

Gdańsk, 20.09.2019.

Prof. dr hab. Ewa Iżycka-Świeszewska
Zakład Patologii i Neuropatologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
eczis@gumed.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Iwony Elżbiety Sontowskiej na temat:
„Zbadanie aktywacji wybranych szlaków przekazywania sygnałów w
komórkach dysembrioplastycznych nowotworów neuroepitelialnych”**

Promotor dr hab. med. Wiesława Grajkowska, prof. IPCZD

Nowotwory mózgu stanowią szczególną i heterogenną grupę guzów pod względem epidemiologicznym, klinicznym i neuropatologicznym. U dzieci są one jednymi z najczęstszych nowotworów. Postęp w diagnostyce i leczeniu onkologicznym spowodował wydłużenie życia znacznej liczby chorych. Wiele z tych nowotworów charakteryzuje się jednakże złym rokowaniem lub powoduje obniżoną jakość życia i odległe powikłania. W ostatnich latach prowadzone są wielośrodkowe projekty mające na celu poznanie molekularnych mechanizmów patogenezy i progresji guzów OUN u dzieci. Duży postęp w klasyfikacji i poszukiwaniu potencjalnych celów terapeutycznych nastąpił zwłaszcza w dominujących typach guzów takich jak *Medulloblastoma*, wyściółczaki i glejaki. Nowotwory glejowo- neuronalne są rzadkie w populacji ogólnej i relatywnie słabo opracowane, jakkolwiek stanowią istotny problem neuroonkologiczny u dzieci. Wyróżnia się kilkanaście podtypów histologicznych tych guzów, takich jak m.in.: zwojakoglejak (*ganglioglioma*), zwojak komórkowy (*gangliocytoma*), desmoplastyczny wczesnodziecięcy zwojakoglejak (*ganglioglioma infantile desmoplasticum*), nerwiak komórkowy ośrodkowy (*neurocytoma centrale*), czy będący tematem niniejszej rozprawy doktorskiej dysembrioplastyczny nowotwór neuroepitelialny (DNT). Pogłębienie wiedzy na temat biologicznych uwarunkowań powstawania i przebiegu DNT może przyczynić się do

Materiał i metodę badawczą opiszono w wstępie i wyczerpująco. Materiał do badań pochodził od 47 pacjentów w wieku rozwojowym, diagnozowanych i leczonych w referencyjnym ośrodku klinicznym - w Klinice Neurochirurgii Instytutu Centrum Pomnik Zdrowia Dziecka w Warszawie. Jest to bardzo duża grupa, biorąc pod uwagę rzadkość nowotworu. Analizie podlegała dość homogenna wiekowo grupa chorych o relatywnie krótkim okresie objawów klinicznych (głównie padaczkowych).

dość istotny brak w strukturze dysertacji i toku wywodu.

W pracy nie umieszczono sformułowanych hipotez badawczych, co stanowi

uwzględniając w nich niepotrzebnie niektóre kwestie metodyczne.

sformulowano jednak zbyt drobniarstwo (7 celów szczegółowych z podpunktami), molekularnych związanych z patogenezą nowotworów typu DNT. Cele szczegółowe Celem głównym pracy doktorskiej była identyfikacja możliwych mechanizmów

Doktorantki i zrozumienie poruszanych zagadnień naukowych.

Jest napisany interesująco i merytorycznie poprawnie, ujawnia wysoką wiedzę

przez czytelne schematy ścieżek sygnalizacyjnych. Należy podkreślić, że wstęp pracy

opis podstaw mechanizmów transmisji sygnału komórkowego uzupełniony został

szlak MAPK/ERK, PI3K/AKT, mTOR, WNT oraz Hedgehog. Merytoryczny i klarowny

sygnalizacyjne będące obiektem przeprowadzonych badań w pracy doktorskiej, tzn.

BRAF V600E i mutacji *FGFR1*. Na kolejnych stronach pracy przedstawione są szlaki

uwzględniając od niedawna ujawnioną rolę szlaków MAPK/ERK, mTOR, mutacji genu

mózgu. Omawiając patogenezę DNT autorka podaje aktualny stan wiedzy,

szczególny charakter analizowanej rzadkiej w populacji ogólnej grupy nowotworów

radiologiczny guzów grupy DNT powinien być opisany szerzej, ze względu na

Dysembrioplastycznego nowotworu neuroepitelialnego. Obraz histopatologiczny i

dokonano szczegółowej charakterystyki pato-klinicznej badanego typu nowotworu-

wartość. Wstęp pracy liczy 39 stron i podzielony został na podrozdziały, w których

przejrzystości prezentowanych danych, co znacznie ułatwia jej czytanie i podnosi

Rozprawa napisana jest staranną polszczyzną z zachowaniem płynności tekstu i

Gdańsk, 20.09.2019.

Prof. dr hab. Ewa Iżycka-Świeszewska
Zakład Patologii i Neuropatologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
eczis@gumed.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Iwony Elżbiety Sontowskiej na temat:
„Zbadanie aktywacji wybranych szlaków przekazywania sygnałów w
komórkach dysembrioplastycznych nowotworów neuroepitelialnych”**

Promotor dr hab. med. Wiesława Grajkowska, prof. IPCZD

Nowotwory mózgu stanowią szczególną i heterogenną grupę guzów pod względem epidemiologicznym, klinicznym i neuropatologicznym. U dzieci są one jednymi z najczęstszych nowotworów. Postęp w diagnostyce i leczeniu onkologicznym spowodował wydłużenie życia znacznej liczby chorych. Wiele z tych nowotworów charakteryzuje się jednakże złym rokowaniem lub powoduje obniżoną jakość życia i odległe powikłania. W ostatnich latach prowadzone są wielośrodkowe projekty mające na celu poznanie molekularnych mechanizmów patogenezy i progresji guzów OUN u dzieci. Duży postęp w klasyfikacji i poszukiwaniu potencjalnych celów terapeutycznych nastąpił zwłaszcza w dominujących typach guzów takich jak *Medulloblastoma*, wyściółczaki i glejaki. Nowotwory glejowo- neuronalne są rzadkie w populacji ogólnej i relatywnie słabo opracowane, jakkolwiek stanowią istotny problem neuroonkologiczny u dzieci. Wyróżnia się kilkanaście podtypów histologicznych tych guzów, takich jak m.in.: zwojakoglejak (*ganglioglioma*), zwojak komórkowy (*gangliocytoma*), desmoplastyczny wczesnodziecięcy zwojakoglejak (*ganglioglioma infantile desmoplasticum*), nerwiak komórkowy ośrodkowy (*neurocytoma centrale*), czy będący tematem niniejszej rozprawy doktorskiej dysembrioplastyczny nowotwór neuroepitelialny (DNT). Pogłębienie wiedzy na temat biologicznych uwarunkowań powstawania i przebiegu DNT może przyczynić się do

opracowania nowych metod leczniczych w przypadkach niedoszczętnie usuniętych i związanych z oporną padaczką.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lekarza medycyny Iwony Sontowskiej posiada formę jednostronnego wydruku komputerowego w twardej oprawie, liczącego 120 stron. Ogólna struktura rozprawy jest typowa dla prac badawczych prowadzonych w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie medycyna. Układ i proporcje co do objętości poszczególnych rozdziałów są właściwe i zgodne z zasadami redagowania prac naukowych.

Na początku rozprawy doktorantka przedstawia informację o finansowaniu badań, które zrealizowano ze środków projektów badawczych o numerach: 1M15/PM12D/13, 1M15/PM4/16, 1M15/PM2/17/17 sfinansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Kierownikiem tych projektów była lek. Iwona Sontowska. Ponadto podana jest informacja, że część niniejszej pracy została napisana w oparciu o publikację: Dysembryoplastic neuroepithelial tumour: insight into the pathology and pathogenesis. Sontowska I, i in.. Folia Neuropathol. 2017. Następną część monografii doktorskiej stanowią podziękowania.

Spis treści monografii jest szczegółowy i wyczerpujący, z właściwymi odnośnikami do stron. W następnej części autorka dołączyła szczegółowy wykaz skrótów stosowanych w dysertacji. W dalszej kolejności znajdują się streszczenia pracy w języku polskim i angielskim.

Przydatne w czytaniu są umieszczone na końcu monografii: spis rycin (18 rycin z opisowymi tytułami) oraz spis tabel (praca zawiera 22 czytelne tabele zbiorcze). Jako załączniki Doktorantka zawarła „Szczegółowe zestawienie danych klinicznych dla poszczególnych pacjentów” oraz „Szczegółowe zestawienie wyników reakcji immunohistochemicznych oraz wyników badań genetycznych dla poszczególnych pacjentów”. Umożliwia to dokładne zapoznanie się z materiałem badawczym i wynikami przeprowadzonych badań. Na końcu dysertacji umieszczono Oświadczenie Komisji Bioetycznej w odniesieniu do prowadzonych badań.

Rozprawa napisana jest staranną polszczyzną z zachowaniem płynności tekstu i przejrzystości prezentowanych danych, co znacznie ułatwia jej czytanie i podnosi wartość. Wstęp pracy liczy 39 stron i podzielony został na podrozdziały, w których dokonano szczegółowej charakterystyki pato- klinicznej badanego typu nowotworu- Dysembrioplastycznego nowotworu neuroepitelialnego. Obraz histopatologiczny i radiologiczny guzów grupy DNT powinien być opisany szerzej, ze względu na szczególny charakter analizowanej rzadkiej w populacji ogólnej grupy nowotworów mózgu. Omawiając patogenezę DNT autorka podaje aktualny stan wiedzy, uwzględniając od niedawna ujawnioną rolę szlaków MAPK/ ERK, mTOR, mutacji genu *BRAF V600E* i mutacji *FGFR1*. Na kolejnych stronach pracy przedstawione są szlaki sygnalizacyjne będące obiektem przeprowadzonych badań w pracy doktorskiej, tzn. szlak MAPK/ERK, PI3K/AKT, mTOR, WNT oraz Hedgehog. Merytoryczny i klarowny opis podstaw mechanizmów transmisji sygnału komórkowego uzupełniony został przez czytelne schematy ścieżek sygnalizacyjnych. Należy podkreślić, że wstęp pracy jest napisany interesująco i merytorycznie poprawnie, ujawnia wysoką wiedzę Doktorantki i zrozumienie poruszanych zagadnień naukowych.

Celem głównym pracy doktorskiej była identyfikacja możliwych mechanizmów molekularnych związanych z patogenezą nowotworów typu DNT. Cele szczegółowe sformułowano jednak zbyt drobiazgowo (7 celów szczegółowych z podpunktami), uwzględniając w nich niepotrzebnie niektóre kwestie metodyczne.

W pracy nie umieszczono sformułowanych hipotez badawczych, co stanowi dość istotny brak w strukturze dysertacji i toku wywodu.

Materiał i metodykę badawczą opisano właściwie i wyczerpująco. Materiał do badań pochodził od 47 pacjentów w wieku rozwojowym, diagnozowanych i leczonych w referencyjnym ośrodku klinicznym - w Klinice Neurochirurgii Instytutu Centrum - Pomnik Zdrowia Dziecka w Warszawie. Jest to bardzo duża grupa, biorąc pod uwagę rzadkość nowotworu. Analizie podlegała dość homogenna wiekowo grupa chorych o relatywnie krótkim okresie objawów klinicznych (głównie padaczkowych).

Histologicznie była to grupa DNT o wariacie histopatologicznym prostym. Taki dobór grupy badawczej podnosił informatywność i znamienność uzyskanych wyników.

Materiał tkankowy z guzów został utrwalony typowo w 10% zbuforowanym roztworze formaliny i następnie zatopiony w blokach parafinowych. Dodatkowo użyto 11 próbek materiału w formie głęboko mrożonej. Materiał kontrolny do badań dobrano prawidłowo. Badania przeprowadzono w oparciu o szeroką i nowoczesną metodologię. Zastosowano metody molekularne dotyczące analizy wybranych elementów/ szlaków sygnalizacyjnych: Western Blot (do oceny ilościowej białka beta- kateniny), sekwencjonowanie wybranych fragmentów DNA metodą Sanger (do oceny występowania aktywującej mutacji punktowej p.V600E w genie *BRAF* i do oceny występowania mutacji punktowych we fragmencie eksonu 3 genu kodującego β - kateninę - *CTNNB1*) oraz metodę RT-PCR do badania liczby kopii genu *BRAF*. Badania te wykonano przy użyciu nowoczesnej aparatury i odczynników komercyjnych wysokiej klasy. W badaniach zastosowano także metody histologiczne i immunohistochemiczne, w tym z użyciem przeciwciał fosfo-specyficznych produkcji renomowanych firm biotechnologicznych. Ocena wyników reakcji immunohistochemicznych opierała się na analizie jakościowej oraz półilościowej immunoreaktywności wybranych białek (pERK, pAKT, pS6rp (Ser235/236), pS6rp (Ser240/244), B-catenina, SMO, Gli1, Gli3) z wykorzystaniem własnej skali. Analiza szczegółowa immunoekspresji obejmowała też ocenę lokalizacji subkomórkowej substratu reakcji barwnej.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań oraz danych klinicznych i analiza statystyczna wskazująca możliwe powiązania pomiędzy uzyskanymi wynikami badań immunohistochemicznych i genetycznych została wykonana przy użyciu programu Statistica, wersja 13.3. Zastosowano właściwe testy statystyczne.

Wyniki, które stanowią obszerną część manuskryptu, doktorantka przedstawiła w sposób bardzo uporządkowany i logiczny, umieszczając liczne wykresy, tabele i mikrografie. Wysokiej jakości odczyny immunohistochemiczne ukazuje załączona dokumentacja fotograficzna. W tekście pracy używane jest niezręczne sformułowanie

„dodatnia reakcja immunohistochemiczna”. Wyniki przeprowadzonych szeroko zakrojonych badań ujawniły zwiększoną ekspresję aktywnej formy białka ERK w komórkach nowotworowych DNT w porównaniu do kontrolnej tkanki nerwowej, niską częstość mutacji punktowej p. V600E w genie *BRAF* (2,8 %) oraz zwiększenie liczby kopii genu *BRAF* w 16% DNT. Mała grupa guzów wykazała ekspresję ufosforylowanej na reszcie serynowej 473 formy białka AKT, przy obecności aktywnych form białka rybosomalnego S6 w większości przypadków. Ponadto zaobserwowano zwiększoną ekspresję cytoplazmatyczną β -kateniny przy braku ekspresji jądrowej tego białka i nie zidentyfikowano mutacji punktowych w eksonie 3 genu *CTNNB1*. Stwierdzono wykładniki aktywacji szlaku Hedgehog: ekspresję jądrową białka SMO i zwiększoną ekspresję jądrową białka GLI1. W podsumowaniu wyników lek. Iwona Sontowska podkreśla wykrycie zależności funkcjonalne pomiędzy aktywacją białka GLI1 a aktywnością szlaku MAPK/ERK oraz ujawnienie związku pomiędzy jądrową ekspresją SMO a aktywowanym szlakiem MAPK/ERK i szlakiem mTOR.

W części „Dyskusja”, liczącej 11 stron, autorka przeprowadziła krytyczną analizę wyników własnych i odniosła się szczegółowo do dostępnej literatury w zakresie guzów mózgu i innych nowotworów. Porównanie i interpretacja wyników przeprowadzonych analiz zmian aktywności i statusu kluczowych elementów wybranych szlaków sygnalizacyjnych w guzach DNT do wyników w innych nowotworach jest utrudnione ze względu na specyfikę badanej grupy. Nowotwory złośliwe jak np. rak jelita, prostaty, jajnika, czy czerniak mają zupełnie inny przebieg kliniczny, histogenezę i profil molekularny, dlatego różnią się znacznie od badanych w pracy doktorskiej rzadkich łagodnych / o niskim potencjale złośliwości (I st. WHO) glejowo-neuronalnych guzów DNT. Tak szerokie, jak w dysertacji, monograficzne analizy w nowotworach mózgu należą do rzadkości, co dodatkowo podnosi walory i wartość samodzielnych badań lek. Iwony Sontowskiej. Badania Doktorantki mają szczególną wartość poznawczą, ponieważ są jednymi z pierwszych, tak kompleksowymi analizami tkankowymi w homogennej grupie rzadkich guzów DNT.

Omówienie wyników pokazuje rozległą wiedzę w obszarze badawczym oraz dojrzałość naukową doktorantki. Dyskusja przeprowadzona została bardzo precyzyjnie z właściwym wykorzystaniem zgromadzonego piśmiennictwa. Piśmiennictwo jest właściwie dobrane, zawiera 181 pozycji, głównie z ostatnich lat, także z bieżącego roku. W wykazie prace ujęto w kolejności pojawiania się w tekście.

Wnioski sformułowano w postaci pięciu punktów, korespondujących z celami pracy. Do najważniejszych wniosków zaliczam powiązanie aktywacji wybranych szlaków z patogenezą dysembrioplastycznych nowotworów neuroepitelialnych: aktywacji MAPK/ERK, uwzględniając małą podgrupę DNT ze zmianami w genie *BRAF* oraz szlaku mTOR i transdukcji szlaku Hedgehog z ekspresją jądrową SMO i GLI1 w komórkach nowotworowych DNT.

Podsumowując stwierdzam, że całość rozprawy doktorskiej lek. med. Iwony Elżbiety Sontowskiej zatytułowanej „Zbadanie aktywacji wybranych szlaków przekazywania sygnałów w komórkach dysembrioplastycznych nowotworów neuroepitelialnych”, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie medycyna, wykazuje wysoką ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w tej dziedzinie oraz umiejętności prowadzenia różnorodnych metodycznie prac naukowych.

Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy 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 Naukowej Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Iwony Elżbiety Sontowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Ewa Iżycka-Świeszewska
spec. patomorfolog, spec. neuropatolog

