

Dr hab. n. med. Bożena Jarosz
Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurochirurgii Dziecięcej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Dr K.Jaczeńskiego 8
20-954 Lublin
tel.kom +48 603 270 736
e-mail: bozenajarosz@poczta.onet.pl

Lublin, 2021.06.10

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr **RENATY GRUSZKI** pt.

„Analiza ekspresji mikroRNA z klastrów miR-17-92, miR-106b-25 i miR-106a-363 oraz genów z rodzin *MYC* i *E2F* w nowotworach mózgu u dzieci”

napisanej pod kierunkiem

dr hab. n. med. prof. UM Magdaleny Zakrzewskiej

Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) u dzieci zajmują drugie miejsce co do częstości występowania (po nowotworach układu krwiotwórczego-białaczkach) i stanowią około 25% wszystkich nowotworów w tej grupie wiekowej. Pomimo znaczącego postępu w diagnostyce i leczeniu, znajdują się u dzieci na pierwszym miejscu, jako przyczyna zgonu wśród chorób nowotworowych. Najczęściej występującymi nowotworami OUN u dzieci są: gwiaździak włosowatokomórkowy GI WHO (stanowi 21% dziecięcych guzów OUN w wieku do 14 r.ż. i 16% w wieku 15-19 r.ż.), rdzeniak zarodkowy GIV WHO (15-25%), natomiast mniej liczne, to wyściółczaki GII lub III WHO (2-9%). W literaturze brak pełnych danych na temat udziału cząsteczek mikroRNA (miRNA) klastra miR-17-92 (Onkomir-1) i jego molekularnych paralogów (klaster miR-106a-363 i miR-106b-25) w onkogenezie nowotworów wieku dziecięcego (dane są fragmentaryczne, dotyczą jednego z podtypów rdzeniaka i pojedynczych miRNA w pozostałych dwóch badanych guzach). Według danych z literatury, istnieją interakcje między rodziną genów *MYC*, rodziną genów *E2F* a klastrem miR-17-92, co do tej pory nie zostało zbadane w nowotworach OUN u dzieci.

W związku z powyższym, mgr Renata Gruszka w swojej rozprawie doktorskiej podjęła się niezwykle aktualnego i ważnego tematu, stanowiącego istotny aspekt w lepszym poznaniu i nowoczesnym rozumieniu patogenezy nowotworów OUN u dzieci (szczególnie w odniesieniu do genomowych mechanizmów regulacji) oraz poszukiwaniu biomarkerów, związanych typem histologicznym i stopniem złośliwości w tych nowotworach.

OCENA STRUKTURY ROZPRAWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska posiada formę bardzo starannego, jednostronnego wydruku w twardej oprawie, liczącego 79 ponumerowanych stron.

Po stronie tytułowej następuje 1-stronicowy „**Spis treści**”, przedstawiający jej strukturę. Rozprawę rozpoczyna „**Wykaz skrótów**” oraz 2-stronicowe „**Streszczenie**” w języku polskim i angielskim.

Następne 40 stron rozprawy stanowią trzy „**Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej**” (jedna przeglądowa, dwie oryginalne):

1. Gruszka R, Zakrzewska M. The oncogenic relevance of miR-17-92 cluster and its paralogous miR-106b-25 and miR-106a-363 clusters in brain tumors. *Int J Mol Sci.* 2018, 19:879. doi: 10.3390/ijms19030879;

IF= 3.687;

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: 90%;

Bibliografia: 97 pozycji z lat 2000-2018;

W pierwszej publikacji, bardzo obszerny przegląd literatury, Doktorantka rozpoczyna od informacji na temat niekodujących frakcji RNA, następnie omawia biogenezę i funkcje cząsteczek miRNA, aby następnie skupić się na znaczeniu klastra miR-17-92 (OncomiR-1) i jego paralogów (klastra miR-106b-25 oraz miR-106a-363) w procesie onkogenezy wybranych nowotworów mózgu: glioblastoma (GIV WHO), medulloblastoma (GIV WHO), ependymoma (GII / III WHO), pilocytic astrocytoma (GI WHO) oraz neuroblastoma.

2. Gruszka R, Zakrzewski K, Liberski PP, Zakrzewska M. microRNA interaction with MAPK and AKT pathways in paediatric brain tumours – preliminary results and review of the literature. *Folia Neuropathol.* 2020, 58:123-132. doi: 10.5114/fn.2020.96734;

IF= 1.278;

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: 70%;

Bibliografia: 43 pozycji z lat 2001-2019;

W drugiej publikacji Doktorantka, wraz z zespołem, przedstawia wstępne wyniki oceny ekspresji miR-17-5p i miR-20a (jako kluczowych przedstawicieli onkogenego klastra miR-17-92) oraz ich związek z aktywacją szlaków sygnałowych: PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK w 43 przypadkach dwóch najczęstszych guzów dziecięcych: rdzeniaku zarodkowego (14 przypadków) i wyściółczaku (16 przypadków GII; 13 – GIII) oraz dokonuje przeglądu piśmiennictwa na ten temat.

Poziom ekspresji miR-17-5p i miR-20a, wzrastał wraz ze stopniem złośliwości analizowanych przypadków, osiągając najwyższe poziomy w rdzeniakach.

3. Gruszka R, Zakrzewski K, Liberski PP, Zakrzewska M. mRNA and miRNA expression analyses of the *MYC/E2F/miR-17-92* network in the most common pediatric brain tumors. *Int J Mol Sci.* 2021, 22:543. doi: 10.3390/ijms22020543; IF= 4.556;
Wkład doktorantki w powstanie publikacji: 70%;
Bibliografia: 65 pozycji z lat 1998-2020;

W trzeciej publikacji Doktorantka, wraz z zespołem, bada ekspresję składników sieci *MYC/E2F/miR-17-92* i ich blisko spokrewnionych elementów, w tym członków rodzin *MYC* i *E2F* oraz miRNA dwóch paralogów miR-17-92: miR-106b-25 i miR-106a-363 w gwiazdziakach włosowatokomórkowych GI WHO (30 przypadków); podnamiotowych wyściółczakach GII WHO (30 przypadków) oraz rdzeniakach zarodkowych GIV WHO (30 przypadków).

Doktorantka stwierdziła najwyższą ekspresję genu *MYCN* oraz *E2F2* i równocześnie dodatnią korelację ze stopniem złośliwości, jak również typem nowotworu (najwyższą ekspresję odnotowała w rdzeniakach, następnie wyściółczakach, a najniższą w gwiazdziakach włosowatokomórkowych).

Ekspresja większości elementów klastrów: miR-17-92, miR-106a-363 i miR-106b-25, była podwyższona. Ekspresja miRNA również zależała od stopnia złośliwości i typu histologicznego nowotworu.

Kolejną część rozprawy stanowi **”Wprowadzenie”** na 5 stronach, z jedną kolorową ryciną, które w sposób zwięzły wprowadza czytelnika w tematykę. Doktorantka zwraca uwagę na odrębności dotyczące nowotworów OUN u dzieci, w odniesieniu do tychże u osób dorosłych, przedstawiając krótką charakterystykę nowotworów najczęściej występujących u dzieci. Krótko omawia niekodujące cząsteczki RNA (głównie pod kątem zaangażowania w proces kancerogenezy), ich geny docelowe, jak również interakcje ze szlakami sygnałowymi. Wprowadzenie Doktorantka kończy zdaniem, uzasadniającym wybór tematu swojej rozprawy doktorskiej.

Rozdział pt. **„Założenia i cele pracy”** zawiera 4 jasno określone i w pełni zrozumiałe szczegółowe cele pracy.

1. Ocena poziomów mikroRNA z klastrów miR-17-92, miR-106b-25 i miR-106a-363 w gwiazdziakach włosowatokomórkowych, rdzeniakach i wyściółczakach wieku dziecięcego.
2. Ocena ekspresji genów z rodzin *MYC* (*MYCC*, *MYCN*, *MYCL*) oraz genów z rodziny *E2F* (*E2F1*, *E2F2*, *E2F3*) w najczęstszych guzach mózgu u dzieci.

3. Ocena potencjalnych korelacji pomiędzy poziomami ekspresji analizowanych frakcji miRNA a genami z rodzin *MYC* oraz *E2F*.
4. Ocena znaczenia zmian ekspresji genów i miRNA w odniesieniu do wybranych cech klinicznych (typ histologiczny, stopień złośliwości).

Kolejny 2-stronicowy rozdział omawia „**Material i metody**”, wykorzystane w opublikowanych pracach dla osiągnięcia postawionych celów. Doktorantka dokonuje charakterystyki grupy badanej, opisuje analizę poziomu ekspresji genów z rodzin *MYC* i *E2F* oraz miRNA, a także zastosowane metody statystyczne, które są właściwe do podjętej problematyki i charakteru badanych zmiennych. Wszystkie badania zostały przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej UM w Łodzi.

Następny rozdział, zajmujący 3 strony, zawiera „**Wyniki**”, które w sposób systematyczny i syntetyczny zostały przedstawione w kolejnych podrozdziałach.

Przedstawiając wyniki analizy profilu ekspresji genów, Doktorantka, korzystając z bioinformatycznej bazy danych TargetScan, wytypowała potencjalne miRNA regulujące aktywowane geny w szlakach sygnałowych PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK.

Wyniki badania poziomu ekspresji miRNA z analizowanych klastrów, Doktorantka precyzyjnie przedstawia w odniesieniu do typów histologicznych ocenianych nowotworów oraz ich stopni złośliwości.

Wyniki analizy ekspresji genów z rodzin: *MYC* i *E2F* również Doktorantka odnosi do typu histologicznego oraz stopnia złośliwości nowotworów.

Na koniec, Doktorantka zamieszcza wyniki badania korelacji między ekspresją genów z rodzin *MYC* i *E2F* a miRNA, odwołując się w zakresie istotnych statystycznie układów gen-gen do odpowiednich publikacji, będących podstawą rozprawy doktorskiej. Nie stwierdziła silnych korelacji między ekspresją genów a miRNA, natomiast silne korelacje w układach miRNA-miRNA uznała jako pochodną wspólnego ich pochodzenia.

W rozdziale „**Dyskusja**” Doktorantka na pięciu stronach dokonuje oceny uzyskanych przez siebie wyników w kontekście doniesień innych autorów. Dyskusja przeprowadzona została przez Doktorantkę bardzo precyzyjnie, począwszy od omówienia profilu ekspresji genów, następnie określeniu najbardziej aktywowanych szlaków sygnałowych, analizie poziomów miRNA klastra miR-17-92 i jego paralogów oraz ekspresji genów bezpośrednio z nimi związanych, a na koniec analizie korelacji pomiędzy poszczególnymi analizowanymi elementami. Doktorantka w dyskusji wykorzystwała i właściwie zacytowała 46 pozycji spośród całego zgromadzonego piśmiennictwa.

„Wnioski”, wynikające z przeprowadzonych badań oraz dyskusji, Doktorantka formułuje w trzech twierdzących zdaniach:

1. Profilowanie ekspresji genów wykazało, że szlaki sygnałowe RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR charakteryzują się największą aktywnością w analizowanych guzach mózgu u dzieci.
2. We wszystkich badanych typach nowotworów, najwyższe poziomy ekspresji genów potwierdzono dla *E2F2*, *E2F1* oraz *MYCN*, co korelowało ze stopniem złośliwości i typem histologicznym.
3. Wykazano, że poziomy ekspresji miRNA z klastrów miR-17-92, miR-106b-25 i miR-106a-363 są podwyższone w analizowanej grupie nowotworów, co koreluje ze stopniem złośliwości badanych guzów oraz ich histologią.

Należy zwrócić uwagę, że powyższe trzy wnioski nie odnoszą się w sposób bezpośredni do postawionych wcześniej czterech celów pracy, jednak łącznie dają odpowiedź, którą należy uznać jako osiągnięcie wszystkich postawionych w pracy celów.

W kolejnym rozdziale zamieszczona jest „**Bibliografia**” załącznikowa, przedstawiona na 8 stronach, obejmująca 82 anglojęzyczne pozycje, ponumerowane i uporządkowane według kolejności cytowania w tekście. Prawidłowo cytowane publikacje pochodzą z lat 2001-2020 i są ściśle związane z zagadnieniami przedstawianymi w rozprawie.

W dalszej części rozprawy, po bibliografii, doktorantka dołączyła „**Oświadczenie współautorów**” (1-stronicowe, osobne dla każdej publikacji), dotyczące szacunkowego udziału w realizacji tematu każdego ze współautorów.

Ostatnie 3 strony rozprawy stanowi „**Uchwała Komisji Bioetycznej o projekcie eksperymentu medycznego**” UM w Łodzi.

Na koniec dodam, że jako patomorfolog i neuropatolog, czynnie, zarazem bardzo szeroko uczestniczący w codziennej diagnostyce histopatologicznej (nie tylko nowotworów OUN, ale i pozostałych narządów) oraz jako wieloletni członek zespołu genetyczno-kliniczno-patomorfologicznego, biorący udział w kwalifikacji pacjentów z nowotworami glejowymi do badań genetycznych (zalecanych przez WHO) i pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca do leczenia ukierunkowanego molekularnie lub immunoterapii, widzę obecnie dużą potrzebę, wręcz konieczność, tworzenia właśnie takich zespołów. Pozwoli to na szybkie, sprawne diagnozowanie histopatologiczne i genetyczne pacjentów, a następnie przekazywanie ich do dalszych etapów leczenia. Dzisiaj patomorfolodzy nie są w stanie funkcjonować bez bliskiej współpracy z biologami molekularnymi / genetykami. W coraz większej liczbie nowotworów, rozpoznanie histopatologiczne, bez badań genetycznych, jest niepełne i tylko na jego podstawie nie ma możliwości ustalenia dla pacjenta dalszego, celowanego leczenia.

Mam nadzieję, że mgr Renata Gruszka będzie kontynuowała swoje badania, aby w przyszłości dostarczyć nam – patomorfologom / neuropatologom biomarkerów, które będą uznanymi czynnikami prognostycznymi, czy predykcyjnymi w nowotworach OUN, bądź będą stanowiły cel dla terapii ukierunkowanych molekularnie.

PODSUMOWANIE RECENZJI I WNIOSEK

Podsumowując stwierdzam, że całość rozprawy doktorskiej mgr Renaty Gruszki zatytułowanej „Analiza ekspresji mikroRNA z klastrów miR-17-92, miR-106b-25 i miR-106a-363 oraz genów z rodzin *MYC* i *E2F* w nowotworach mózgu u dzieci”, napisanej pod kierunkiem promotora dr hab. n. med. prof. UM Magdaleny Zakrzewskiej, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dyscyplinie nauk medycznych, wykazuje obszerną ogólną wiedzę teoretyczną doktorantki w tej dziedzinie oraz umiejętności do realizowania programów naukowych.

W związku z tym, że przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), wnioskuję do **Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** o dopuszczenie **mgr Renaty Gruszki** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zwracam się równocześnie do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Renaty Gruszki** z powodu dużej wagi i unikatowości podjętego tematu, zrealizowania go ze szczególną starannością oraz uwzględnieniem nowoczesnych metod badawczych.



dr hab. n. med. Bożena Jarosz

Lublin, 10 czerwca 2021 r.