

**Dr hab. n. med. Przemysław Witek**

**Specjalista chorób wewnętrznych, endokrynologii i diabetologii**

**Kierownik Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Endokrynologii i Diabetologii**

**Wydział Lekarski; Warszawski Uniwersytet Medyczny**

**Mazowiecki Szpital Bródnowski; ul. L. Kondratowicza 8; 03-242 Warszawa**



## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**mgr inż. Joanny BORESOWICZ**

**Po zapoznaniu się z rozprawą na stopień doktora nauk medycznych**

**mgr inż. Joanny Boresowicz pt.:**

***„Ocena roli zaburzeń ekspresji mikroRNA oraz profilu metylacji DNA  
w patogenezie gonadotropowych gruczolaków przysadki mózgowej”***

**poniżej przedstawiam swoją opinię.**

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych**

**mgr inż. JOANNY BORESOWICZ**

**pt: „Ocena roli zaburzeń ekspresji mikroRNA oraz profilu metylacji DNA w patogenezie gonadotropowych gruczolaków przysadki mózgowej.”**

**I.UWAGI OGÓLNE**

W związku z powołaniem mnie przez Radę Naukową Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Boresowicz poniżej przedstawiam swoją opinię.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Joanny Boresowicz pt.: *„Ocena roli zaburzeń ekspresji mikroRNA oraz profilu metylacji DNA w patogenezie gonadotropowych gruczolaków przysadki mózgowej.”* Powstała pod kierunkiem naukowym dr. hab. n. med. Mateusza Bujko w Pracowni Badań Translacyjnych Zakładu Onkologii Molekularnej i Translacyjnej Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie, którego Kierownikiem jest Prof. dr hab. n. med. Janusz A. Siedlecki.

Neuroendokryne guzy przysadki, określane w przeszłości jako gruczolaki przysadki stanowią istotny odsetek wszystkich guzów wewnątrzczaszkowych szacowany według piśmiennictwa na 15-25% i zajmują - po glejakach i oponiakach - trzecie miejsce pod względem częstości w grupie nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. W przypadku guzów hormonalnie czynnych, a więc takich, które wydzielają w nadmiarze konkretny hormonu (np. PRL, ACTH, TSH lub GH) dochodzi do rozwoju konkretnych jednostek chorobowych zasady diagnostyki są jasno określone, a podłoże molekularne coraz lepiej poznane. Z kolei w guzach przysadki, które nie wydzielają konkretnego hormonu i są znane jako „guzy nieczynne hormonalnie” jak dotąd nie określono jednoznacznie molekularnych czynników determinujących często inwazyjny rozrost tych guzów. Istotną część tych „nieczynnych hormonalnie” guzów neuroendokrynych przysadki to w rzeczywistości guzy wywodzące się z komórek gonadotropowych. Biologia tych guzów jest mniej poznana, a wysoka częstość występowania powinna skłaniać do prowadzenia badań w tym zakresie, tym bardziej, że charakteryzują się często inwazyjnym wzrostem oraz ciężkimi powikłaniami neurologicznymi i okulistycznymi.



W dalszej części pracy Doktorantka formułuje cel główny i cele szczegółowe pracy. I tak **celem** przeprowadzonych badań, opublikowanych w przedstawianym cyklu, było określenie znaczenia zaburzeń epigenetycznych – nieprawidłowej metylacji DNA oraz ekspresji mikroRNA - w patogenezie i w inwazyjnym rozroście klinicznie nieczynnych hormonalnie, gonadotropowych gruczolaków przysadki.

Za cele szczegółowe poszczególnych prac cyklu Doktorantka uznała:

1. Określenie zakresu zaburzeń wzoru metylacji DNA w obrębie genów kodujących białka i wpływu tych zaburzeń na ekspresję genów w nieczynnych guzach gonadotropowych przysadki
2. Określenie wpływu nieprawidłowej metylacji DNA w obrębie genów kodujących miRNA na ekspresję tych miRNA i potencjalnych efektów dla zaburzenia ekspresji genów w nieczynnych guzach gonadotropowych przysadki
3. Określenie różnic w ekspresji miRNA pomiędzy guzami o inwazyjnym rozroście a guzami nieinwazyjnymi
4. Określenie różnicy w metylacji sekwencji powtórzonych LINE-1 pomiędzy guzami o inwazyjnym rozroście a guzami nieinwazyjnymi.

Cele zostały zrealizowane i szczegółowo omówione w cyklu 4 prac naukowych napisanych i opublikowanych w języku angielskim:

1) Paulina Kober, Joanna Boresowicz, Natalia Rusetska, Maria Maksymowicz, Agnieszka Paziewska, Michalina Dąbrowska, Jacek Kunicki, Wiesław Bonicki, Jerzy Ostrowski, Mateusz Bujko. The role of aberrant DNA methylation in misregulation of gene expression in gonadotroph nonfunctioning pituitary tumors. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11):1650. doi: 10.3390/cancers11111650. [Wskaźnik IF: 6,126; Punktacja MNiSW: 140]

2) Joanna Boresowicz, Paulina Kober, Natalia Rusetska, Maria Maksymowicz, Agnieszka Paziewska, Michalina Dąbrowska, Natalia Zeber-Lubecka, Jacek Kunicki, Wiesław Bonicki, Jerzy Ostrowski, Janusz A. Siedlecki, Mateusz Bujko. DNA Methylation Influences miRNA Expression in Gonadotroph Pituitary Tumors. *Life* 2020, 10, 59. doi: 10.3390/life10050059 [Wskaźnik IF: 2,991; Punktacja MNiSW: 70]

3) Joanna Boresowicz, Paulina Kober, Natalia Rusetska, Maria Maksymowicz, Agnieszka Paziewska, Michalina Dąbrowska, Natalia Zeber-Lubecka, Jacek Kunicki, Wiesław Bonicki, Jerzy Ostrowski, Janusz A. Siedlecki, Mateusz Bujko (2020) The search of miRNA related to invasive growth of nonfunctioning gonadotropic pituitary tumors. 2020: 3730657. doi: 10.1155/2020/3730657 [Wskaźnik IF: 2,299; Punktacja MNiSW: 70]

4) Natalia Rusetska, Paulina Kober, Sylwia Katarzyna Król, Joanna Boresowicz, Maria Maksymowicz, Jacek Kunicki, Wiesław Bonicki, Mateusz Bujko (2021) Invasive and noninvasive nonfunctioning gonadotroph pituitary tumors differ in DNA methylation level of LINE-1 repetitive elements. 10:560. doi: 10.3390/jcm10040560 [Wskaźnik IF: 3,303; Punktacja MNiSW: 140]

Łączna punktacja prac składających się na przedstawiony do recenzji cykl publikacji to: **420 punktów MEiN oraz wskaźnik IF 14,719**. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie z listy A MEiN. Punktację tę należy ocenić jako wysoką.

Z tego powodu podjęty przez mgr inż. Joannę Boresowicz temat pracy naukowej dotyczący tych mniej poznanych gruczolaków przysadki oraz badania dotyczące udziału czynników epigenetycznych: metylacji DNA oraz ekspresji mikroRNA w powstawaniu i inwazyjnym rozroście gonadotropowych guzów przysadki zasługuje na uznanie, gdyż może to mieć duże znaczenie praktyczne w czasie, gdy wiele badań dotyczących guzów przysadki jest prowadzonych właśnie w kierunku ustalenia definicji ich inwazyjności oraz wpływu rozmaitych czynników na skuteczność leczenia operacyjnego.

## II. OCENA FORMALANA PRACY

Rozprawa liczy 96 stron tekstu i obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa. Najważniejszą częścią przedstawionej mi rozprawy są kopie 4 prac naukowych, z czego w dwóch z nich Doktorantka jest pierwszym autorem (publikacja 2 i 3), w jednej pracy drugim autorem (publikacja nr 1) – autorstwo równoważne z pierwszym, a w publikacji 4 jednym z ośmiorga autorów.

Rozprawa została podzielona na 13 rozdziałów, a jej układ jest typowy dla rozpraw doktorskich powstałych na bazie opublikowanych oryginalnych artykułów naukowych. Wstęp oraz cele pracy poprzedzają fotokopie 4 publikacji naukowych. W dalszej części rozprawa zawiera opis publikacji w języku polskim, podsumowanie wyników oraz wnioski. Ostatnią częścią jest spis piśmiennictwa oraz wymagane oświadczenia współautorów i opinie Komisji Bioetycznej NIO-PIB.

**Streszczenie** tak w języku polskim jak angielskim ma prawidłowy układ i pozwala na zwięzłe zapoznanie się z tematem i wynikami badań. Następnie Doktorantka przedstawia również w obu językach słowa kluczowe. **Wstęp** obejmuje 5 stron tekstu i ma charakter bardzo przejrzystego i syntetycznego wprowadzenia do omawianych zagadnień oraz przedstawia aktualny stan wiedzy. Warto tu podkreślić, że Doktorantce udało się uniknąć bardzo często obserwowanego w rozprawach doktorskich błędu, którym jest zdecydowanie za długi i niezwiązany z tematem pracy wstęp. **Cele** pracy są sformułowane precyzyjnie, a **wnioski** odpowiadają celom rozprawy. Końcową składową pracy jest trafnie dobrane, specjalistyczne **piśmiennictwo** obejmujące 42 pozycje, z których ponad 80% stanowią artykuły opublikowane po 2015 roku. Piśmiennictwo to stanowi dodatek do bardziej rozbudowanego piśmiennictwa, które cytowano w każdym z 4 artykułów składających się na cykl publikacji.

Część pracy napisaną w języku polskim należy ocenić wysoko z pkt. widzenia językowego – język pracy jest profesjonalny, argumentacja jest przejrzysta, a strona edytorska jest bardzo staranna. Z punktu widzenia formalnego praca nie budzi zastrzeżeń.

### III. OCENA MERYTORYCZNA PRACY

Jak już wspomniano **wstęp** do prezentowanej pracy obejmuje 5 stron tekstu i jest czytelny, przejrzysty i precyzyjny. W sposób nie budzący zastrzeżeń przedstawia przegląd piśmiennictwa dotyczącego epidemiologii gruczolaków przysadki ze szczególnym uwzględnieniem guzów gonadotropowych i prezentuje aktualny stan wiedzy na temat tak aspektów klinicznych jak i zagadnień molekularnych mechanizmów patogenezы guzów gonadotropowych, które są wciąż zbyt mało poznane. Doktorantka syntetycznie opisuje zjawiska epigenetyczne takie jak zaburzenia w procesie metylacji DNA czy też ekspresji mikroRNA, które mogą mieć udział w etiopatogenezie nowotworów przysadki. Trafnie podkreśla znaczenie ewentualnych związków pomiędzy poziomem ekspresji określonych miRNA oraz konkretnymi profilami metylacji DNA a inwazyjnym wzrostem guzów. Można sądzić, że identyfikacja takich biomarkerów inwazyjnego wzrostu guzów gonadotropowych miałaby duże implikacje praktyczne. Należałoby zauważyć pewną rozbieżność pomiędzy częstością guzów gonadotropowych, o których pisze Doktorantka we wstępie – 33% (str. 10), a częstością 24% w streszczeniu rozprawy (str. 7). W rzeczywistości jednak nie jest możliwe tak precyzyjne oszacowanie częstości guzów gonadotropowych i w piśmiennictwie częstość ta podawana jest zwykle w szerokich przedziałach.

We wstępie zwracają uwagę również drobne niezręczności językowe, np. na str. 10 Doktorantka pisze, że guzy nieczynne hormonalnie przebiegają „bez objawów spowodowanych nadmiernym wydzielaniem hormonów tropowych” – w rzeczywistości często to nie hormony tropowe prowadzą do objawów, tylko hormony wydzielane przez gruczoły obwodowe np. nadmiar kortyzolu w chorobie Cushinga czy nadmiar hormonów tarczycy w guzach tyreotropowych. Podobnie niezręczne jest określenie: „dostępny z użyciem kraniotomii” – lepiej byłoby użyć określenia „konieczny jest dostęp przezczaszkowy” lub „dostęp metodą kraniotomii”. Niezręczności te nie mają jednak wpływu na aspekty merytoryczne pracy.

Całość wstępnej części pracy wskazuje na bardzo dobre przygotowanie specjalistyczne i wysoką wiedzę merytoryczną Doktorantki, a także znajomość piśmiennictwa z opisywanego zakresu. Wstęp ten w końcowej części określa obszary, w których obecny stan wiedzy jest niewystarczający co pozwala na płynne przejście do celów przeprowadzanych przez Doktorantkę badań. W mojej opinii elementem, którego we wstępie brakuje, a który być może powinien się tam znaleźć jest krótki opis tego co rozumie się pod pojęciem „inwazyjnego” czy „agresywnego” wzrostu. Jest to o tyle ważne, że pojęcia inwazyjności używa się w omawianej pracy tak w celach jak we wnioskach dysertacji, a kwestia ta obecnie jest przedmiotem szerokich dyskusji w środowisku endokrynologów, neurochirurgów, radiologów i patologów zajmujących się guzami przysadki.

W pierwszej pracy z cyklu pt. „The role of aberrant DNA methylation in misregulation of gene expression in gonadotroph nonfunctioning pituitary tumors” Doktorantka jest drugim autorem jednakże autorstwo to jest oznaczone jako równoważne z autorem pierwszym pracy. Celem tej wysoko punktowanej (140 pkt MEiN) pracy była identyfikacja regionów genomowych kodujących geny i ich sekwencje regulatorowe o nieprawidłowym poziomie metylacji w guzach gonadotropowych przysadki oraz określenie wpływu tych nieprawidłowości na poziom ekspresji genów. W pracy tej przebadano 32 wycinki nieczynnych guzów gonadotropowych przysadki oraz fragmenty prawidłowej przysadki poddając je profilowaniu metylacji DNA oraz ekspresji genów z użyciem metod wielkoskalowych.

W pracy tej wykazano znaczący zakres zaburzeń epigenetycznych w obrębie regionów kodujących białka w nieczynnych gonadotropowych guzach przysadki oraz potwierdzono istotny wpływ nieprawidłowej metylacji DNA na profil ekspresji genów. Geny, których ekspresja ma związek ze zmienioną metylacją DNA powiązane są z ważnymi szlakami i procesami komórkowymi, a część z nich charakteryzuje się wyraźnie zmienionym poziomem ekspresji w guzach. Obserwacje te mają charakter oryginalny i mogą mieć znaczenie praktyczne.

W drugiej pracy cyklu pt. „DNA Methylation Influences miRNA Expression in Gonadotroph Pituitary Tumors” Doktorantka jest pierwszym autorem. Celem tej pracy była ocena znaczenia różnic w stopniu metylacji DNA genów kodujących miRNA na ekspresję dojrzałych cząsteczek mikroRNA w nieczynnych hormonalnie gonadotropowych guzach przysadki. W pracy tej, opublikowanej w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej po raz pierwszy opisano nieprawidłową metylację DNA genów kodujących miRNA w gonadotropowych guzach przysadki. Poziom ekspresji 12 dojrzałych miRNA okazał się być też powiązany z nieprawidłową metylacją DNA w obrębie kodujących je genów co potwierdzono uzyskując istotność w teście korelacji Spearmana.

Trzecia praca, również opublikowana w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej, nosi tytuł: „The search of miRNA related to invasive growth of nonfunctioning gonadotropic pituitary tumors.” Dotyka ona bardzo istotnego z klinicznego punktu widzenia zagadnienia predyspozycji i zaburzeń leżących u podstaw inwazyjnego rozrostu guza. Tematyka ta wpisuje się w szeroko dyskutowane w piśmiennictwie zagadnienie inwazyjności guzów przysadki i kryteriów, na podstawie których taką inwazyjność należy definiować, a które nie zawsze są tożsame dla wszystkich typów histologicznych guzów przysadki. Zagadnienie to jest też szczególnie istotne w przypadku neuroendokrynych guzów gonadotropowych przysadki gdyż nie dają one konkretnego zespołu objawów związanych z nadprodukcją hormonalną co ma wpływ na opóźnienie rozpoznania i zdecydowanie gorsze wyniki leczenia w chwili, gdy guz ma już znaczące rozmiary, nacieka struktury krytyczne i prowadzi do objawów okulistycznych i neurologicznych. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że nie istnieje najprawdopodobniej uniwersalny profil ekspresji miRNA charakteryzującego gonadotropowe

guzy inwazyjne, a sam inwazyjny rozrost tych gruczolaków jest złożoną cechą i może być warunkowany na drodze wielu różnych mechanizmów molekularnych. Obserwacje te korespondują z trudnościami obserwowanymi na poziomie klinicznym przez specjalistów endokrynologów i neurochirurgów zajmujących się pacjentami z guzami przysadki.

W ostatniej, czwartej pracy pt. „*Invasive and noninvasive nonfunctioning gonadotroph pituitary tumors differ in DNA methylation level of LINE-1 repetitive elements.*” Doktorantka wraz ze Współautorami postawiła sobie za cel analizę poziomu metylacji DNA w obrębie elementów LINE-1, aby uzupełnić ocenę znaczenia metylacji DNA w inwazyjnym wzroście nieczynnych guzów gonadotropowych. Badanie przeprowadzono na materiale tkankowym 80 nieczynnych gonadotropowych guzów przysadki, z których 2/3 wykazywało inwazyjny rozrost.

Uzyskane wyniki potwierdziły hipometylację DNA sekwencji LINE-1 w klinicznie nieczynnych gonadotropowych guzach przysadki, jak również różnice w poziomie metylacji LINE-1 pomiędzy guzami inwazyjnymi i nieinwazyjnymi, co pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami. Dodatkowo została potwierdzona zależność pomiędzy metylacją DNA a ekspresją mRNA białek kodowanych przez badane sekwencje powtórzone, choć nie udało się jednoznacznie wykazać związku pomiędzy aktywnością retroranspozonomą a inwazyjnym rozrostem guza.

W dalszej części Doktorantka zwięźle podsumowuje uzyskane i zaprezentowane w cyklu publikacji wyniki badań wskazując jednocześnie obszary, które nadal pozostają niejasne. Do takich obszarów należy np. pytanie o czynnik inicjujący zaburzenia metylacji DNA w gonadotropowych guzach przysadki.

Na zakończenie pracy Doktorantka przedstawiła **5 wniosków** wynikających z przeprowadzonych i opublikowanych badań. Wnioski te odpowiadają postawionym celom recenzowanej pracy badawczej. W mojej ocenie jako klinicysty zajmującego się diagnostyką i leczeniem pacjentów z guzami przysadki szczególnie interesujące są wnioski podkreślające jedynie nieznaczne różnice pomiędzy guzami gonadotropowymi o inwazyjnym wzroście i guzami nieinwazyjnymi (wniosek 4 i 5) – wskazują one na fakt, że prawdopodobnie długo jeszcze nie będą w pełni poznane i zdefiniowane zaburzenia epigenetyczne, które mogłyby stanowić potencjalne biomarkery inwazyjnego wzrostu. Konieczne są zatem dalsze badania, a ich ważną składową są prace wchodzące w skład niniejszej rozprawy i cyklu publikacji Doktorantki.



#### IV. WNIOSKI KOŃCOWE

Jako recenzent rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Boresowicz stwierdzam, że Doktorantka potwierdziła umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych, prawidłowo gromadziła dane oraz prawidłowo dobrała i zastosowała metody statystyczne, które pozwoliły na uzyskanie oryginalnych wyników i sformułowania przejrzystych wniosków, które odpowiadają założonym celom. Szerokie, nowoczesne piśmiennictwo zostało prawidłowo wykorzystane i omówione zarówno w publikacjach wchodzących w skład cyklu jak też w rozdziale 11 dysertacji.

Przedstawiona do mojej oceny rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Boresowicz spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm) stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Boresowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na oryginalność i kompleksowość pracy i przeprowadzonych badań oraz opublikowanie ich w czasopismach z Listy Filadelfijskiej o łącznym współczynniku wpływu 14,7 (MEiN:420) przedstawiam Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku-

WARSZAWSKI  
UNIwersytet Medyczny  
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych,  
Endokrynologii i Diabetologii  
Wydział Lekarski  
ul. Kondratowicza 8, 03-242 Warszawa

KIEROWNIK  
Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych,  
Endokrynologii i Diabetologii

  
dr hab. n. med. Przemysław Wittek