Dr hab. med. Waldemar Och
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny
Kliniczny Oddział Neurochirurgiczny
10-586 Olsztyn, Żołnierska 18
E mail : waldekoch@o2.pl, tel. 606991971

Olsztyn 01.10.2021 r

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr. Małgorzaty Barbary Łukasik pt. „ Ocena ekspresji wybranych białek onkogennych w glejakach astrocytarnych OUN w korelacji z danymi histoklinicznymi „

Promotor pracy: Dr hab. n. med. Joanna Reszeć

Podstawą opracowania recenzji była uchwała Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 24.06.2021 r

Glejaki są drugą po oponiakach pod względem częstości występowania grupą pierwotnych nowotworów mózgu, natomiast pod względem złośliwości zajmują pierwsze miejsce. Histologiczna klasyfikacja grupuje glejaki w zależności od pochodzenia (gwiaździaki, skąpodrzewiaki, glejaki mieszane) oraz stopnia złośliwości (I-IV). Powszechne jest zjawisko progresji stopnia złośliwości glejaków w trakcie przebiegu choroby, czyli transformacji nowotworów o mniejszej złośliwości w guzy charakteryzujące się III stopniem złośliwości według WHO, a zwłaszcza w glejaka zarodkowego (GBM). Niedoskonałość histopatologicznego rozpoznania wynika z kryteriów subiektywnych, braku powtarzalności wyników i precyzji w ustalaniu rokowania, jak też zalecenia najwłaściwszej, indywidualnej terapii guza.

Intensywne badania molekularne (klasyfikacja guzów mózgu WHO z 2016 r) doprowadziły do odkrycia nowych markerów diagnostycznych i rokowniczych, które uściślają histomolekularną ocenę glejaków. Wykrywane w glejakach zdarzenia molekularne często się wykluczają, np. gen fuzyjny *BRAF* w gwiaździaku włosowatokmórkowym, prowadzący do aktywacji szlaku kinazy białkowej aktywowanej mitogenem oraz mutacje *IDH1/IDH2*, charakterystyczne dla gwiaździaków rozlanych w II i III stopniu złośliwości, a także wtórnych glejaków wielopostaciowych. Podobnie mutacja *IDH1/IDH2* z jednoczesną całkowitą delecją 1p/19q wzajemnie wyklucza się z mutacją genu kodującego białko TP53 nowotworu (*TP53*), czy mutacją receptora czynnika wzrostu naskórka (*EGFR*). Mutacje *IDH1/IDH2* charakteryzuje bardzo silna wartość prognostyczna u chorych na gwiaździaki w III stopniu złośliwości lub glejaki wielopostaciowe, podobnie jak metylacja promotora *MGMT* jest częstsza u chorych na glejaki źle zróżnicowane lub anaplastyczne, występuje bowiem u

60-90% spośród nich. We wtórnych GBM bardzo rzadko dochodzi do mutacji w obrębie *EGFR*, a często w obrębie *TP53*.

Stan *MGMT*, obecność kodelecji *1p/19q*, mutacji *IDH1/IDH2*, *EGFR* ma istotne znaczenie praktyczne, ponieważ umożliwia wyodrębnienie chorych, którzy potencjalnie lepiej mogą zareagować na konwencjonalną chemioterapię i radioterapię. W obliczu dramatycznego jak dotychczas rokowania w leczeniu gwiaździaków rozlanych i zarodkowych ma to istotne znaczenie. Dogłębne zbadanie krytycznych szlaków molekularnych powiązanych z przekaźnictwem wewnątrzkomórkowym i transkrypcją wpłynie na opracowanie skutecznych, selektywnych metod terapeutycznych gwiaździaków.

Temat pracy doktorskiej mgr Łukasik pt." Ocena ekspresji wybranych białek onkogennych w glejakach astrocytarnych OUN w korelacji z danymi histoklinicznymi " ściśle wiąże się z ostatnimi osiągnięciami w dziedzinie biologii molekularnej glejaków i wpisuje się w nurt tych badań .

Praca doktorska Pani Łukasik liczy 95 stron. Zawiera spis treści, wykaz stosowanych skrótów, 15 zestawień tabelarycznych skonstruowanych prawidłowo, 7 rycin z właściwymi podpisami oraz 2 ryciny zawierające fotografie preparatów histologicznych omawianych przypadków, 147 pozycji piśmiennictwa uszeregowanych w/g kolejności cytowań, streszczenie w języku polskim i angielskim.

We wstępie autorka w sposób bardzo szczegółowy, wręcz dociekliwy opisuje główne czynniki genetyczne i epigenetyczne w powstawaniu i rozwoju glejaków astrocytarnych. Zaczyna od omówienia głównych zagadnień pracy.

- Mutacji genu dehydrogenazy izocytrynianowej (*IDH*) uznawanej za istotny marker prognostyczny glejaków. Produkt *IDH*, katalizuje dekarboksylację oksydacyjną izocytrynianu i odgrywa kluczową rolę w cyklu Krebsa i homeostazie komórkowej . Mutacje IDH prowadzą w kolejności do zmniejszenia stężenia α-ketoglutaranu, następnie zmniejszenia aktywności hydroksylaz propylowych i zwiększenia stężenia czynnika HIF1-α, pomimo braku hipoksji. Komórka zachowuje się tak jakby była ciągle niedotleniona, dochodzi do pobudzenia angiogenezy, aktywacji VEGF, rozszerzenia naczyń, proliferacji i migracji komórek śródbłonka, inaktywacji genów supresorowych, aktywacji onkogenów i w konsekwencji powstania glejaka
- Oceny nieprawidłowości dotyczącej szlaku przewodzenia sygnału z receptora naskórkowego wzrostu (EGFR, endothelial growth factor receptor) do jądra komórkowego. Efektem przyłączenia liganda do EGFR, a w następstwie do jego dimeryzacji i pobudzenia, jest aktywacja szlaków przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego, co prowadzi do proliferacji komórek, hamowania apoptozy pobudzenia angiogenezy, progresji choroby nowotworowej i oporności na radio- i chemioterapię.
- Poza dwoma głównymi szlakami transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych powiązanych z EGFR: P13K/AKT oraz RAS/RAF/MEK/ERK opisuje mniej znany szlak sygnałowy JAK/STAT . Aktywacja domeny wewnątrzkomórkowej receptora EGFR pobudza białka kinaz tyrozynowych JAK (Janusowych)(tyrosine kinase family), które aktywują

cytoplazmatyczne czynniki przekaźnictwa i transkrypcji STAT (signal transducer and activator of transcription). Deregulację i karcynogenną rolę tego szlaku stwierdzono w wielu nowotworach, w tym w gwiaździakach.

- Omawia znaczenie genu *P53* w utrzymaniu homeostazy komórki i w obronie przed nowotworzeniem. Jego rola supresorowa polega na koordynowaniu odpowiedzi komórki na bodźce stresowe , takie jak hipoksja, aktywność onkogenów i uszkodzenia DNA, które zagrażają integralności genomu. Nieprawidłowości kompleksu tworzonego przez białko supresorowe TP53 stwierdza się u około połowy chorych na pierwotne GBM
- Nakreśla rolę enzymu metylotransferazy 0-6 metyloguaniny (MGMT). Enzym ten odpowiada za naprawę DNA usuwając akilowane uszkodzenia zapoczątkowywane przez leki cytotoksyczne. Zatem znaczna aktywność MGMT w komórkach nowotworu może sprzyjać oporności na chemioterapię. W przeciwieństwie do tego zahamowanie aktywności genu *MGMT* przez metylację jego promotora przyczynia się do ograniczenia ekspresji białka MGMT i ograniczenia możliwości naprawy DNA, a przez to zwiększenia wrażliwości komórek nowotworowych na działanie leków alkilujących. Metylacja *MGMT* jest częstsza u chorych na glejaki zarodkowe lub anaplastyczne, występuje bowiem u 60-90% spośród nich.

Powyższe zagadnienia autorka pracy analizuje wręcz z biochemiczną dokładnością, co świadczy o dużej wiedzy na ten temat. Jest to moim zdaniem duża wartość pracy, jednak zmusza czytelnika do znacznego skupienia się skupienia by nie zbłądzić w zakamarkach biochemicznej sieci sygnałowej komórki. W dalszej części pracy mgr Łukasik przedstawia zmodyfikowaną molekularnie klasyfikację gwiaździaków, ich epidemiologię, zachorowalność w Polsce i na świecie na te guzy, przeżywalność, czynniki prognostyczne i czynniki ryzyka związane z tą patologią. W kolejnej części dysertacji szczegółowo omawia objawy kliniczne, chirurgiczne metody leczenia, radioterapię i chemioterapię tych guzów oraz diagnostykę obrazową tych zmian. Bardzo dokładnie różnicuje poszczególne postacie gwiaździaków na płaszczyźnie histopatologicznej i immunohistochemicznej by przejść do celu pracy doktorskiej.

Szczegółowym celem pracy była ocena ekspresji białek IDH1/2, p53, MGMT, EGFR, pJAK2, pStAT3, w gwiaździakach II stopnia, anaplastycznych i zarodkowych oraz analiza wzajemnych powiązań tych parametrów oraz ocena powiązania w/w białek z rozpoznaniem histopatologicznym oraz zmiennymi klinicznymi jak wiek, płeć i lokalizacja zmiany.

Badaniem zostało objętych stu pacjentów chorych na nowotwór glejowy, leczonych w Klinice Neurochirurgii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku w latach 2011-2019. Klasyfikację pacjentów do badania przeprowadzono retrospektywnie. Do badania włączono 60 pacjentów z diagnozą glejaka zarodkowego, oraz 20 osób z rozpoznaniem glejaka anaplastycznego , a grupę porównawczą stanowiło 20 osób z gwiaździakiem rozlanym II stopnia. Rozpoznanie histopatologiczne oparto na klasyfikacji WHO z Lyon 2007 r, a po uzyskaniu wyników ekspresji białka IDH1/2 we wszystkich badanych guzach dokonano reklasyfikacji stopnia złośliwości nowotworowej wg kryteriów

WHO z 2016 r. Zarówno charakterystyka materiału do badań, zastosowana metodyka immunohistochemiczna, sposób oceny ekspresji badanych białek oraz statystyczne opracowanie wyników nie budzą zastrzeżeń. Cała metodologia i uzyskanie wyników wskazują na staranność przeprowadzonego badania.

Uzyskane wyniki zweryfikowały postawiony cel pracy i zostały skonkretyzowane we wnioskach. Autorka pracy stwierdziła, iż ekspresja białka IDH1/2 metodą immunohistochemiczną nie odzwierciedla obecności lub braku mutacji *IDH*R132H w gwiaździakach i nie powinna być stosowana w praktyce klinicznej, natomiast do oceny zmian w genie *IDH* rekomenduje metody molekularne. Przeprowadzone badanie wykazało, że ekspresja białka MGMT oraz nadekspresja białek p53 i EGFR obecna jest w gwiaździakach II, III i IV, a częstość ekspresji MGMT i EGFR rośnie wraz ze wzrostem stopnia złośliwości. Mgr Łukasik wykazała też, że szlak sygnałowy JAK/STAT jest aktywowany w gwiaździakach II, III i IV stopnia, a ekspresja pJAK2 i pSTAT3 wykazuje zależność ze stopniem złośliwości guza, oraz że aktywacja tego szlaku może być związana z nabyciem przez glejaki astrocytarne cech agresywnych, typowych dla guzów wysokiego stopnia. Istotnym wynikiem jest też stwierdzenie w badanych guzach współwystępowania ekspresji EGFR i pSTAT3, EGFR i pJAK2, pJAK2 i pSTAT3 oraz, że stałe przekaźnictwo STAT3 może być skutkiem zarówno nadekspresji EGFR, jak i aktywacji kinazy Janusowej 2. Autorka pracy nie uzyskała powiązania pomiędzy badanymi białkami a parametrami klinicznymi jak wiek i płeć oraz powiązanie ekspresji MGMT z lokalizacją guza. Przedstawiona w pracy dyskusja jest wartościowa, oparta na znajomości bogatego piśmiennictwa. Autorka podchodzi z dystansem do własnych wyników i konfrontuje je z doniesieniami innych autorów. W rozdziale tym każde badane zagadnienie jest omawiane bardzo szczegółowo. Przedstawiona problematyka jest rzeczowa i świadczy o rozległej wiedzy autorki na przedstawiony temat pracy.

Dysertacja napisana jest poprawnym językiem. Praca jest oryginalna i wartościowa, poruszająca istotne problemy diagnostyczne. Uzyskane wyniki oparte są na bogatym materiale. Przedstawione wnioski ukazują istotne powiązania pomiędzy ekspresją badanych białek i szlakiem sygnałowym JAK/STAT w gwiaździakach. Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za proces nowotworowy są bardzo skomplikowane poprzez powiązanie z wieloma szlakami sygnałowymi. Autorka pracy uzyskanymi wynikami wnosi wkład w zrozumienie trudnych procesów prowadzących do kancerogenezy oraz progresji stopnia złośliwości w trakcie przebiegu choroby. Leczenie glejaków jest pomimo postępów chirurgii, radio- i chemioterapii są nadal bardzo niezadowalające. Poznanie sygnatury molekularnej tych guzów daje szansę na indywidualną, ukierunkowaną terapię. Podsumowując, Pani mgr Łukasik wykazała się umiejętnością prowadzenia tematyki badawczej, formułowania hipotez, używania narzędzi statystycznych oraz krytyczną analizą wyników, ich interpretacją i stawianiem wniosków. Przedstawioną do recenzji pracę uważam za wartościową, ważną z punktu widzenia diagnostyki, leczenia i rokowania chorych z guzami astrocytarnymi mózgu. Praca ma duży aspekt poznawczy i edukacyjny.

Rozprawa doktorska magister Małgorzaty Barbary Łukasik 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 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz.1669 z późn.zm).

Wnioskuję do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Małgorzaty Barbary Łukasik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. med. Waldemar Och

Dr hab. n. med. Waldemar Och
specjalista neurochirurg
5478768