 08 lutego 2011 r.

KIEROWNIK
Kliniki Chemioterapii Nowotworów
Katedry Onkologii UM w Łodzi

dr hab. n. med. Piotr Potemski