

dr hab. n. med. prof. nadzw. Magdalena Zakrzewska  
Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii  
Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
ul. Pomorska 251, 92-216 Łódź

Łódź, 2019-07-23

## RECENZJA

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

### 1. Ocena wyboru tematu pracy

Nowotwory neuronalne i mieszane neuronalno-glejowe wieku dziecięcego stanowią jedną z grup nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN) pochodzenia neuroepitelialnego. Łącznie stanowią do 13% wszystkich rozrostów wewnątrzczaszkowych, zaś należący do tej grupy dysembrioplastyczny nowotwór neuroepitelialny (*dysembryoplastic neuroepithelial tumor, DNT*) występuje u dzieci z częstością do 2%.

Złożoność biologiczna i rzadkie występowanie nowotworów neuronalnych i mieszanych neuronalno-glejących, w tym DNT, jest podstawową przyczyną braku spektakularnych efektów prowadzonych dotychczas badań podstawowych.

Doktorantka, analizując w swojej pracy histologicznie jednorodną grupę 47 przypadków dysembrioplastycznych nowotworów neuroepitelialnych, zakwalifikowanych jako forma prosta, podjęła się oceny aktywności wybranych elementów pięciu szlaków sygnalizacyjnych w oparciu o metody immunohistochemiczne i molekularne. Tym samym wpisała się w nurt bieżących badań dotyczących wyjaśnienia prawdopodobnych biologicznych podstaw tych wciąż genetycznie enigmatycznych nowotworów. Dlatego też uważam wybór tematu pracy za słuszny, a problem, którego dotyczy, za ważny i w pełni zasługujący na wnikliwą analizę.

### 2. Formalna ocena rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa liczy łącznie 120 stron, zawiera 18 rycin i 22 tabele i ma typowy układ rozdziałów obejmujący kolejno: wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie wyników, wnioski, piśmiennictwo, spis rycin, spis tabel, załączniki oraz oświadczenie komisji bioetycznej. Części te zostały szczegółowo ponumerowane w spisie treści i konsekwentnie opisane w treści dysertacji. Rozprawa napisana jest w sposób czytelny, a jej zawartość jest zgodna z tytułem.

### 3. Merytoryczna ocena rozprawy

We wstępie Autorka przedstawia szczegółowe informacje dotyczące charakterystyki klinicznej, histopatologicznej oraz domniemanej patogenezы DNT, kierując czytelnika ku problemom, którymi ma zamiar się zajmować. Uwagę zwraca dobór piśmiennictwa, które w poszczególnych podrozdziałach wstępu ograniczone jest do pozycji związanych z grupą wiekową będącą tematem rozprawy bądź też dotyczy obserwacji poczynionych na chorych dorosłych. Zabieg ten może być usprawiedliwiony niewielką częstością występowania tych guzów, zwykle analizowanych jako grupy mieszane pod względem wieku. Dla przejrzystości przekazywanych treści warto było dodać informację, które obserwacje dotyczyły dzieci, a które – dorosłych (z zaznaczeniem ewentualnych odmienności typowych dla wieku), zwłaszcza w tak istotnych dla pracy kwestiach, jak lokalizacja czy obraz histopatologiczny.

Szkoda, że najbardziej interesująca z punktu widzenia tematu rozprawy część wstępu dotycząca patogenezы DNT nie została przedstawiona obszerniej. W moim odczuciu powinna znaleźć się w tej części także informacja o związku DNT ze zniekształceniami rozwojowymi kory mózgowej (*malformations of cortical development, MCD*), które obejmują m.in. hemimegalencefalię, stwardnienie guzowate i ogniskową dysplazję korową, czego potwierdzeniem jest obecność w utkaniu tych nowotworów, dysplastycznych neuronów z towarzyszącą ekspresją markerów komórek macierzystych.

W kolejnym rozdziale Doktorantka szczegółowo omawia przeznaczone do analiz szlaki sygnałowe. Opis przedstawiony jest w oparciu o sprawnie prowadzony przegląd danych literaturowych dotyczących potencjalnych związków pomiędzy zmianami w obrębie składników szlaków a powstawaniem nowotworów, w tym guzów mózgu. Omawiane kaskady sygnałowe (MAPK/ERK, PI3K/AKT, mTOR, WNT, HH) zostały także przedstawione

w formie graficznej. Część rycin lepiej zobrazowałaby ideę założeń pracy, gdyby została połączona we wspólne schematy obrazujące wzajemne korelacje pomiędzy poszczególnymi elementami ścieżek sygnałowych, których obecność została przez Kandydatkę umiejętnie podkreślona na kolejnych stronach. Udaną próbę takiego sumarycznego przedstawienia omawianych szlaków sygnalizacyjnych zawiera Rycina 4. Byłoby to również wskazane jako uzasadnienie włączenia do analiz szlaków WNT i HH, co w kontekście typu nowotworów przeznaczonych do badań może nie być dla czytelnika oczywiste. Większość dotychczasowych obserwacji udziału szlaku HH w patogenezie nowotworów OUN dotyczy bowiem nowotworów o wysokim stopniu złośliwości i w tym kontekście zaplanowane do przeprowadzenia badania oceniam jako nowatorskie.

Cele pracy zostały przedstawione w czytelny sposób, w formie siedmiu punktów. Należy w tym miejscu podkreślić, że skala trudności zadań badawczych odpowiada wymogom naukowym stawianym przed rozprawami doktorskimi.

W rozdziale „Materiały i metody” przedstawiono zwięzły opis grupy 47 dzieci objętych badaniem. Z obowiązku recenzentki pragnę zauważyć, że dane takie jak płeć i wiek są danymi demograficznymi, a nie klinicznymi, zatem Kandydatka pozyskała i poddała analizie dane demograficzne i kliniczne.

Zastosowane metody badawcze zostały opisane w sposób więcej niż szczegółowy i świadczą niewątpliwie o dobrej znajomości przez Doktorantkę metodologii badań naukowych oraz zasad ich przeprowadzania, co stanowi gwarancję wysokiej jakości i wiarygodności prowadzonych badań. Niemniej jednak wydaje się, że informacje dotyczące składu podstawowych odczynników rutynowo wykorzystywanych w laboratoriach naukowo-badawczych nie są konieczne. Jednocześnie w paragrafie 3.4.2. zabrakło istotnej informacji dotyczącej jakości i czystości wyizolowanego DNA, zwłaszcza że w kolejnych częściach pracy spotykamy informację o wykluczeniu z analiz różnej liczby prób z powodu niespełniania przez nie wymogów jakości. Wykluczana liczba prób była w jednym przypadku tożsama z liczbą prób izolowanych z materiału głęboko mrożonego – czy to znaczy, że był on gorszej jakości niż materiał uzyskany z bloków parafinowych?

W kolejnym rozdziale Autorka sprawnie przedstawia uzyskane wyniki. Szkoda, że dla większej przejrzystości przedstawianych danych nie zastosowano rozpoczętego we wstępie podziału na części odzwierciedlające kolejne analizowane szlaki sygnałowe, czego kontynuację w najlepszej formie, w naturalny sposób łączącą trzy silnie powiązane ze sobą kaskady sygnałowe (MAPK/ERK, PI3K/AKT, mTOR), zastosowano w dyskusji. Nie umniejsza to jednak w żaden sposób wartości uzyskanych wyników i nie wpływa na ogólnie pozytywną ocenę sposobu prezentacji uzyskanych danych.

Wyniki zostały zilustrowane reprezentatywnymi obrazami barwień immunohistochemicznych. Ich odbiór ułatwiłyby z pewnością informacje, który z badanych przypadków znajduje się na rycinie, jak został oceniony przez Badaczkę dany odczyn w zaproponowanej skali, czy też w jakim powiększeniu przedstawiono preparat.

Próba oceny zależności pomiędzy danymi klinicznymi a uzyskanymi parametrami oceniającymi aktywność szlaków sygnałowych, przy tak małej i zróżnicowanej grupie chorych i przebiegu choroby uwarunkowanym wieloczynnikowo, choć ambitna była w mojej ocenie ryzykowna, ze względu na małe prawdopodobieństwo uzyskania powtarzalnych danych. Obrazują to uzyskane, w większości nieistotne wartości parametrów statystycznych.

Jak sądzę, również Autorka miała do tych wyników stosunek krytyczny i roztropnie nie umieściła ich we wnioskach pracy.

Z obowiązku recenzentki zwracam uwagę, że w podsumowaniu możliwych powiązań pomiędzy uzyskanymi wynikami badań immunohistochemicznych i genetycznych (str. 71) Autorka wymienia parametry o znamiennej statystycznie korelacji, jednak bez interpretacji obliczonej wartości R, wskazującej na co najwyżej umiarkowaną zależność pomiędzy badanymi zmiennymi.

W „Dyskusji” Doktorantka sprawnie konfrontuje swoje spostrzeżenia z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy. Na uwagę zasługuje fakt dobrej znajomości literatury przedmiotu i umiejętnego jej cytowania. Dołączony do pracy wykaz piśmiennictwa obejmuje 181 pozycji, w tym aktualne publikacje z ostatnich lat, których dobór nie budzi zastrzeżeń.

Doktorantka zwraca uwagę na trudności interpretacyjne danych z piśmiennictwa, w odniesieniu do np. częstości mutacji *BRAFV600E*, które mogą mieć związek z wiekiem analizowanych pacjentów, a często opisywane w piśmiennictwie grupy obejmują tak dzieci, jak i dorosłych. W trakcie czytania dyskusji ponownie zwraca uwagę brak uwzględnienia w analizach genu *FGFR1*, jako potencjalnego aktywatora szlaku MAPK. Przy pozytywnej ocenie całej pracy fakt ten może dziwić zwłaszcza w kontekście tego, że jak sama Autorka podkreśliła we wstępie, występowanie zaburzeń genu *FGFR1*, pod postacią mutacji punktowych i duplikacji, jest w DNT częstsze niż przeszacowane wartości opisywane dla zmian w genie *BRAF*.

Warto podkreślić, że przedstawione wyniki dotyczące oceny aktywności szlaków WNT i HH stanowią nowe obserwacje, wymagają one jednak dalszych analiz, które, mam nadzieję, Doktorantka będzie kontynuowała. Pewne trudności Autorka napotkała przy próbach interpretacji wyników uzyskanych w trakcie oceny aktywności szlaku WNT i zaobserwowanej kumulacji  $\beta$ -kateniny u prawie połowy badanych. Należy pamiętać, że białko to pełni szereg funkcji fizjologicznych, a interpretacja ekspresji metodą western blot jest trudna w obliczu braku zastosowania wystarczającej liczby tkanek kontrolnych. Warto również zwrócić uwagę na fakt, że poziom  $\beta$ -kateniny w komórkach jest wrażliwy na substancje zewnątrzpochodne, co może mieć znaczenie w przypadku niejednokrotnie przewlekle leczonych pacjentów z DNT.

Po „Dyskusji” Autorka przedstawiła podsumowanie wyników w formie siedmiu rozbudowanych punktów niebudzących zastrzeżeń.

Rozprawa kończy się pięcioma poprawnie sformułowanymi wnioskami, które są właściwym podsumowaniem całej pracy. W moim odczuciu we wniosku pierwszym Autorce

umknęła jedynie informacja dotycząca ekspresji pERK, stwierdzonej w przeprowadzonych analizach zmiany świadczącej o aktywacji szlaku MAPK.

#### 4. Pozostałe uwagi

Do przedstawionego do recenzji tekstu rozprawy mam kilka uwag szczegółowych:

- w paragrafie 1.1, jako pozycja piśmiennictwa [2] powinno zostać zamieszczone wydawnictwo będące książką, nie artykułem
- w części „Przygotowanie materiału oraz metody histopatologiczne” brakuje odniesienia do pozycji piśmiennictwa będącej bieżącą klasyfikacją WHO
- w opisie techniki przeprowadzenia reakcji immunohistochemicznych prawdopodobnie zabrakło opisu etapu barwienia kontrastującego z użyciem hematoksyliny
- w Tabeli 7. podano rozcieńczenia, a nie stężenia użytych przeciwciał
- do analiz liczby kopii użyto sondy znajdującej się poza sekwencją kodującą genu *BRAF*, co pomimo teoretycznego braku znaczenia wymaga wyjaśnienia
- w tabeli 12 zamiast numeru katalogowego zastosowanej sondy kontrolnej powinna się znaleźć nazwa zastosowanego genu referencyjnego

#### 5. Podsumowanie recenzji

Podsumowując, uważam przedstawioną do oceny rozprawę doktorską lek. Iwony Elżbiety Sontowskiej za wartościową z naukowego i poznawczego punktu widzenia i oceniam ją pozytywnie. Na szczególne podkreślenie zasługuje wielokierunkowość przeprowadzonej oryginalnej analizy, wymagająca szczególnej sumienności i dużego nakładu pracy.

Przedstawiona praca odpowiada wymogom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych w świetle obowiązującej ustawy, dlatego też wnoszę do Rady Naukowej Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Iwony Elżbiety Sontowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. prof. nadzw.  
Magdalena Zarzewska  
Zakład Patologii Neurosamei i Neuropatologii  
Centrum Biostruktury  
Uniwersytetu Warszawskiego