



**KLINIKA ONKOLOGII**  
**UNIwersytetu Medycznego w Białymstoku**  
*Kierownik: Prof. dr hab. med. Marek Z. Wojtukiewicz*

---

15-027 Białystok, ul. Ogrodowa 12, tel.: (85) 7435510; fax.: 48 (85) 6646783, e-mail: onkologia@umwb.edu.pl

Prof. dr hab. n. med. Ewa Sierko

Klinika Onkologii UMB

[ewa.sierko@iq.pl](mailto:ewa.sierko@iq.pl)

**RECENZJA**

**ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**Lek. Bereniki Trąbskiej-Kluch**

**pt. „Ocena wpływu metylacji wybranych genów oraz zaburzeń ekspresji niekodujących RNA na rozwój i przeżycie chorych z rozpoznaniem glioblastoma”**

Glejaki stanowią grupę najczęstszych pierwotnych nowotworów mózgowia wywodzących się z komórek glejowych. Najczęstsze wśród nich są glejaki, w tym 50% stanowią glejaki w stopniu złośliwości G4 wg WHO. Pomimo zastosowania leczenia wielodyscyplinarnego (operacji cytoredukcyjnej, radio- i chemioterapii) wyniki leczenia tych chorych są wysoce niezadawalające. Zmodyfikowana klasyfikacja nowotworów ośrodkowego układu nerwowego opublikowana w 2021r. uwzględnia liczne zaburzenia molekularne i genetyczne, które wpływają na zakwalifikowanie różnych glejaków do odmiennych grup. Taki podział nowotworów OUN ma dużą wartość prognostyczną i predykcyjną. Nadal jednak prowadzone są intensywne badania nad poznaniem zaburzeń molekularnych i genetycznych w nowotworach OUN, co dałoby podstawę wdrożenia skutecznego, spersonalizowanego leczenia ukierunkowanego na cele molekularne czy modyfikację warunków środowiska, w którym rozwija się nowotwór mózgowia (np. zastosowanie immunoterapii).

Dlatego też uważam, że problematyka stanowiąca przedmiot pracy doktorskiej lek. Bereniki Trąbskiej-Kluch jest bardzo interesująca i nowatorska oraz wpisuje się w nurt nowoczesnych badań.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja doktorska lek. Bereniki Trąbskiej-Kluch „Ocena wpływu metylacji wybranych genów oraz zaburzeń ekspresji niekodujących RNA na rozwój i przeżycie chorych z rozpoznaniem glioblastoma” jest opracowaniem 124 stronicowym. Praca ma układ typowy. Zawiera „Wykaz skrótów”, „Wstęp”, „Cele pracy”, „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Uwagi końcowe”, „Wnioski”, „Streszczenie” w języku polskim i angielskim, „Piśmiennictwo” a także „Wykaz tabel i rycin”.

Pracę doktorską rozpoczyna „Wykaz skrótów”, który w dalszej części dysertacji doktorskiej pomaga w zrozumieniu treści. Doktorantka zawarła w nim wyjaśnienia wykorzystanych skrótów zarówno po polsku, jak i po angielsku. Po tej części znajduje się 27-stronicowy „Wstęp”, w którym Doktorantka zwięźle omówiła etiologię i epidemiologię nowotworów OUN, aktualne zasady diagnostyki i leczenia wielodyscyplinarnego chorych na te nowotwory oraz ocenę efektów leczenia. Na szczególną uwagę zasługuje część „Wstępu” poświęcona omówieniu molekularnych podstaw transformacji nowotworowej, zaburzeń molekularnych występujących w glejaku G4 a także scharakteryzowaniu mikroRNA i ich roli w procesie nowotworzenia z uwzględnieniem glejaków wielopostaciowych G4. W części tej doktorantka elegancko i zrozumiale wyjaśniła zawiłe procesy biologiczne leżące u podstawy powstawania tych nowotworów mózgu. Uwzględniła bogate dane literaturowe z publikacji międzynarodowych. Podkreśliła wpływ różnych mutacji genetycznych na odmienną historię naturalną nowotworów glejowych i różne rokowanie. Takie podejście jest podstawą medycyny spersonalizowanej i wplata się w bardzo innowacyjny nurt aktualnych badań. Tym samym Doktorantka wykazała się świetną znajomością poruszanej w doktoracie problematyki, co upewnia recenzenta, że lek. Berenika Trąbska-Kluch przygotowała się sumiennie do realizacji pracy badawczej.

Cele pracy obejmowały:

- Ocenę statusu mutacji TP53 i IDH1 oraz analizę zaburzeń ekspresji na poziomie translacyjnym: MGMT, GATA4, p53 i na poziomie transkrypcyjnym: MGMT, GATA4 i TP53 oraz miR-34a i miR-125b u analizowanych pacjentów z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego.

- Ocenę metylacji promotorów genów: MGMT, GATA4, TP53, CDKN2B, MiR-34a i MiR-125b u badanych pacjentów z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego.

- Analizę związku między poszczególnymi zaburzeniami molekularnymi i epigenetycznymi u chorych z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego.

- Ocenę wpływu wybranych zaburzeń regulacyjnych na przeżycie ogólne analizowanych pacjentów z glioblastoma.

- Ocenę wpływu wybranych czynników klinicznych na przeżycie ogólne analizowanych chorych z glioblastoma

W części „Materiały i metody” lekarz Berenika Trąbska-Kluch przedstawiła plan licznych badań laboratoryjnych oraz bardzo szczegółowo opisała metodykę przeprowadzonych badań (izolacji DNA i RNA, sekwencjonowania metodą Sanger, oceny względnego poziomu poszczególnych genów, IHC analizy ekspresji wybranych białek, reakcji PCR specyficznej dla metylacji, oceny metylacji promotora genów *TP53* i *MGMT*, metody bisulfidowej połączonej z analizą restrykcyjną). Daje to możliwość odtworzenia wykonanych badań w innym laboratorium. Zabrakło mi jedynie informacji, czy fragmenty guzów nowotworowych utrwalone były w formalinie zbuforowanej. Doktorantka scharakteryzowała również grupę 31 chorych, których objęła badaniem. Następnie zwięźle omówiła, w jaki sposób wykonała analizę statystyczną.

W sekcji „Wyniki” Doktorantka dokładnie scharakteryzowała grupę pod względem klinicznym, jak również molekularnym. Dane kliniczne dotyczące leczenia uzupełniającego po zabiegu operacyjnym dostępne były tylko dla 16 spośród 31 pacjentów. W ocenie recenzenta uwzględnienie w analizie chorych poddanych radiochemioterapii, wyłącznej radioterapii radykalnej, radioterapii paliatywnej i pacjentów, którzy byli poddani jedynie leczeniu objawowemu, przy niewielkiej liczebności grupy - może nieco zaburzać ocenę wpływu badanych czynników molekularnych na przeżycie tych pacjentów, co było przedmiotem jednego z celów doktoratu.

Uzyskane wyniki Doktorantka umiejętnie przedyskutowała w sekcji „Dyskusja” zawierającej się na 11 stronach. Podsumowanie najważniejszych obserwacji zostało zawarte w sekcji „Uwagi końcowe”.

Na podstawie przeprowadzonego badania Doktorantka wyciągnęła 5 rozbudowanych wniosków:

1. Badana grupa pacjentów wykazała typowe cechy pierwotnego glejaka wielopostaciowego, a u 19,4% chorych stwierdzono mutację TP53 i w żadnym przypadku nie stwierdzono mutacji IDH1.
2. Poziom ekspresji MGMT w glejaku wielopostaciowym może być regulowany przez metylację promotora genu MGMT, która jest częściej obserwowana u chorych powyżej 60 r.ż.
3. Znalezione wzajemne powiązania między epigenetycznymi mechanizmami regulacyjnymi związane z MGMT, GATA4, CDKN2B i TP53 na poziomie genu, jak i białka mogą rzutować na przebieg procesów biologicznych, w których dane czynniki uczestniczą tj.: proliferacja, cykl komórkowy oraz naprawa uszkodzeń DNA. W regulacji tych procesów w związku z obecnością mutacji TP53 może być także zaangażowany miR-34a. Wykazano bowiem, że jego ekspresja zależy od obecności mutacji TP53.
4. Następujące zaburzenia molekularne i epigenetyczne mają wpływ na przeżycie ogólne pacjentów:
  - a. Ekspresja GATA4, metylacja promotora genu GATA4 oraz status TP53 rozumiany na poziomie mutacji w genie oraz ekspresji białka p53 mogą stanowić niekorzystne czynniki prognostyczne przeżycia ogólnego pacjentów.
  - b. Negatywnym czynnikiem rokowniczym można także uznać jednoczesny brak metylacji promotora MGMT przy obecnej mutacji TP53.
  - c. Poziom ekspresji miR-34a oraz metylacja w promotorze MGMT związane są z wiekiem pacjentów, dlatego też mogą stanowić molekularne podłoże gorszego przeżycia ogólnego pacjentów powyżej 60 r.ż. z glioblastoma.
  - d. Epigenetyczne mechanizmy regulujące ekspresję GATA4, CDKN2B i TP53 mogą różnicować prognozę OS pacjentów z glioblastoma.
  - e. Brak metylacji promotora CDKN2B może być korzystnym czynnikiem prognostycznym przeżycia pacjentów z glioblastoma wynikającym z zachowanej funkcji kodowanego przez ten gen białka p15, polegającej na kontroli przebiegu cyklu komórkowego.
5. Wiek jak i płeć może być także istotnym czynnikiem prognostycznym przeżycia ogólnego pacjentów z GBM związanym z obserwowanymi zaburzeniami molekularnymi m.in. metylacją promotora MGMT. Jednakże niekorzystne rokowanie może także wynikać z gorszego stanu ogólnego pacjentów. Powyższa obserwacja wymaga jednak dalszych badań.

Na uwagę zasługuje ostrożna interpretacja uzyskanych wyników i wskazanie ograniczeń wykonanego badania. Pierwszy wniosek jest *de facto* podsumowaniem charakterystyki molekularnej badanych guzów mózgu. Wnioski odpowiadają na założone cele badania.

Piśmiennictwo obejmuje 274 aktualnych pozycji, głównie anglojęzycznych.

Praca doktorska opatrzona jest 8 bardzo szczegółowymi tabelami i 25 starannymi, eleganckimi rycinami, które pomagają w zrozumieniu trudnej treści dysertacji doktorskiej..

Reasumując, uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska jest opracowaniem ciekawym, wartościowym, innowacyjnym, w pełni spełnia wymogi pracy na stopień doktora nauk medycznych.

Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. Bereniki Trąbskiej-Kluch do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej. Wnioskuje również o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Białystok, 10.12.2023 r.

Prof. dr hab. n. med. Ewa Sierko

