

Prof. nadzw. dr hab. n. med. Wiesława Grajkowska

Warszawa, 23.02.2017

Kier. Pracowni Onkopatologii i Biostruktury Medycznej

Zakład Patologii IPCZD

Aleja Dzieci Polskich 20

04-730 Warszawa

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek. med. Łukasza Stefańczyka pt. „Ocena ekspresji miRNA w wyściółczakach ośrodkowego układu nerwowego u dzieci”.

Wyściółczaki stanowią około 2-3% pierwotnych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN) i stanowią trzecią pod względem częstości grupę nowotworów mózgu i rdzenia kręgowego wieku rozwojowego. Około 30% wyściółczaków rozwija się u dzieci poniżej 3-roku życia. Nowotwory te wywodzą się z komórek wyściółki pokrywających wewnętrzne powierzchnie komór mózgu i kanału centralnego rdzenia. U dzieci 90% tych nowotworów rozwija się w mózgu z przewagą w lokalizacji podnamiotowej. U dorosłych większość wyściółczaków zlokalizowana jest w obrębie rdzenia kręgowego. Około 10-15% wyściółczaków szerzy się drogą płynu mózgowo-rdzeniowego.

Wyściółczaki to heterogenna grupa nowotworów OUN stanowiąca nadal duże wyzwanie zarówno dla klinicystów, jak również biologów molekularnych. Choroba dotyczy pacjentów w każdym wieku, jednak to właśnie dzieci znajdują się w grupie podwyższonego ryzyka wznowy i progresji choroby. W ostatnich dekadach nie dokonał się żaden istotny przełom w leczeniu tego nowotworu i nadal kluczowe znaczenie ma zabieg operacyjny oraz radioterapia. Jak dotąd radykalność zabiegu neurochirurgicznego jest najważniejszym czynnikiem prognostycznym. Leczeniem uzupełniającym jest radioterapia i chemioterapia. 10-letnie całkowite przeżycie w grupie pediatrycznej wynosi ok. 64% i jest znacznie gorsze niż u pacjentów dorosłych, gdzie sięga nawet 80%. Wyniki ostatnich badań wskazują, że im młodsze jest dziecko tym rokowanie jest gorsze. Wiąże się to z częstszą lokalizacją nowotworu w obrębie tylnej jamy czaszki i naciekaniem istotnych dla życia struktur, brakiem możliwości zastosowania radioterapii u najmłodszych dzieci, a także odmiennym profilem molekularnym nowotworu. 5-letnie przeżycia w grupie najmłodszych pacjentów (niemowlęta) wynoszą 42% - 55%. Najczęstszą przyczyną niepowodzenia leczenia jest progresja bądź wznowa choroby

nowotworowej.

Uaktualniony, obowiązujący system klasyfikacji histopatologicznej wyściółczaków WHO 2016, a zwłaszcza ocena stopnia złośliwości, nadal pozostaje niewystarczający ze względu na ograniczoną przydatność kliniczną i brak powtarzalności wyników. Pomimo podobieństwa histologicznego nowotworów zlokalizowanych w różnych obszarach centralnego układu nerwowego, ich charakterystyka biologiczna jest bardzo niejednolita. Ostatnio opublikowane wyniki wskazują, iż stratyfikacja ryzyka oparta na kryteriach molekularnych przewyższa klasyfikację histopatologiczną. Największym osiągnięciem ostatnich lat w zakresie molekularnej oceny wyściółczaków jest bez wątpienia wyselekcjonowanie dziewięciu podgrup tych nowotworów. Poszczególne warianty molekularne mają odmienną biologię, a dwa z nich związane są z wysokim prawdopodobieństwem niekorzystnego przebiegu klinicznego choroby. Są to wyściółczaki nadnamiotowe związane z obecnością genu fuzyjnego *RELA* i podnamiotowe wyściółczaki grupy A bez uchwytnych zmian genomowych. Wprowadzenie nowych markerów molekularnych powinno stanowić zatem istotny cel aktualnie prowadzonych badań diagnostycznych, zwłaszcza w celu identyfikacji chorych należących do źle rokującej grupy. Szczególnie obecność wyściółczaków, których komórki pozbawione są specyficznych zaburzeń molekularnych, skłania do dalszych poszukiwań zmian na poziomie funkcjonalnym, możliwych do wykorzystania w diagnostyce i/lub rokowaniu. Wśród potencjalnych biomarkerów tego typu znajdują się cząsteczki miRNA, których ocena jest przedmiotem recenzowanej przeze mnie pracy doktorskiej. Znaczenie miRNA znalazło potwierdzenie związane z patogenezą i rokowaniem wielu nowotworów u dorosłych, natomiast prace badawcze dotyczące nowotworów OUN u dzieci, zwłaszcza wyściółczaków są nieliczne. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska wpisuje się w nurt nowoczesnych badań molekularnych związanych z patogenezą i poszukiwaniem czynników prognostycznych w wyściółczakach u dzieci.

Formalna ocena pracy

Przedstawiona mi do oceny dysertacja ma układ typowy i wraz ze streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwem liczy 71 stron. Piśmiennictwo obejmuje 91 pozycji, w tym 42 pozycje z ostatnich 4 lat. Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich i obejmuje objaśnienia skrótów użytych w tekście, spis treści, wstęp, cel pracy, materiał i zastosowane metody badawcze, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i

angielskim oraz piśmiennictwo. Praca zawiera 12 rycin i 10 tabel. Praca napisana jest w sposób przejrzysty. Treść pracy doktorskiej jest zgodna z tytułem.

Merytoryczna ocena pracy

We wstępie doktorant przedstawia zebraną aktualną wiedzę na temat wyściółczaków. W sposób czytelny i przejrzysty przedstawia epidemiologię tych nowotworów, lokalizację, klasyfikację histologiczną i charakterystykę kliniczną. Następnie omawia zmiany genomowe zidentyfikowane w wyściółczakach, zaburzenia epigenetyczne oraz przedstawia charakterystykę molekularną z uwzględnieniem podziału na dziewięć podgrup molekularnych. Na uwagę zasługuje podrozdział opisujący budowę i dojrzewanie miRNA oraz jego rolę w regulacji różnych sekwencji mRNA. Doktorant zwraca uwagę na fakt, że jednoniciowe cząsteczki RNA zmieniły sposób postrzegania procesu nowotworowego, a rosnące znaczenie miRNA w onkogenezie znalazło swoje odzwierciedlenie w nazewnictwie molekularnym, nazywając je onko-miRami. Autor podkreśla, że jednoniciowe cząsteczki RNA stanowią szansę na definiowanie nowych potencjalnych elementów procesu diagnostyki nowotworowej oraz celów terapii ukierunkowanej na wykorzystanie regulowania aktywności miRNA. Na uwagę zasługują informacje potwierdzające zaangażowanie miRNA w odpowiedź na leczenie inhibitorami kinaz u chorych z nowotworami płuc, czy też jego użyteczność przy ocenie odpowiedzi na leczenie środkami alkilującymi u chorych z glejakiem wielopostaciowym. Poznanie roli miRNA otwiera nadzieję na identyfikację nowych markerów molekularnych nowotworów związanych z ich patogenezą, biologią i możliwościami stworzenia skuteczniejszych sposobów leczenia.

Doktorant przyjął hipotezę badawczą, że ekspresja niektórych cząsteczek miRNA może mieć związek ze stopniem złośliwości wyściółczaków i ich przebiegiem klinicznym. Cele szczegółowe zostały sformułowane następująco:

1. Profilowanie ekspresji miRNA reprezentatywnej grupy wyściółczaków u dzieci.
2. Analiza bioinformatyczna i selekcja miRNA związanych ze stopniem złośliwości badanych nowotworów.
3. Ocena wyników profilowania na walidacyjnej grupie przypadków.
4. Analiza potencjalnych zależności pomiędzy ekspresją miRNA a cechami histologicznymi i klinicznymi wyściółczaków.

Należy podkreślić, że cele pracy zostały sprecyzowane w sposób jasny, a skala trudności podjętych problemów i ich znaczenie w pełni odpowiadają wymogom badawczym rozprawy doktorskiej.

Badaniami objęto dużą grupę 74 wyściółczaków usuniętych od pacjentów w wieku od 6 miesięcy do 15 lat (mediana wieku 5 lat). W badanej grupie było 28 dziewczynek i 46 chłopców. 48 przypadków wyściółczaków sklasyfikowano jako wyściółczaki WHO GII i 26 jako wyściółczaki anaplastyczne WHO GIII. Przebadano również materiał pochodzący od 11 dzieci operowanych z powodu wznowy nowotworu. Metody statystyczne zastosowane w opracowaniu zgromadzonego materiału, mimo skąpej dokumentacji, uważam za właściwe.

Przeprowadzone analizy w oparciu o profilowanie miRNA pozwoliły na wyodrębnienie 32 sekwencji o zróżnicowanym poziomie ekspresji w odniesieniu do stopnia złośliwości wyściółczaków. Do walidacji wyników, uzyskanych na etapie profilowania, wytypowano 5 cząsteczek miRNA: miR-200a-3p, miR-19a, miR-17-5p i miR-106b. Dla trzech cząsteczek: miR-17-5p, miR-19a, miR-106b wykazano związek ze stopniem złośliwości wyściółczaków, a dla dwóch (miR-17-5p, miR-200a-3p) wykazano związek z rokowaniem. Analizy wieloczynnikowe uwzględniające wiek, płeć, stopień złośliwości nowotworu i jego lokalizację potwierdziły statystycznie istotny związek z niższą ekspresją miR-17-5p i dłuższym czasem przeżycia wolnym od wznowy i czasem przeżycia całkowitego. Niższe wartości miR-200a związane były z dłuższym czasem przeżycia wolnym od wznowy. Wykazano również statystycznie istotny związek pomiędzy wartościami ekspresji miRNA, a ekspresją genu *EZH2*. Uzyskane dane są przedstawione w 9 tabelach i na 8 rycinach.

Wyniki swoich badań Doktorant omawia w dyskusji konfrontując je z danymi z piśmiennictwa. Dyskusja jest interesująca i na wysokim poziomie merytorycznym. Autor wyczerpująco i z dużą dojrzałością naukową analizuje wyniki swoich badań porównując je z danymi z bieżącej literatury światowej.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant wyciągnął wnioski odnoszące się do postawionych pytań badawczych.

Jednak z obowiązku recenzenta, muszę wymienić zauważone mankamenty pracy.

1. Klasyfikacja histopatologiczna nowotworów gleju wyściółkowego powinna być obszerniej opisana zważywszy na fakt, iż w nowej edycji WHO 2016 usunięto podtyp komórkowy wyściółczaka, a wprowadzono wyściółczaka zdefiniowanego molekularnie (ang. ependymoma *RELA* fusion-positive).

2. Tabela 2 zawiera zbyt ogólny opis grupy badanej pod względem klinicznym: brak szczegółowego przedstawienia zmiennych (np. danych demograficznych pacjentów z poszczególnymi lokalizacjami wyściółczaków – ma to kluczowe znaczenie dla nowotworów tylnej jamy czaszki u pacjentów poniżej 4 roku życia - brak także informacji jaki był stopień złośliwości histologicznej tych nowotworów).
3. Opis zastosowanych metod badawczych nie zawiera informacji dotyczącej metody badania ekspresji genu *EZH2*.
4. Brak danych odnośnie kontroli dla oceny ekspresji genu *EZH2* - co należy uznać za podwyższony i obniżony poziom ekspresji tego genu?
5. Budzi również zastrzeżenia sposób opisanie kontroli wewnętrznej w podrozdziale „walidacja wyników” – nie wyjaśniono w sposób zrozumiały, co było celem tej kontroli. W przypadku oceny ekspresji miRNA w nowotworach, kontrola winna być przeprowadzona z wykorzystaniem tkanek zdrowych.
6. Wskazane byłoby przeprowadzenie korelacji wyściółczaków z obecnością genu fuzyjnego *C11orf95-RELA* ze stopniem histologicznej złośliwości i przebiegiem klinicznym choroby.
7. W podrozdziale 4.1.1. Doktorant pisze: „W oparciu o przeprowadzone analizy wykazano statystycznie istotną tendencję do obecności wyższych poziomów ekspresji badanych miRNA w wyściółczakach anaplastycznych w porównaniu do wyściółczaków bez obecnych cech anaplazji”. Jest to zbyt uogólniony wniosek, lepiej byłoby mówić o profilu miRNA charakterystycznym dla obu grup wyściółczaków (niektóre poziomy ekspresji miRNA były podobne w obu grupach).
8. Forma przedstawienia wyników w tabeli 10 jest mało przejrzysta, brakuje wszystkich danych na podstawie których wyciągnięto wnioski (np. danych liczbowych i definicji dotyczących przeżycia całkowitego i wolnego od wznowy), opis oceny ryzyka względnego jest powierzchowny, niepełny.
9. Brak jednoznacznego oznaczenie cząsteczek miRNA (np. miR-200a zamiast miR200a-3p).
10. W tekście autor nie ustrzegł się błędów literowych, stylistycznych i uznawanych za błędne sformułowań jak. np. tkanka mózgową. W części rozdziałów razi nieporadność językowa.
11. Wnioski 2 i 3 mają raczej charakter opisu wyników badań i powinny być sformułowane w postaci ogólnych stwierdzeń wynikłych z reguł logicznej analizy rezultatów.

Reasumując, zawarte w recenzji uwagi nie umniejszają wartości poznawczej pracy. Praca doktorska lek. med. Łukasza Stefańczyka w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych w świetle zmodyfikowanej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 18 marca 2011 roku. Zwracam się zatem z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. Łukasza Stefańczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W. Grajlski