

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. „Ocena ekspresji miRNA w wyściółczakach
ośrodkowego układu nerwowego u dzieci”
autorstwa lek. Łukasza Stefańczyka

Nowotwory gleju wyściółkowego, pomimo wielu lat badań, wciąż stanowią problem kliniczny i społeczny. Występują zarówno w populacji osób dorosłych jak i dziecięcej. Jest to bardzo zróżnicowana grupa nowotworów. Zróżnicowanie to przejawia się w wielu aspektach, poczynając od charakterystyki klinicznej m. in. lokalizacji w obrębie mózgu czy rdzenia kręgowego, poprzez zróżnicowanie histopatologiczne (od guzów łagodnych - WHO G I, takich jak podwyściółczaki poprzez guzy o pośredniej złośliwości - WHO G II, jak wyściółczak, kończąc na guzach złośliwych – WHO G III, jak wyściółczak anaplastyczny), aż do zróżnicowania molekularnego. Leczenie guzów wyściółkowych o II i III stopniu złośliwości wymaga podejścia interdyscyplinarnego. Obejmuje ono resekcję neurochirurgiczną z następową radioterapią i chemioterapią. Ze względu na, wielokrotnie trudną operacyjnie lokalizację oraz możliwość rozsiewu droga płynu mózgowo-rdzeniowego, leczenie systemowe wydaje się pełnić kluczową rolę. Niestety wyniki leczenia są zniżej gorsze w populacji dziecięcej i w przypadku niecałkowitej resekcji dziesięcioletnie przeżycie szacuje się na niewiele ponad 30%. W wielu przypadkach obserwowana jest lekooporność na leczenie chemioterapeutykami. Powyższe trudności niejednokrotnie wynikają ze szczególnej i niestety wciąż niejasnej biologii molekularnej tych nowotworów. W ostatnich latach wyniki przeprowadzanych badań molekularnych pozwoliły na stworzenie podziału guzów wyściółkowych ze względu na podtypy molekularne, który wydaje się mieć jednocześnie odzwierciedlenie w pewnych danych klinicznych oraz rokowaniu. Jednak często występują guzy, u których nie stwierdza się strukturalnych zmian genomowych. Dlatego nadal poszukuje się lepszych markerów, które pozwolą na poprawną klasyfikację i optymalne leczenie dzieci



z tymi nowotworami. Wśród prowadzonych badań molekularnych nad guzami gleju wyściółkowego wyjątkowo ważne są badania nad miRNA. Właśnie temu zagadnieniu poświęcił się lek. Łukasz Stefańczyk.

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej autor podjął się trudnego i ważnego celu jakim była identyfikacja miRNA, których ekspresja może mieć związek ze stopniem złośliwości wyściółczaków i ich przebiegiem klinicznym. W kontekście przedstawionych powyżej trudności merytorycznych i interdyscyplinarności podejścia, łączącego tematykę neurochirurgiczną z zaawansowanymi i nowoczesnymi badaniami w zakresie biologii molekularnej, wybór tematu jest niezwykle trafny i poprawnie sformułowany.

Przedstawiona do recenzji rozprawa włącznie ze streszczeniem w języku polskim i angielskim liczy 71 stron tekstu. Praca jest bardzo starannie przygotowana pod względem edycyjnym. Napisana jest zwięzłym i precyzyjnym językiem zgodnym z aktualną nomenklaturą przedmiotu. Ma układ typowy dla rozprawy na stopień doktora. Składa się ze wstępu, przedstawienia założeń i celu pracy, charakterystyki badanej grupy, opisu zastosowanym metod badawczych, przedstawienia wyników i dyskusji. Całość pracy zamknięta jest czterema wnioskami. Wykaz piśmiennictwa liczy 91 pozycji.

Wstęp w zwięzły i przejrzysty sposób przedstawia istotę podjętego problemu oceny ekspresji miRNA w guzach gleju wyściółkowego u dzieci. Autor rzeczowo charakteryzuje badane guzy zarówno w aspekcie klinicznym, zwracając jednocześnie uwagę na odmienności pomiędzy populacją dorosłych i dzieci. W dalszej części lek. Stefańczyk dokonuje charakterystyki molekularnej wyściółczaków. W ostatniej części wstępu autor zaznacza czytelnika z miRNA, jego budowę, funkcjami w komórkach oraz prawdopodobnym znaczeniem w onkogenezie. Należy podkreślić, iż dobór piśmiennictwa jest bardzo trafny i wskazuje na dobrą znajomość tematu. Zwraca uwagę także ogromna łatwość i przystępność z jaką autor rozprawy opisuje dane kliniczne i aspekty molekularne.

Grupa badana była złożona z 74 dzieci operowanych z powodu wyściółczaków, w tym 48 w II i 26 w III stopniu złośliwości wg WHO. Wszystkie dzieci były operowane w Klinice Neurochirurgii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki. Do badań molekularnych użyto fragmentów guzów pobranych w trakcie zabiegów neurochirurgicznych. Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi, natomiast analizy molekularne przeprowadzono w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Autor w sposób typowy scharakteryzował zastosowane metody badawcze, poczynając od izolacji materiału, poprzez syntezę cDNA, analizę obecności znanych podtypów molekularnych, aż do profilowania miRNA i walidacji uzyskanych wyników.

Dobór zastosowanych metody statystycznych i bioinformatycznych nie budzi zastrzeżeń i jest typowy dla tego typu analiz.

Autor wykazał, iż w badanych guzach profil ekspresji miRNA był związany ze stopniem złośliwości nowotworu, będąc jednocześnie wyższym w guzach anaplastycznych. W dalszej części spośród badanych na pełnej grupie walidacyjnej chorych miRNA, wyróżniono trzy (miR-17-5p, miR-19a, miR-106b), które korelowały ze stopniem złośliwości oraz dwa (miR-17-5p, miR-200a) związane z przebiegiem klinicznym. Wykonana jako kolejny etap badania analiza wieloczynnikowa ujawniła, iż niższa ekspresja miR-17-5p koreluje z dłuższym czasem przeżycia bez wznowy oraz dłuższym czasem przeżycia całkowitego. Co więcej, z przeprowadzonych analiz wynika iż niższe wartości ekspresji miR-200a, były także związane z dłuższym czasem przeżycia bez wznowy. Biorąc pod uwagę wyściółczaki lokalizujące się w obrębie tylnej jamy czaszki stwierdzono znamienne statystycznie związku pomiędzy ekspresją genu *EZH2* a wartościami ekspresji miRNA.

W dalszej części pracy autor dyskutuje uzyskane wyniki z aktualnym piśmiennictwem, które jest odpowiednio dobrane i obejmuje nowoczesną literaturę zagadnienia.

Na podstawie uzyskanych wyników lek. Łukasz Stefańczyk wyciągnął cztery wnioski odnoszące się ściśle do postawionych celów szczegółowych.

Praca, jak już wcześniej podkreślano, jest napisana w sposób bardzo rzetelny. Autor nie ustrzegł się jednak od niewielkich błędów, głównie o charakterze edytorskim.

Jak wynika z tabeli 10 poziom ekspresji miR-200a koreluje znamienne z czasem przeżycia wolnym od wznowy ($p=0,0217$), nie osiągając jednak znamiennego związku z przeżyciem całkowitym ($p=0,4707$). Niestety w czwartym wniosku podano, błędnie, iż „...ekspresja miR-200a [jest] związana z przeżyciem całkowitym...”.

Użyte na stronie 18 slangowe określenie „*fragmenty tkanek nowotworowych*” sugerowałbym zastąpić określeniem „*wycinki guzów*”. Zgodnie z przyjętym nazewnictwem tkanki dzielimy raczej na nerwową, łączną, nabłonkową etc. Wydaje się, iż określenia „*tkanka nowotworowa*” raczej powinno się unikać w oficjalnych opracowaniach.

Umieszczone w tekście ryciny 9, 10 i 12 są bardzo małe i przez to mało czytelne. Ich powiększenie pozwoliłoby na łatwiejsze zapoznanie się z uzyskanymi wynikami.

Powyższe uwagi mają jedynie znaczenie edytorskie i w żadnym razie nie ujmują wysokiemu poziomowi naukowemu pracy.

Reasumując, zagadnienie naukowe oraz tezy rozprawy doktorskiej lek. Łukasza Stefańczyka zostały sformułowane w sposób jasny. Przeprowadzona w sposób wnikliwy, analiza stanu wiedzy na podstawie dostępnych źródeł, w tym aktualnej literatury światowej świadczy o głębokiej i szczegółowej wiedzy autora na temat molekularnej etiopatogenezy, diagnostyki oraz leczenia dzieci z nowotworami gleju wyściółkowego. Autor w rozprawie osiągnął postawione cele posługując się właściwym doбором pacjentów oraz metod badawczych. Fakt interdyscyplinarności podejścia badawczego obejmującego nie tylko aspekty neurochirurgiczne, ale także molekularne potwierdza oryginalność rozprawy oraz świadczy o dojrzałości naukowej i klinicznej doktoranta. Tym bardziej, iż w dostępnym piśmiennictwie istnieje niewiele publikacji, które opisują profil ekspresji mikroRNA i jego znaczenie kliniczne w guzach gleju wyściółkowego u dzieci.

Uzyskane wyniki mogą mieć duże znaczenie w ewentualnej modyfikacji molekularnej klasyfikacji badanych nowotworów. Co więcej lepsze zrozumienie biologicznych mechanizmów nowotworzenia może przyczynić się do stworzenia celowanych, specyficznych terapii onkologicznych, które poprawią, wciąż nie satysfakcjonujące wyniki leczenia złośliwych wyściółczaków u dzieci.

Wnioskuje przeto do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie autora rozprawy – lek. Łukasza Stefańczyka – do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na bardzo wysoki poziom naukowy rozprawy oraz rzetelne i oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego wnioskuję do Wysokiej Rady o uznanie niniejszej rozprawy za wyróżniającą się.

Z poważaniem,

