

Łódź dn. 14.06.2021

Emilia Nowosławska

Prof. nad. Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki

Klinika Neurochirurgii

Rzgowska 281/289

93-338 Łódź

## **Recenzja pracy doktorskiej magister Renaty Gruszki**

**Promotor Prof. dr hab. n medycznych Magdalena Zakrzewska**

*Analiza ekspresji mikro RNA z klastrów miR-17-92, miR-106b-25 i mir-106a-363  
oraz genów z rodziny MYC i E2F w nowotworach mózgu u dzieci*

Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii

Katedry Onkologii

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

### **Ocena formalna pracy**

Praca doktorska magister Renaty Gruszki została przedstawiona do oceny jako osiągnięcie naukowe pod postacią trzech opublikowanych w czasopiśmiennictwie anglojęzycznym artykułów. Powyższe artykuły złożyły się na opracowaną w wersji drukowanej rozprawę poprzedzoną wstępem i zakończoną częścią zwięźdzającą zatytułowaną wprowadzeniem. W moim subiektywnym przekonaniu rozdział ten z racji na usytuowanie w rozprawie powinien raczej być zatytułowany podsumowanie. Rozdział ten w

rzeczywistości systematyzuje całość analizowanego zagadnienia i stanowi podstawę do wyprowadzenia wspólnych dla prezentowanych artykułów wniosków. Całość poprzedzona jest streszczeniem zarówno w języku polskim i angielskim. Każdy z prezentowanych artykułów ilustrowany jest niezależnie tabelami i rycinami pozwalającymi na bardziej dogłębne zrozumienie prezentowanej tematyki. Na końcu rozprawy została zawarta opinia Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi potwierdzająca przeprowadzenie badań naukowych w sposób zgodny z zasadami sztuki. Dodatkowo rozprawa zawiera oświadczenia współautorów publikacji dowodzących dominującego wpływu magister Renaty Gruszki na kształt publikowanych artykułów.

Uważam, że forma prezentacji pracy spełnia wymogi przygotowania dzieła naukowego pozwalającego na dalszą ocenę merytoryczną przesłanego mi materiału. Dodatkowo na uwagę zasługuje zwięzły a zarazem bogaty w treść sposób prezentacji, przedstawiony w sposób przejrzysty i zrozumiały.

## **Ocena merytoryczna**

### ***Pierwszy z prezentowanych artykułów***

The Oncogenic Relevance of miR-17-92 Cluster and Its Paralogous miR-106b-25 and miR-106a-363 Clusters in Brain Tumors. Renata Gruszka , Magdalena Zakrzewska

Prezentowana praca ma charakter poglądowy, a więc stanowi konieczny wstęp wyposażający czytelnika w wiedzę pozwalającą zrozumieć pozostałe artykuły składające się na osiągnięcie naukowe. Zwięzły i przejrzysty styl umożliwia orientację jakie zadania badawcze postawiła przed sobą autorka. Dodatkowo zawiera wyjaśnienie kluczowych informacji , które nawet mało wprawnemu czytelnikowi umożliwiają zrozumienie poruszanych zagadnień. Zwraca uwagę konsolidacja wyjaśnianych pojęć z zakresu badań molekularnych do niezbędnego minimum , które ułatwia zapoznanie się z treścią prezentowanego artykułu. Przede wszystkim należy docenić dobór tematyki dotyczącej badań molekularnych nad onkogenezą i przedstawienie jej w sposób zrozumiały , przejrzysty i budzący zainteresowanie. Zagadnienie, które zwróciło uwagę magister Renaty Gruszki zostało wybrane ze względu na istotność wpływu na problematykę kliniczną nowotworów mózgu u dzieci. Wprowadzenie w tematykę biologii molekularnej zostało ułatwione poprzez przemyślaną sekwencję rozdziałów. Istotność biologii molekularnej niekodującego RNA z grupy miR-17-92 jest w sposób mocny uzasadniona jego wpływem na indukcję pierwotnych guzów mózgu takich jak Glioblastoma , które stanowią nadal wyzwanie dla medycyny , gdyż pomimo wdrożenia całego spektrum leczenia onkologicznego jak leczenie chirurgiczne, radioterapia i chemioterapia przeżycie

chorych nie przekracza 12- 15 miesięcy. Dobrze dobrane zostało piśmiennictwo dokumentujące rolę miR-17-92 w rozwoju pierwotnych guzów mózgu. Dokonany przegląd piśmiennictwa, ze względu na nowatorski charakter poruszanych tematów jest dodatkowym walorem pracy. W podsumowaniu została trafnie przedstawiona synteza kierunków badań naukowych z zakresu biologii molekularnej dotyczącej onkogenezy nowotworów. MikroRNA może w przyszłości stanowić podstawę do dalszych modyfikacji klasyfikacji pierwotnych guzów mózgu, która pozwoliłaby powiązać dobór decyzji terapeutycznych ze strukturą molekularną zmiany rozrostowej.

### ***Drugi z prezentowanych artykułów.***

MicroRNA interaction with MAPK and AKT pathways in paediatric brain tumours – preliminary results and review of the literature. Renata Gruszka, Krzysztof Zakrzewski, Paweł P. Liberski, Magdalena Zakrzewska

Po dokonaniu wstępu poglądowego dotyczącego biologii molekularnej autorka rozwija zagadnienie w oparciu o badania oryginalne. Kontynuuje myśl przewodnią zawartą w artykule poglądowym o istotnej roli w klasyfikacji pierwotnych guzów mózgu w oparciu o rolę mikroRNA zawartych w klasterze onkogenów miR-17-5p i miR-20a w klinice nowotworów medulloblastoma i ependymoma. W tej pracy mamy do czynienia z analizą własnego materiału. Podobnie jak w artykule poglądowym podziw budzi zwięzły i przejrzysty sposób przedstawienia prezentowanego zagadnienia. MikroRNA stanowiący niekodujący fragment pojedynczej nici nukleotydowej wpływającej na aktywność genów i szlaki wewnątrzkomórkowe. MikroRNA w mechanizmie epigenetycznej kontroli blokuje translację poszczególnych fragmentów mRNA nie dopuszczając do permanentnej modyfikacji DNA. Autorka upatruje w badaniu tych procesów możliwość opracowanie terapii nowotworów pierwotnych mózgu poprzez wpływanie na ekspresję mikroRNA. Silny związek z poglądową częścią osiągnięcia naukowego podkreśla kontynuacja rozważań dotyczący mikroRNA z klasteru miR-17-92 zwany Oncomirem z racji na silny jego związek z onkogenezą. Co ma związek z jego wpływem na wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe spotykane w pierwotnych nowotworach mózgu mianowicie RAS/MAPK/ERK -związany z aktywacją mitozy poprzez kinazę proteinową oraz PI3K/AKT/mTOR. Wymienione ścieżki sygnałowe pełnią kluczową rolę patogenezie wielu pierwotnych nowotworów mózgu. Obie ścieżki aktywują receptor kinazy tyrozynowej. Na podkreślenie zasługuje spójność poruszanych zagadnień w pracy. Należy zwrócić uwagę na warsztat dorównujący swoim poziomem badaniom światowym. Materiał kliniczny zgromadzony w oparciu o jeden ośrodek jest dość imponujący stanowi go 43 chorych. Zwraca uwagę staranna selekcja badanego materiału. Przedmiotem badania była ekspresja miR-17-5p i miR-20a w zależności od rozpoznania histopatologicznego nowotworu ependymoma i medulloblastoma. Zwraca uwagę przejrzystość

osiągnięta poprzez prezentację graficzną materiału, która pomimo mnogości danych w sposób jasny przedstawia wpływ mikroRNA na aktywację genów w obu badanych ścieżkach sygnałowych. Opracowanie graficzne wskazuje na dogłębne zrozumienie zagadnienia. W oparciu o materiał własny potwierdzono wpływ mikroRNA z clusteru Oncomir 1 na ścieżki sygnałowe mające wpływ na proliferację komórkową w nowotworach. Dodatkową wartością oryginalną pracy stanowi fakt, że na materiał kliniczny został pobrany od chorych poniżej 18 roku życia. Badania w oparciu o jednoośrodkowy materiał potwierdziły wpływ badanego mikroRNA na proliferację komórkową w nowotworach złośliwych.

Trzeci z prezentowanych artykułów

MRNA and miRNA Expression Analyses of the MYC/E2F/miR-17-92 Network in the Most Common Pediatric Brain Tumors. Renata Gruszka, Krzysztof Zakrzewski, Paweł Piotr Liberski and Magdalena Zakrzewska

Ostatni z wymienionych artykułów jest również poświęcony analizie czynników wpływających na podział komórkowy, który w przypadku zaburzenia cyklu rozwojowego może przebiegać w sposób niekontrolowany stanowiąc istotę rozwoju nowotworu w organizmie. Jedną z przyczyn prowadzących do takiego zaburzenia może być nieprawidłowa ekspresja genów. Współczesna wiedza wskazuje, że za ten stan może być odpowiedzialna interakcja pomiędzy mikroRNA i messengerRNA. Autorka artykułu dokonała analizy jednego z możliwych molekularnych czynników inicjujący onkogenezę w ośrodkowym układzie nerwowym. Czynnikiem wybranym na potrzeby artykułu jest wzajemne sprzężenie zwrotne w ekspresji genów MYC i E2F. Istotną rolę w tym sprzężeniu odgrywają czynniki mikroRNA z grupy miRNA 17-92. W artykule dowodzi istotnego wpływu na wzajemną relację wywierany przez mikroRNA: miR-17-5p, miR-20a. Czynniki te zostały wybrane przez autorkę po analizie aktualnego piśmiennictwa poświęconego zagadnieniom molekularnym rozwoju nowotworów. Uwagę jej zwrócił podkreślany przez wielu badaczy wpływ mikroRNA wchodzący w skład grupy Oncomir 1 na onkogenezę guzów litych. Dowiedziony wpływ tej rodziny genów skłonił autorkę do przebadania jego wpływu na rozwój najczęstszych nowotworów tylnego dołu czaszki u dzieci. Swoją uwagę skupiła na najczęściej występujących nowotworach zgodnie z klasyfikacją WHO. Rozpoczynając analizę od najłagodniejszego z nich jakim jest Astrocytoma pilocyticum klasyfikowany w wyżej wymienionej skali jako stopień pierwszy. Kolejną ze zmian rozrostowych jest Ependymoma. W skali złośliwości nowotworów pierwotnych ośrodkowego układu nerwowego oceniana jako drugi lub trzeci stopień w zależności od stopnia zezłośliwienia. Ocenie podlegał również najbardziej złośliwych nowotworów Medulloblastoma klasyfikowany jako IV stopień WHO. W artykule dowiodła szczególnie wysokiej ekspresji genów MYCN oraz E2F2 pozostających we wzajemnej regulacji o

charakterze sprzężenia zwrotnego dodatniego. Autorka wykazała pozytywną korelację pomiędzy ekspresją wymienionych genów, a stopniem złośliwości wymienionych powyżej nowotworów. W świetle tego wniosku dokonała także analizy poziomu ekspresji miRNA wchodzących w skład grupy miRNA 17-92. Wykazała wysoką ekspresję mi17-5p i miR-20a w nowotworach o wyższym stopniu złośliwości WHO II i IV. Zwróciła uwagę że poziom w grupie nowotworów łagodnych zbliżonym był do grupy kontrolnej. Artykuł ten wykazał szczególnie dobrą orientację magister Renaty Gruszki w bardzo rozbudowanym dziale nauki jakim jest biologia molekularna nowotworów nie zawężając się jedynie do nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. Praca ta wnosi istotny wkład w biologię molekularną nowotworów u dzieci. Tym samym zrównuje się ze światowymi trendami analizy chorób nowotworowych w oparciu o biologię molekularną ludzkiego genomu. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, na który zwróciłam już uprzednio uwagę, przejrzystego stylu wypowiedzi magister Renaty Gruszki. Czyni to podejmowaną przez nią tematykę bardziej zrozumiałą. W moim przekonaniu możliwe to jest jedynie dzięki dogłębnej znajomości podejmowanego zagadnienia. Pozwala to autorce systematyzować wiedzę pod względem znaczenia dla rozwiązywania problemów diagnostycznych i terapeutycznych. Wyprowadzone przez nią dobrze udokumentowane wnioski mają istotne znaczenie kliniczne. Nie tylko pozwalają dokonać jednoznacznej identyfikacji analizowanych nowotworów ale mogą w wyniku dalszych badań stanowić istotny etap w zrozumieniu ich biologii molekularnej i tym samym przyczynić się w przyszłości do opracowania leczenia przyczynowego zmian rozrostowych w tak trudnym środowisku jakim jest ośrodkowy układ nerwowy, ze względu na istniejącą barierę krew mózg. Magister Renata Gruszka tym samym dowodzi dojrzałości swojego warsztatu badawczego. Decyduje o tym nie tylko sam charakter podejmowanego zagadnienia, ale także sposób poszukiwania odpowiedzi na stawiane pytania. Wnioski są sformułowane w sposób przejrzysty i zrozumiały, co do ich znaczenia klinicznego i istotności w rozumieniu analizowanego procesu.

### ***Wprowadzenie***

Czytelnik ma na końcu możliwość zapoznania się z rozdziałem zapisany w języku polskim określonym jako wprowadzenie. W mojej opinii można by go określić jako podsumowanie, co już podkreślałam w części recenzji dotyczącej formy dzieła naukowego. Układ treści w wersji drukowanej uważam za celowy. W kolejnych publikowanych artykułach czytelnik jest systematycznie wprowadzany w rozwijające się w sposób logiczny w treści zagadnienie. Wprowadzenie w sposób przekonujący uzasadnia dobór hipotez badawczych w oparciu o aktualne piśmiennictwo światowe. Dobór tematu można uznać za nowatorski. Autorka zajęła się biologią molekularną najczęściej występujących nowotworów u dzieci. W dobrze hipotez badawczych oparła się na publikacjach dotyczących nowotworów u dorosłych spoza ośrodkowego układu nerwowego. Doboru dokonano w oparciu o

szlaki sygnałowe uczestniczące najczęściej w ich onkogenezie . Wytypowane zostały do analizy onkogeny biorące udział w proliferacji i apoptozie komórek oraz w angiogenezie. Ten dobór otworzył również drogę do omówienia zagadnień klinicznych dotyczących biologii molekularnej nowotworów ośrodkowego układu nerwowego u dzieci. Bardzo istotne jest zarysowanie we wprowadzeniu szerszego tła znaczenia badań molekularnych w diagnostyce nowotworów spoza ośrodkowego układu nerwowego. Zarys szeroko rozumianych badań molekularnych pozwala dodatkowo uwypuklić wagę podejmowanego zagadnienia .Autorka skupiła się na dogłębnej analizie wzajemnych zależności istniejących w funkcyjnej sieci regulacyjnej Myc/E2F/miR-17-92 od której zależy cykl komórkowy. Przy wyszczególnieniu tematu badawczego nie tylko brano pod uwagę charakter histopatologicznych pierwotnych zmian rozrostowych u dzieci, ale także ich lokalizację co dodatkowo podwyższa wartość pracy. Pozwala na wyprowadzenie konkluzyjnych wniosków. Wskazuje że magister Renata Gruszka śledzi na bieżąco literaturę dotyczącą podejmowanego przez nią zagadnienia.

### *Podsumowanie*

Przechodząc do podsumowania przedstawionego do oceny dzieła naukowego składającego się z trzech opublikowanych artykułów oraz spajającego je wprowadzenia w postaci rozprawy w języku polskim stwierdzam, że praca zasługuje na wysoką ocenę z wielu aspektów. Rozpoczynając od stopnia znajomości podejmowanego zagadnienia. We wprowadzeniu autorka powołała się na łącznie 82 publikację ,które ukazały się drukiem w ostatnim okresie. Jest to miarą pracy jaki musiała włożyć w przygotowanie doboru tematu badawczego. Moim zdaniem dowodzi do pasji naukowej i jest potwierdzeniem rzetelnego warsztatu badawczego. Pomimo formy prezentowania pracy w postaci trzech niezależnych artykułów, czytelnik nie ma poczucia braku spójności podczas lektury. Artykuły nawet w zaprezentowanej kolejności rozwijają zagadnienie sprawdzania hipotez badawczych w sposób celowy pozwalający na pełne zrozumienie tematu. Selekcja w prezentacji materiału, tabel i wykresów dowodzi również głębokiej analizy wyników badań. Świadczy o zainteresowaniu i zrozumieniu wagi podejmowanego tematu. Całości dopełniają trzy kluczowe wnioski , które mają istotny wpływ na pogłębienie wiedzy z zakresu onkogenezy pierwotnych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego u dzieci. Sposób opracowania podejmowanego zagadnienia znalazł także akceptację w komitetach redakcyjnym pism o zasięgu międzynarodowym i wysokich wskaźnikach cytowalności, które opublikowały cykl artykułów. W aneksie zostało udokumentowane przeprowadzenie prac badawczych zgodnie z obowiązującymi aktualnie zasadami bioetycznymi czego wyrazem jest dołączona akceptacja Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi opatrzona numerem RNN/122/17/KE z dnia 11 kwietnia 2017 roku. Dodatkowo aneks zawiera oświadczenia współautorów składających się na dzieło naukowe publikacji o dominującym wpływie

magister Renaty Gruszki na ostateczny kształt artykułów stanowiących przedstawione do oceny dzieło naukowe.

Całokształt ocenionego przeze mnie materiału uprawnia mnie do przedstawienia Wysokiej Radzie Naukowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi rekomendacji do dopuszczenia magister Renaty Gruszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a także wnioskuję o wyróżnienie pracy ze względu na wagę podejmowanego zagadnienia, istotności otrzymanych wniosków i dojrzały warsztat badawczy.

*Emilia Nowostawska*

Dr hab. n. med.  
*Emilia Nowostawska*  
specjalista neurochirurg  
9479325