

Warszawa, dn. 19.07.2023

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. med. Mateusza Bilskiego

**p.t. Ekspresja składowych rodziny miR-200 jako czynnik
predykcyjny przeżycia chorych na glejaki mózgu
WHO G2 i WHO G3**

Ocena wyboru tematu dysertacji:

Wybrany przez Doktoranta temat doktoratu jest interesujący i może być ważny z praktycznego punktu widzenia.

Realizacja zamierzonych w pracy celów nie była organizacyjnie łatwa, wymagała zdobycia środków na wykonywanie analiz oraz wielu działań celem skoordynowania badań. Autorowi należy pogratulować, że to się udało.

Jak Autor szeroko wyjaśnia, uzasadniając podjęcie tematu pracy, poszukiwanie dalszych czynników molekularnych, mających wpływ na przeżycie chorych na glejaki mózgu jest przedmiotem licznych badań. Ekspresja składowych rodziny miR-200 jest potencjalnie takim czynnikiem.

Oceniam więc podjęcie tematu dysertacji przez Doktoranta jako interesujące i wpisujące się w nurt aktualnych badań nad glejakami mózgu.

Układ pracy: Przedstawiona mi do oceny rozprawa ma układ typowy dla tego typu opracowań. Obejmuje 117 stron maszynopisu w układzie typowym, wstęp, cele pracy, materiały i metoda, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenia, piśmiennictwo i bardzo przydatny wykaz skrótów. Terminologia użyta w pracy

jest poprawna. Mam pewną wątpliwość, co do tytułu pracy, o czym napiszę w części oceniającej wyniki. W pracy nie ma zbędnych informacji, jej układ jest przejrzysty.

We **Wstępie** Doktorant omawia zagadnienia dotyczące epidemiologii, biologii, patologii i czynników rokowniczych glejaków WHO CNS G2 i WHO CNS G3. Szczególnie szeroko omawia zagadnienia znaczenia ekspresji cząstek rodziny miR-200 w glejakach WHO CNS G2 i WHO CNS G3 i ich potencjalny wpływ na odpowiedź na radioterapię oraz leczenie systemowe. Jest to zrozumiałe w kontekście, że to właśnie ekspresja cząstek rodziny miR-200 stanowi temat badania. Omówienie to jest oparte na najnowszej wiedzy w tej dziedzinie i świadczy o dużej wiedzy Doktoranta w tym zakresie. Krótko i rzeczowo uzasadnione jest podjęcie tematu dysertacji.

Drobna uwaga: na str. 27, L. 16; powinno być napisane w Tabeli 4, a nie 6.

Cel pracy:

Hipotezę badawczą autor sformułował jako: „Zmiany w poziomie względnej ekspresji cząstek rodziny miR-200 modulują prognozę pacjentów z rozpoznaniem glejaków mózgu WHO G2 i WHO G3 pod względem przeżycia całkowitego.”

Przyznam, że mam problem ze sformułowaniem „...modulują prognozę pacjentów... pod względem przeżycia całkowitego”. Myślę, że chodzi o wpływ na rokowanie pacjentów albo wpływ na przeżycie całkowite. To nie jest zarzut, ale osobiście myślę, że takie ozdobniki rozmywają treść.

Następnie Autor precyzuje w 5 punktach, jak będzie sprawdzał tę hipotezę: 1: Ocena ekspresji składowych rodziny miR-200. 2. Ocena korelacji tych składowych z poszczególnymi czynnikami kliniczno-patologicznymi. 3. Ocena wpływu rokowniczego tych składowych na przeżycie całkowite. 4. Opracowanie modelu predykcyjnego przeżycia opartego na sygnaturze składowych całej

rodziny miR-200. 5. Opracowanie zintegrowanego modelu predykcyjnego przeżycia w oparciu o składowe rodziny miR-200 oraz cechy kliniczno-patologiczne.

Cele pracy są ambitne i oczywiście aby zbudować model predykcyjny jak w punkcie 4 i 5 należało zrealizować cele 1-5. Badanie uważam za właściwie zaplanowane.

W rozdziale **Material i Metoda** Doktorant opisał kryteria włączenia do badania i wyłączenia z niego. Szczegółowo, co jest na pewno bardzo cenne ze względu na temat pracy opisał metody przygotowania tkanek do badania, poszczególne metody oceny patologicznej materiału z opisem badania ekspresji składowych rodziny miR-200. Oceny metodyki badań patologicznych się nie podejmuję, gdyż brak mi w tej dziedzinie kompetencji.

Autor krótko opisał metody statystyczne użyte w pracy, może bardziej skrótowo, niż czyni się to zwykle, jednak ja odnalazłam tam wszystkie potrzebne mi informacje.

Mam 3 uwagi do tej części pracy:

1. Autor pisze, że „OS zdefiniowano jako czas przeżycia całkowitego od rozpoznania choroby do zgonu pacjenta”. Cenne jest zdefiniowanie OS, jednak termin „rozpoznanie choroby” też powinien być sprecyzowany dla potrzeb tego badania. Czy chodziło o dzień operacji, rozpoznania guza mózgu w badaniach obrazowych, uzyskanie rozpoznania histopatologicznego, początek objawów? To ważne w przypadku glejaków wysokozróżnicowanych, które stanowią przedmiot badania, gdyż w tych przypadkach od początku objawów, a nawet uzyskania obrazów radiologicznych do decyzji o operacji może upłynąć długi czas, nawet kilkuletni. To może wpływać na wyniki. Oczywiście w tych

przypadkach wyznaczenie tej cezurę, od której liczymy OS jest bardzo ważne.

2. Kryteria wyłączenia nie mogą być prostym odwróceniem kryteriów włączenia, bowiem jeśli włączani są pacjenci w wieku 20-80 lat, to nie musimy pisać, że jak pacjent miał lat 19 to był wyłączany. Można ewentualnie napisać, że niespełnienie któregoś z kryteriów włączenia stanowiło kryterium wyłączenia. Oczekiwałabym od opisu kryteriów wyłączenia uzupełnienia informacji zawartych w kryteriach włączenia, np., czy nawrót guza mózgu nie był przypadkiem kryterium wyłączenia z badania (nie ma o tym informacji).
3. **BARDZO WAŻNE!** Stawiając sobie za cel zbudowanie modelu predykcyjnego przeżycia należy precyzyjnie opisać wszystkie składowe tego modelu. Jest to szczególnie ważne przy tak heterogennym materiale, jakim dysponuje Autor pracy. Zabrakło mi informacji, w jaki sposób oceniano objętość guza pierwotnego. Rozumiem, że było to wyznaczane na podstawie materiału retrospektywnego. Czy było to robione na podstawie MRI przedoperacyjnego, jakie sekwencje brano pod uwagę, gdyż w tym przypadku mamy do czynienia często z niekontrastującymi się zmianami; czy wgrywano te badania do jakiegoś systemu planowania radioterapii i tak wyznaczano objętość guza pierwotnego, czy traktowane te nieregularne zmiany jako bryły i wyznaczano objętość na podstawie 3 wymiarów i kto to robił (radioterapeuta, radiolog, neurochirurg)? Tego typu oceny mogą być obciążone dużym ryzykiem błędu. Dodatkowo powinna być opisana metoda definiowania CTV. Jak wiemy istnieje zjawisko „interobserver variability” w definiowaniu obszarów tarczowych w radioterapii. Myślę, że w przypadku CTV w wysokozróżnicowanych glejakach mózgu może to być bardzo istotny problem. Jeśli tę zmienną zdecydował się badacz wprowadzić w model prognostyczny, to wymaga ona bardzo ścisłego zdefiniowania i sprawdzenia czy w latach objętych

badaniem nie zmieniały się zasady konturowania w ośrodku. Czy wszyscy pacjenci mieli MRI do planowania i co stanowiło CTV? Jakiego stosowano marginesy? Rozumiem z opisu grupy, że sposób leczenia pooperacyjnego był bardzo heterogenny. Niektórzy pacjenci nie byli napromieniani, czy oni też mieli wyznaczony CTV i na jakiej podstawie, czy byli wyłączeni z modelu? Obawiam się, że te informacje mogą nie być ściśle i jeśli tak jest, to nie należało tych zmiennych włączać do modelu.

Wyniki: Doktorant szczegółowo na 24 stronach przedstawia wyniki swojego badania. Załączone tabele i wykresy są bardzo przydatne, gdyż dobrze ilustrują i pozwalają szybciej zrozumieć wywód. Bardzo przydatne jest też w kontekście złożonej i rozbudowanej materii badania zestawienie wyników na końcu tego rozdziału. Autorowi należy tu pogratulować umiejętności jasnego przedstawienia swojego wyводу. Z zestawienia wyników wnioskuję, że Autor zrealizował postawione sobie cele badania.

Wykazał istotną różnicę we względnej ekspresji składowych rodziny miR-200 pomiędzy tkanką glejaków mózgu WHO G2 i WHO G3 oraz towarzyszącą tkanką nienowotworową. Istotne obniżenie względnego poziomu ekspresji w tkance nowotworowej zaobserwowano w przypadku składowych miR-200b-5p, miR-200c-3p, miR-141-3p.

Wykazał, że brak obecności delekcji 1p19q jest istotnie korelował z wyższym poziomem ekspresji składowej miR-200a-5p. Nie było różnicy względnego poziomu ekspresji składowych rodziny miR-200 w zależności od płci, obecności mutacji IDH1, zakresu resekcji, objętości guza i wykazano jedynie trend zmienności w zależności od lokalizacji dominującej masy guza w zakresie poszczególnych płatów mózgu. Stwierdził wyższy względny poziom ekspresji składowej miR-200c-3p w tkance glejaków mózgu WHO CNS G2 w porównaniu do glejaków mózgu WHO CNS G3. Lepsze rokowanie w odniesieniu do 2- i 5-letniego OS było związane z wyższą względną ekspresją

miR-200a-3p, miR-141-3p w tkance guza. Lepsze rokowanie w odniesieniu do 2- i 5-letniego OS było związane z niższą względną ekspresją miR-200a-5p, miR-200c-5p, miR-429 w tkance guza.

Doktorant opracował model predykcyjny przeżycia chorych na glejaki mózgu WHO G2 i WHO G3 oparty na sygnaturze składowych całej rodziny miR-200, uzyskując stosunkowo wysokie wartości ROC.

Dodatkowo opracował finalny, zintegrowany model predykcyjny przeżycia pacjentów z glejakami mózgu WHO CNS G2 i WHO CNS G3 w oparciu o składowe rodziny miR-200 oraz cechy kliniczne.

W finalnie opracowanym modelu predykcyjnym przeżycia pacjentów, zintegrowanym z cechami klinicznymi, najsilniejszymi predyktorami przeżycia pacjentów okazały się składowa miR-200a-5p, miR-200b-3p, miR-200c-5p, miR-141-3p, miR-429 oraz objętość guza ($\sqrt{\text{cm}^3}$) oraz CTV.

Mam pytanie do Doktoranta w związku z użytym słownictwem. Wiem, że w języku angielskim, używając określenia „predictive model of OS” rozumie się często, że chodzi o model prognostyczny OS i poszczególne składowe modelu to „predictors”. Może to być jednak trochę mylące, gdyż zwykle w piśmiennictwie czynniki prognostyczne odnoszą się ogólnie do przeżycia, a czynniki predykcyjne mają określić związek danej cechy z prawdopodobieństwem korzyści z określonego leczenia, np. z zastosowania chemioterapii pooperacyjnej. W tym kontekście tytuł pracy jest również trochę mylący, gdyż zatytułowanie pracy jako „Ekspresja składowych rodziny miR-200 jako czynnik predykcyjny przeżycia chorych na glejaki mózgu WHO G2 i WHO G3” sugerował, że będzie badany wpływ ekspresji składowych rodziny miR-200 na wyniki OS w zależności od zastosowania poszczególnych metod leczenia. Dlaczego nie użyto po prostu sformułowań „model prognostyczny”, „czynniki prognostyczne”?

Dyskusja: Ogólnie, zaprezentowane omówienie wyników świadczy o dużej znajomości tematyki przez Autora. Omawia uzyskane wyniki, porównując je z danymi z aktualnego piśmiennictwa. O krytycznym umyśle Doktoranta świadczy rozdział „mocne i słabe strony przeprowadzonego badania”. Myślę, że najmocniejszą stroną tej pracy jest wprowadzenie w zespole nowego, zintegrowanego podejścia do charakterystyki molekularnej glejaków mózgu.

Słabą stroną, o której Autor wprost nie wspomniał jest b. duża heterogenność badanej grupy, co przy jej małej liczebności, oraz bardzo dużej liczbie porównań może podważać wartość uzyskanych wyników. Istnieje przy tych ograniczeniach bardzo duże ryzyko uzyskania jakiegoś wyniku przez przypadek („*statistical hazard*”). Może zastosowanie jakiejś metody zmniejszającej ograniczenie wynikające z wielokrotności uzyskanych porównań np. metody Bonferroni’ego zwiększyłoby wiarygodność uzyskanych wyników.

Dodatkowo, jestem ciekawa, czy Doktorant jest w stanie wymieni z pamięci, która składowa rodziny miR-200 na co wpływa i z czym jest związana. Duża liczba zmiennych, które należy brać pod uwagę, stawia praktyczne zastosowanie opracowanego modelu pod znakiem zapytania.

Dodatkowo, o czym już pisałam w części oceniającej rozdział dotyczący metodyki pracy, mam dużą wątpliwość, czy objętość guza i CTV, jeśli nie miały precyzyjnej, ściśle zdefiniowanej oceny, powinny być włączane do modelu.

Dysertacja kończy się sformułowaniem sześciu **Wniosków** wynikających z przeprowadzonych badań i analizy uzyskanych wyników.

Piśmiennictwo zawiera 180 właściwie dobranych pozycji, bezpośrednio odnoszących się do omawianych w pracy zagadnień. Jedynie z recenzenckiego obowiązku muszę zwrócić uwagę na brak edytorskiej jednolitości w tym zakresie, pisma są zapisywane w różny sposób, interpunkcja też nie jest jednolita.

Podsumowując, przedstawioną mi do recenzji pracę, przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Uważam, że jest ona wartościowa i na pewno przeprowadzenie tego badania rozwinęło umiejętności prowadzenia pracy naukowej Doktoranta. Dziękuję Wysokiej Radzie za danie mi możliwości recenzowania tej ciekawej pracy. Mimo że (jak każdą pracę) można by ją w pewnych aspektach ulepszyć i niektóre kwestie mogłyby być ujęte inaczej, to uważam, że Doktorant zrealizował bardzo ciekawe badanie. Z pewnością wymagało ono od niego bardzo dużego wysiłku. Jeśli nawet w chwili obecnej uzyskane wyniki są obciążone pewnymi ograniczeniami, to mogą one posłużyć do wysunięcia hipotez do dalszych badań i będą wykorzystane w dalszej pracy naukowej Doktoranta.

Mam więc zaszczyt stwierdzić, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i zwracam się do Wysokiej Rady o dopuszczenie lek. med. Mateusza Bilskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Lucyna Kępka

Radioterapeuta – onkolog

Wojskowy Instytut Medyczny

Warszawa

Lucyna Kępka
Warszawa, dn. 25. 04. 2023