KATEDRA I ZAKŁAD PATOMORFOLOGII KLINICZNEJ
UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W LUBLINIE
Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Justyna Szumiło
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b, tel. (81) 448 65 30; 448 65 32 fax (81) 448 65 31
e-mail: patomorfologia@umlub.pl www.patomorfologia.lublin.pl

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Łukasik pt.

***„Ocena ekspresji wybranych białek onkogennych w glejakach astrocytarnych OUN w korelacji z danymi histoklinicznymi"*,**

wykonanej na Wydziale Lekarskim

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

pod kierunkiem dr hab. n. med. Joanny Reszeć

Gwiaździaki astrocytarne o wyższym stopniu złośliwości (III i IV wg WHO) należą do nowotworów źle rokujących. Jest to następstwem kilku czynników, w tym biologii guza, często opóźnionego rozpoznania – spowodowanego dużą różnorodnością objawów klinicznych oraz ograniczoną skutecznością stosowanych metod leczenia. W celu zmiany niekorzystnej sytuacji nowotwory te, zwłaszcza glejak zarodkowy, stały się w ostatnim czasie przedmiotem intensywnych badań, których następstwem jest pogłębienie wiedzy o gliomagenezie, aktualizacja klasyfikacji i modyfikacja terapii. W nurt badań nad glejakami astrocytarnymi wpisuje się przekazana do recenzji rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Łukasik.

Dysertacja liczy 95 stron wydruku komputerowego o typowy układzie. W 27-stronnicowym wstępie Autorka przedstawia zagadnienia związane z patogenezą glejaków astrocytarnych, zwłaszcza czynniki genetyczne i epigenetyczne, w tym będące w centrum podjętych badań własnych (IDH1/2, p53, EGFR, szlak sygnałowy Jak/STAT). Następnie omawia pokrótce klasyfikację WHO tych nowotworów oraz epidemiologię, czynniki ryzyka i czynniki prognostyczne. W drugiej części wstępu Doktorantka szczegółowo opisuje zagadnienia kliniczne z zakresu diagnostyki (klinicznej, obrazowej, histopatologicznej, immunohistochemicznej, genetycznej) i leczenia glejaków (chirurgicznego, radio- i chemioterapii), z uwzględnieniem czynnika predykcyjnego chemioterapii – metylacji promotora genu MGMT (także jednego z elementów ocenianych w rozprawie). Wstęp jest napisany w sposób interesujący i nie zawiera większych

nieścisłości. Moim zdaniem mógłby być nieco mniej obszerny, bez umniejszenia wartości merytorycznej oraz powinien uwzględniać krótkie wprowadzenie czytelnika w poruszaną problematykę przed podaniem konkretnych informacji. Ponadto, podrozdział dotyczący diagnostyki histopatologicznej ogranicza się do opisu cech mikroskopowych glejaków, brak natomiast chociaż podstawowych informacji o rodzaju materiału będącego podstawą takiej diagnostyki czy sposobu jego uzyskania. Mgr Łukasik niepotrzebnie zastępuje dobrze utrwalone w polszczyźnie pojęcia ich anglojęzycznymi/łacińskim odpowiednikami np. prognoza zamiast swojskiego rokowania, nekroza zamiast martwicy, splenium ciała modzelowatego zamiast płata (str. 21).

Wstęp został poprzedzony spisem treści i spisem skrótów zastosowanych w pracy wraz z wyjaśnieniami.

Następnie Autorka formułuje cztery szczegółowe cele rozprawy, którymi są: ocena ekspresji białek IDH1/2, p53, MGMT, EGFR, pJAK2, pSTAT3 w gwiaździakach w II stopniu złośliwości, gwiaździakach anaplastycznych i w glejakach zarodkowych, analiza wzajemnych zależności ekspresji wymienionych białek oraz zależności pomiędzy ekspresją a rozpoznaniem histopatologicznym nowotworu oraz wiekiem i płcią pacjentów a także lokalizacją guza w ośrodkowym układzie nerwowym.

W kolejnym rozdziale dotyczącym Materiału i metodyki badań Doktorantka opisuje badaną grupę pacjentów, obejmującą sto osób leczonych operacyjnie z powodu glejaków astrocytarnych w Klinice Neurochirurgii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku, które rozpoznawano w Akademickim Ośrodku Diagnostyki Patomorfologicznej i Genetyczno-Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w latach 2011-2019. Badania przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Bioetycznej. Informacje kliniczne (wiek, płeć, umiejscowienie guza w ośrodkowym układzie nerwowym) o rozpoznaniu patomorfologicznym uzyskała z systemu informatycznego Ośrodka (błędnie podano nazwę systemu – Petarch zamiast Patarch). Podstawą rozpoznania była klasyfikacja WHO z 2007 r. a po uzyskaniu wyników ekspresji białka IDH1/2 poddano reklasyfikacji stopień złośliwości guzów w oparciu o klasyfikację z 2016 r. Do badań wybrano 60 przypadków glejaków zarodkowych oraz po 20 przypadków gwiaździaków anaplastycznych i rozlanych w II stopniu złośliwości. Na wybranym materiale z archiwalnych bloczków parafinowych zawierającym utkanie nowotworowe wykonano odczyny immunohistochemiczne z przeciwciałami przeciwko MGMT, IDH1/2, p53, EGFR, JAK2 i STAT3. Za wyjątkiem odczynu na EGFR, były one przeprowadzane manualnie. Odczyny oceniano według jednolitego schematu. Wyniki badań poddawano analizie statystycznej.

Informacje szczegółowe dotyczące grupy badanej i wykonanych odczynów zamieszczono w czterech tabelach. Dobór grup badanych oraz opis zastosowanych metod, w tym testów statystycznych nie budzi większych zastrzeżeń - jest szczegółowy i pozwala na odtworzenie badań. Wątpliwości nasuwa jednak użycie pojęcia „niskiego i wysokiego odczynu" w odniesieniu do buforu cytrynianowego przy opisie odmaskowywania antygenu (str. 39). Autorka miała prawdopodobnie na myśli pH roztworu, a nie odczyn. Ponadto, wszystkie skróty użyte Tabelach 2 i 3 powinny być wyjaśnione pod tabelą.

Najważniejszą częścią dysertacji jest rozdział poświęcony Wynikom. W pierwszej części Autorka podała szczegóły statystyki opisowej ocenianej grupy pacjentów i nowotworów. Badaniami objęła osoby w przedziale wieku 23-83 lat (średnia 57,49 lat, SD ± 13,33), z przewagą mężczyzn (M/K= 1,2). Najwięcej nowotworów lokalizowało się w płacie skroniowym (26%) oraz w czołowym i ciemieniowym (po 19%). Glejaki zarodkowe i gwiaździaki anaplastyczne były najczęstsze w płacie skroniowym (odpowiednio 27 i 35%), natomiast gwiaździaki rozlane w ciemieniowym (25%). Najrzadsza lokalizacja dla glejaka zarodkowego to płat potyliczny (5%), dla gwiaździaka anaplastycznego – płaty potyliczny i ciemieniowy (po 5%), a dla gwiaździaka rozlanego – płat potyliczny (0). W dalszej części rozdziału mgr Łukasik prezentuje i omawia wyniki oceny imunoekspresji badanych białek oraz wyniki analizy statystycznej. Immunoekspresję IDH stwierdziła w 86%, EGFR w 89%, MGMT w 50%, p53 w 97%, pJAK2 w 87%, a pSTAT3 w 91% badanych nowotworów. W glejakach zarodkowych odnotowała ekspresję IDH w 81,6%, EGFR w 98,3%, MGMT w 66,6%, p53 w 95%, pJAK2 w 100%, a pSTAT3 w 100% guzów. W gwiaździakach anaplastycznych stwierdziła ekspresję: IDH w 95%, EGFR w 90%, MGMT w 35%, p53 w 100%, pJAK2 w 75%, a pSTAT3 w 80% guzów. Natomiast dla gwiaździaków rozlanych wartości te były następujące: IDH w 90%, EGFR w 60%, MGMT w 15%, p53 w 100%, pJAK2 w 60%, a pSTAT3 w 75% guzów. Doktorantka wykazała istotny statystycznie ($p<0,05$) związek między ekspresją EGFR i pJAK2, EGFR i pSTAT3 oraz pJAK2 i pSTAT3. Istotna statystycznie była także zależności między ekspresją EGFR, MGMT, pJAK2 i pSTAT3 a rozpoznaniem histopatologicznym nowotworu. Różnice w ekspresji wszystkich badanych białek w odniesieniu do wieku i płci pacjentów w poszczególnych typach histologicznych glejaków astrocytarnych nie były istotne. Nie wykazała istotnej zależności ekspresji białka MGMT od lokalizacji guza. W rozdziale Wyniki, Doktorantka zamieściła także dziesięć tabel i siedem rycin. Opis wyników i ich prezentacja w tekście są przejrzyste. Opis odzwierciedla dane prezentowane w tabelach. Tabele zostały skonstruowane prawidłowo a ich podpisy są wyczerpujące. Jedynie na rycinach 5 i 6 obrazujących

lokalizację guzów Doktorantka powinna konsekwentnie zachować jednolitą kolorystykę poszczególnych lokalizacji. Powinna także tłumaczyć pod tabelą skróty w niej użyte, mimo ich wcześniejszego wyjaśnienia w tekście (LG, AA, GMB).

Kolejnym rozdziałem dysertacji jest Dyskusja - w mojej opinii jest on najbardziej wartościowy, pokazujący dojrzałość naukową Kandydatki. Ma ona formę strukturyzowaną, dzięki czemu pani Łukasik odnosi się do każdej grupy otrzymanych wyników i konfrontuje je z danymi z piśmiennictwa. Dyskusja jest rzeczowa, spójna i świadczy o rzetelnym poznaniu problematyki podjętej w dysertacji. Co szczególnie warte podkreślenia, pani Łukasik nie pomija ograniczeń związanych zwłaszcza z metodyką, którymi obarczone są jej badania oraz rozbieżności, czasami znacznych, z wynikami z piśmiennictwa. Stara się je racjonalnie wytłumaczyć na gruncie posiadanej wiedzy i doświadczenia badawczego. W rozdziale brak jednak krótkiego podsumowania wcześniejszych rozważań i wskazującego kierunki możliwych dalszych poszukiwań naukowych.

Mgr Małgorzata Łukasik podsumowała wyniki pracy doktorskiej w siedmiu wnioskach, które odpowiadają założonym celom. Wykazała, że w gwiaździakach ocena ekspresji białka IDH1/2 metodą immunohistochemiczną nie odzwierciedla statusu mutacyjnego (*IDH* R132H), w związku z tym w diagnostyce tych rozrostów zaburzenia genetyczne powinny być oceniane jedynie metodami molekularnymi. Stwierdziła ekspresję białka MGMT oraz nadekspresję białek p53 i EGFR w gwiaździakach II, III i IV stopnia, przy czym częstość występowania ekspresji MGMT i EGFR zwiększała się wraz ze wzrostem stopnia złośliwości guza. Potwierdziła aktywację szlaku sygnałowego JAK/STAT w gwiaździakach II, III i IV stopnia oraz związek częstość występowania ekspresji pJAK2 i pSTAT2 ze stopniem złośliwości guza. Zasugerowała, że aktywacja szlaku JAK/STAT może być związana z nabyciem przez glejaki astrocytarne cech agresywnych, typowych dla guzów o wysokim stopniu złośliwości. Zaobserwowała współwystępowanie ekspresji EGFR i pSTAT3, EGFR i pJAK2 oraz pJAK2 i pSTAT3. Wywnioskowała stąd, że stałe przekaźnictwo STAT3 w gwiaździakach może być skutkiem zarówno nadekspresji EGFR, jak i JAK2. Wykazała także brak zależności ekspresji wszystkich badanych białek od wieku i płci pacjentów, a białka MGMT od lokalizacji nowotworu w ośrodkowym układzie nerwowym.

Dysertację kończy zwięzłe streszczenia w języku polskim i angielskim. Kolejnym krótkim, ale istotnym elementem pracy jest Aneks zawierający zdjęcia z odczynów immunohistochemicznych. Zdjęcia w liczbie dwunastu są zblokowane (2x po 6) z użyciem dwóch powiększeń i zawierają przykłady odczynów ze wszystkimi zastosowanymi w pracy

przeciwciałami. Zdjęcia są przekonujące, chociaż jakość niektórych nie w pełni zadowala. Szkoda, że Doktorantka zamiast dwóch powiększeń z jednego typu histologicznego nowotworu – glejaka zarodkowego – nie zamieściła zdjęć odczynów w innych typach guzów.

W końcowej części pracy znajdują się, przydatne dla czytelnika, zestawienia rycin i tabel oraz spis piśmiennictwa. Piśmiennictwo liczy 147 pozycji, w języku angielskim, z wyjątkiem kilku podręczników w języku ojczystym. Większość prac ukazała się w ostatnich dziesięciu latach. Wybór piśmiennictwa jest trafny, cytowane są najważniejsze opracowania z zakresu interesującego panią Łukasik. Jednak Doktorantka powinna położyć większy nacisk na ujednolicenie tego rozdziału. Niepotrzebnie stosuje w niektórych pozycjach pełne nazwy a nie obowiązujące skróty nazw czasopism (np. poz. 17) lub duże litery w tytułach publikacji (np. poz. 4 lub 105).

W mojej opinii, rozprawa mgr Małgorzaty Łukasik jest oryginalnym i wartościowym osiągnięciem naukowym. Doktorantka przeprowadziła badania w oparciu o duży, zweryfikowany materiał pochodzący z jednego ośrodka. Jasno określiła cele pracy, prawidłowo zaplanowała badania z użyciem szerokiego panelu odczynów immunohistochemicznych a uzyskane wyniki poddała analizie statystycznej w oparciu adekwatne testy. Uzyskane wyniki mają znaczenie praktyczne i poznawczo-naukowe. Kandydatka wykazała się bardzo dobrą znajomością poruszanych zagadnień i umiejętnością trafnego wnioskowania. Dysertacja w większości napisana jest prawidłową polszczyzną, w sposób uporządkowany i przejrzysty, z dbałością o szatę graficzną. Wskazane przeze mnie niedociągnięcia i uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej.

W związku z powyższym uważam, że dysertacja magister Małgorzaty Barbary Łukasik w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom na stopień doktora zawartym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 z późn.zm.) i 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.).

Wnoszę więc do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie magister Małgorzaty Barbary Łukasik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, dnia 28 września 2021 r.

Prof. dr hab. n. med. Justyna Szumiło