



INSTYTUT „POMNIK – CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”
ZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ
04-730 Warszawa, Aleja Dzieci Polskich 20
Tel. +48(22) 815 74 52, Fax: +48(22) 815 74 57, e-mail: genetyka@ipczd.pl

Warszawa, 19.06.2020

dr hab. n. med. Agnieszka Madej-Pilarczyk
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”
Aleja Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa

Instytut
„Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
ZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ
04-730 Warszawa, Al. Dzieci Polskich 20
tel. 22 815-74-52; fax 22 815-74-57
Regon: 000557981; NIP 952-11-43-875
LZGE

Rada Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Ocena rozprawy doktorskiej lekarz Beaty Rak

pt. „Mechanizm inwazyjności gruczolaków przysadki zależny od mikroRNA”

Promotor: dr hab. n. med. Urszula Ambroziak

Podstawą wykonania recenzji było pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM, Pana Prof. dr hab. n. med. Krzysztofa J. Filipiaka z dnia 01.06.2020 (URN/RDNM/5910/D-3564/2020). Przedmiotem recenzji jest ocena czy przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia ustawowe wymagania zdefiniowane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.).

Gruczolaki przysadki mózgowej to nowotwory wewnątrzczaszkowe, zwykle o łagodnym charakterze, choć ze względu na lokalizację w pobliżu skrzyżowania nerwów wzrokowych oraz możliwość wywołania dysfunkcji hormonalnej stanowią duże wyzwanie diagnostyczne i terapeutyczne. Dodatkowo pewien odsetek gruczolaków przysadki przybiera postać złośliwą, inwazyjną, z tendencją do nawrotów, co wiąże się ze złym rokowaniem. Choć w praktyce klinicznej stosowane są różne wskaźniki i skale, oparte na badaniach obrazowych, histologicznych i immunohistochemicznych, pozwalające na ocenę inwazyjności takich guzów, żaden z tych markerów nie jest doskonały. Rozwój biologii molekularnej i genetyki pozwala na coraz lepsze poznanie mechanizmów leżących u podstaw procesu

nowotworzenia, to zaś rodzi nadzieję na znalezienie nowych, dokładniejszych markerów inwazyjności, które mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce guzów przysadki i monitorowaniu przebiegu choroby.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lekarz Beaty Rak „Mechanizm inwazyjności gruczolaków przysadki zależny od mikroRNA” podejmuje zagadnienie roli mikroRNA w patogenezie guzów przysadki. Uzupełniona jest o szerokie rozważania dotyczące epidemiologii tej grupy schorzeń oraz dotychczas stosowanych metod oceny ich inwazyjności.

Rozprawa zredagowana jest w sposób przejrzysty, typowy dla pracy badawczej. Jest 132 stronicową monografią, zawiera dziesięć rozdziałów z podrozdziałami, w tym spis literatury uwzględniającej 156 pozycji, kopię zgody komisji bioetycznej, podziękowania, wykaz skrótów oraz 9 tabel i 60 rycin.

We „Wstępie” Doktorantka przedstawiła budowę przysadki mózgowej, funkcję osi hormonalnych podwzgórza - przysadka - narządy docelowe, następnie epidemiologię guzów okolicy siodła tureckiego, definicję gruczolaków przysadki wraz z ich klasyczną klasyfikacją, uwzględniającą wielkość, naciekanie okolicznych struktur oraz czynność hormonalną oraz nową klasyfikację opartą na pochodzeniu komórkowym linii gruczolaków przysadki. Krótko opisała patogenezę gruczolaków z uwzględnieniem szlaków sygnałowych zaangażowanych w rozwój prawidłowego gruczołu, a także jego transformację nowotworową oraz geny, które w formie zmutowanej odpowiadają za zespoły, gdzie elementem obrazu klinicznego jest gruczolak przysadki. Na koniec przedstawiła opcje terapeutyczne. W podrozdziale bezpośrednio związanym z tematem rozprawy Doktorantka omówiła stosowane dotychczas w praktyce klinicznej biomarkery inwazyjności gruczolaków przysadki, w tym skalę inwazyjności Knospa, a następnie rolę wybranych nowszych markerów molekularnych z grupy czynników wzrostowych, białek regulujących cykl komórkowy i enzymów naprawiających DNA, wskazując na ich ograniczoną efektywność w przewidywaniu agresywności gruczolaków. Następnie podała definicję i opisała biogenezę oraz funkcję mikroRNA w regulacji docelowego mRNA oraz przytoczyła aktualne dane dotyczące roli mikroRNA w prawidłowej przysadce mózgowej oraz w gruczolakach przysadki. Przedstawiła potencjalne korzyści, związane z identyfikacją w gruczolakach przysadki o niekorzystnym przebiegu takich cząsteczek mikroRNA, które – jako potencjalny biomarker - umożliwiałyby ich wczesne wykrywanie, określanie inwazyjności w celu doboru najlepszej terapii oraz monitorowanie efektów leczenia. Zawarte we wstępie informacje opierają się na najnowszej wiedzy, zaczerpniętej z aktualnego piśmiennictwa.

Doktorantka wskazała następujące cele badań, uwzględniające podział rozprawy na dwie części tematycznie:

- Poszukiwanie markerów inwazyjności kortykotropowych gruczolaków przysadki na podstawie retrospektywnej analizy danych klinicznych, morfologicznych (obraz makroskopowy w MRI, obraz mikroskopowy w mikroskopii elektronowej) oraz immunohistochemicznych.
- Wytypowanie cząsteczek mikroRNA, które mogą być powiązane z inwazyjnością guza przysadki, weryfikacja ich przydatności w różnicowaniu guzów inwazyjnych i nieinwazyjnych, korelacja poziomu ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA z inwazyjnością w skali Knospa, ocena poziomu ekspresji genów regulowanych przez mikroRNA, korelacja ekspresji mikroRNA i potencjalnych genów docelowych oraz ocena wpływu wybranych cząsteczek mikroRNA na inwazyjność gruczolaka przysadki na modelu komórkowym *in vitro*.

W rozdziale „Materiały i metody” Autorka opisała grupę badaną, którą stanowił materiał tkankowy pobrany w czasie operacji neurochirurgicznej od dużej, liczącej 2348 osób grupy pacjentów Kliniki Neurochirurgii Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie, leczonych w latach 2018-2019 z powodu guza okolicy siodła tureckiego, uzupełniony o dane demograficzne i kliniczne. Dane z analiz: morfologicznej, histopatologicznej i immunohistochemicznej, przeprowadzonych w Zakładzie Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, były przedmiotem analizy retrospektywnej, wskazanej jako pierwszy cel badań. Część preparatów tkankowych została wykorzystana do badań molekularnych, obejmujących przesiewową ocenę ekspresji różnych cząsteczek mikroRNA w guzach inwazyjnych i nieinwazyjnych za pomocą mikromacierzy, analizę ekspresji wytypowanych mikroRNA i genów docelowych za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, a także ocenę inwazyjności, zdolności migracji i tworzenia kolonii przez linię komórkową gruczolaka przysadki po transfekcji wybranymi cząsteczkami mikroRNA w warunkach *in vitro* – wskazanych jako drugi cel badań. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem odpowiednich testów i programów.

Wyniki zostały szczegółowo opisane i zilustrowane licznymi tabelami i rycinami. Obserwacje poczynione przez Doktorantkę wskazują, że w grupie analizowanych guzów przysadki najliczniejszą grupę stanowiły gruczolaki nieczynne hormonalnie, a spośród czynnych hormonalnie - somatotropowe i kortykotropowe, przy czym kortykotropowe

charakteryzowały się największym odsetkiem nawrotów, co uzasadniało wybór tej grupy gruczolaków do dalszej analizy potencjalnych powiązań mikroRNA z inwazyjnością. Najlepszym z dotychczas stosowanych w praktyce klinicznej markerem inwazyjności był fenotyp gruczolaka skąpoziarnistego (SG), który korelował zarówno z większymi rozmiarami guzów, wyższym indeksem proliferacyjnym Ki-67 i wyższym stopniem inwazyjności w skali Knospa. Z wytypowanych we wstępnej analizie 22 cząsteczek mikroRNA statystycznie istotną zmianę ekspresji (zmniejszenie) w inwazyjnych gruczolakach przysadki, niezależnie od ich rodzaju, zaobserwowano tylko w przypadku mikroRNA-191-5p, zaś po zawężeniu grupy badanej do gruczolaków somatotropowych i gonadotropowych – w przypadku mikroRNA-191-5p i mikroRNA-186-5p. Wykazano statystycznie istotną korelację ekspresji genu docelowego PTEN i 4 cząsteczek mikroRNA, TGFB1 i 2 cząsteczek mikroRNA oraz TIMP2 i 1 cząsteczki mikroRNA. Przewidywany wpływ analizowanych cząsteczek mikroRNA na geny docelowe o znanej roli w procesie nowotworzenia, w tym w patogenezie guzów przysadki mózgowej, został przekonująco podsumowany na Rycinie 60. Eksperymenty *in vitro* pokazały, że na inwazyjność linii komórkowej gruczolaka przysadki statystycznie istotny dodatni wpływ miały cząsteczki mikroRNA-454-3p oraz mikroRNA-590-5p, ponadto cząsteczki mikroRNA-590-5p i mikroRNA-93-3p zwiększały zdolność do tworzenia kolonii.

Dyskusja poprowadzona została sprawnie, z odniesieniem uzyskanych wyników do aktualnej wiedzy zawartej w literaturze. Doktorantka wskazała zalety pracy, ale też w krytyczny sposób odniosła się do ograniczeń, związanych m. in. z brakami niektórych danych klinicznych (np. status hormonalny pacjentów przed i po operacji guza przysadki), w części przypadków z brakiem informacji o stopniu zaawansowania gruczolaka w skali Knospa, a także do trudności metodologicznych, które napotkała na etapie realizacji eksperymentów *in vitro*, dotyczących wpływu mikroRNA na inwazyjność modelowej dla choroby Cushinga linii komórkowej. Na koniec Autorka sformułowała 8 wniosków, wynikających z uzyskanych wyników i obserwacji. Doktorantce udało się osiągnąć zaplanowane cele. Przeprowadzone badania mogą wskazywać na zaangażowanie niektórych cząsteczek mikroRNA w regulację szlaków nowotworzenia poprzez wpływ na ekspresję genów zaangażowanych w onkogenezę i pośrednio na inwazyjność gruczolaków przysadki. Zmieniona ekspresja poszczególnych cząsteczek mikroRNA w guzach inwazyjnych w porównaniu z guzami nieinwazyjnymi sprawia, że wybrane mikroRNA mogą w przyszłości stać się biologicznymi markerami zwiększonej inwazyjności gruczolaków przysadki i znaleźć

zastosowanie jako narzędzie diagnostyczne. Wymaga to oczywiście dalszych pogłębionych badań.

Rozprawę doktorską lekarz Beaty Rak oceniam bardzo wysoko. Liczebność badanej grupy była imponująca, a retrospektywna analiza – wieloczynnikowa i wielostronna. Podjęte w części stricte badawczej zagadnienie mechanizmów inwazyjności gruczolaków przysadki w kontekście najnowszej wiedzy z dziedziny genetyki, w tym przypadku związanej z rolą mikroRNA, jest jeszcze nie do końca poznane, zatem temat pracy jest oryginalny i nowatorski. Badania zostały dobrze zaplanowane, a dobór kolejnych eksperymentów był uporządkowany i trafny. Zastosowane metody badawcze wymagały opanowania przez Doktorantkę trudnego warsztatu laboratoryjnego. Uzyskane wyniki i poczynione obserwacje będą dobrym wstępem do dalszych badań nad rolą mikroRNA w patogenezie gruczolaków przysadki.

Wyniki analizy retrospektywnej zamieszczonej w rozprawie zostały przedstawione w pracy opublikowanej w czasopiśmie o IF 1,521: Rak B, Maksymowicz M, Grzywa TM, Sajjad E, Pękuł M, Włodarski P, Zieliński G. Pituitary tumors - a large retrospective single-center study of over 2300 cases. An experience of tertiary reference center. *Endokrynol Pol.*, Mar 2020. DOI: 10.5603/EP.a2020.0011. Ponadto Doktorantka jest współautorem 2 innych prac w czasopiśmie o łącznym IF 6,027 (w jednej z nich jest autorem korespondencyjnym), dotyczących zagadnienia inwazyjności gruczolaków przysadki zależnej od mikroRNA. Można zatem mieć nadzieję, że wyniki części doświadczalnej niniejszej rozprawy również zostaną w niedługim czasie opublikowane. Warto w tym miejscu podkreślić, że badania Doktorantki nad rolą cząsteczek mikroRNA w nowotworach nie ograniczały się wyłącznie do gruczolaków przysadki, wcześniejsze Jej prace dotyczyły raka endometrium (3 publikacje z pierwszym autorstwem), raka jajnika i raka gruczołu krokowego.

Podczas studiowania rozprawy nasunęło mi się kilka drobnych uwag. Z punktu widzenia czytelnika cenne byłoby podanie jednozdaniowych opisów poszczególnych stopni zaawansowania Knospa jako uzupełnienie schematów z Ryciny 5. Jedno spośród 9 mikroRNA wytypowanych i uwzględnianych w dalszych analizach, tj. mikroRNA29a-5p, nie zostało uwzględnione na mapie pokazującej największe różnice ekspresji 22 różnych mikroRNA w guzach inwazyjnych i nieinwazyjnych (Rycina. 40). Nazwy genów powinny być zapisane kursywą. W pracy znalazło się kilka nieprecyzyjnych sformułowań, np. „Wytypowane z przesiewowego badania mikromacierzy cząsteczki mikroRNA zostały potwierdzone na większej liczbie pacjentów z użyciem wiarygodnej i dokładnej metody,...” zamiast „Zmiany ekspresji wytypowanych w przesiewowym badaniu mikromacierzy

cząsteczek mikroRNA zostały potwierdzone na większej liczbie gruczolaków z użyciem wiarygodnej i dokładnej metody...”; „...wykazano istotną statystycznie korelację genów docelowych z poziomami ekspresji dla:...” zamiast „...wykazano istotną statystycznie korelację ekspresji genów docelowych z poziomami ekspresji dla:...””, w tytule podrozdziału 3.4.4 „Odwrotna transkrypcja genów mRNA i reakcje PCR” zamiast „Synteza cDNA wybranych genów regulowanych przez badane cząsteczki mikroRNA, reakcje PCR w czasie rzeczywistym”, angielski termin „kit” zamiast „zestaw”, nieliczne błędy literowe i interpunkcyjne. W żaden sposób nie umniejszają one wysokiej oceny rozprawy.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lekarz Beaty Rak pt. „Mechanizm inwazyjności gruczolaków przysadki zależny od mikroRNA” spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.). Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie lekarz Beaty Rak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Wnoszę również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lekarz Beaty Rak. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę oprócz ich niepodważalnego nowatorstwa w aspekcie naukowym, mogą mieć w przyszłości potencjalne implikacje kliniczne. Na podkreślenie zasługuje też fakt, że Doktorantka skutecznie pozyskała środki finansowe na swoje badania, z sukcesem aplikując aż w trzech konkursach grantowych. Zaprojektowanie i przeprowadzenie trudnych i czasochłonnych eksperymentów wymagało dużej wiedzy teoretycznej i znajomości skomplikowanych metod biologii molekularnej. Wyniki analizy retrospektywnej zamieszczonej w rozprawie zostały przedstawione w pracy opublikowanej w czasopiśmie o IF 1,521; Doktorantka jest pierwszym autorem tej publikacji. Wszystko to świadczy o Jej samodzielności, dojrzałości i dużym potencjale naukowym.

Agnieszka Madej-Pilarczyk

6716241 dr hab. n. med.
Agnieszka Madej-Pilarczyk
specjalista genetyki klinicznej
lekarz chorób wewnętrznych