



WARSZAWSKI  
UNIwersYTET  
MEDYCZNY

ZAKŁAD BIOLOGII I GENETYKI NOWOTWORÓW  
KATEDRA PATOMORFOLOGII

Warszawa 26.04.2024

Prof. dr. n. med. Tomasz Stokłosa  
Zakład Biologii i Genetyki Nowotworów  
Katedra Patomorfologii  
Warszawski Uniwersytet Medyczny  
*tomasz.stoklosa@wum.edu.pl*

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Sowińskiej pod tytułem:  
” Rola Regnazy-2 w przebiegu stanu zapalnego mózgu oraz patofizjologii glejaka  
wielopostaciowego”**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa mgr Weroniki Sowińskiej na stopień doktora nauk biologicznych dotyczy niezwykle ważnego i aktualnego problemu tj. badań nad patogenezą nowotworów człowieka na modelach nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN), w tym w szczególności glejaka wielopostaciowego i roli przewlekłego stanu zapalnego.

Podjęte badania wpisują się najnowsze trendy badań translacyjnych w onkologii polegające na poszukiwaniu „pięt achillesowych” w komórkach nowotworowych i potencjalnych celów dla terapii, a konkretnie w badania nad deregulacją różnych procesów w tym przewlekłego stanu zapalnego i ich roli w karcynogenezie. Przewlekły stan zapalny i związaną z nim dysfunkcją odpowiedzi immunologicznej uznaje się obecnie za jeden z dziesięciu fundamentalnych cech komórek nowotworowych (z ang. tzw. „hallmarks of cancer” wg D. Hanahana i R. Weinberga 2000/2011).

W swojej pracy Doktorantka skupiła się na rodzinie regulatorów stanu zapalnego, białkach z rodziny ZC3H12/MCPIP, które nazywane są regnazami i obejmują cztery typy (od 1 do 4). Wybrany model do badań, glejak wielopostaciowy (GBM) jest najczęstszym i najbardziej śmiertelnym pierwotnym nowotworem OUN u dorosłych. Glejaki stanowią ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Szybko rosnące glejaki mogą mieszać się ze zdrowymi komórkami mózgowymi, tworząc

rozsiarne guzy, które są trudne do usunięcia chirurgicznego, przez co operacja całkowicie radykalna zazwyczaj nie jest możliwa. Standardowa terapia polegająca na zastosowaniu frakcjonowanej radioterapii wspartej chemioterapią przy zastosowaniu temozolomidu jako leku radiouczulającego, a następnie w monoterapii daje ograniczone rezultaty, gdyż prawie zawsze dochodzi do nawrotu choroby. Obecnie nie ma dobrego standardowego leczenia choroby nawrotowej, a mediana całkowitego czasu przeżycia (OS) w przypadku nawrotowego GBM (rGBM) trwa krócej niż rok. Dlatego skuteczna terapia dla glejaka wielopostaciowego, a zwłaszcza jego postaci nawrotowej (rGBM), pozostaje jedną z największych niezaspokojonych potrzeb w onkologii i w całej medycynie, a bez dokładnego poznania patogenezy molekularnej może być to trudne do osiągnięcia w najbliższych latach.

**Z uwagi na powyższe uważam, że wybór tematu rozprawy jest nie tylko aktualny ale trafia w najnowsze trendy w badaniach nad patogenezą nowotworów OUN pochodzenia glejowego, tym bardziej iż dotyczy jednego z najbardziej agresywnych i złośliwych nowotworów, jakim jest glejak wielopostaciowy.**

Rozprawa jest prawidłowo przygotowana jeśli chodzi o szatę graficzną oraz wymagane elementy rozprawy doktorskiej, tworzonej przez spięcie opublikowanych prac oryginalnych. Rozprawa składa się z dwóch głównych części, pierwszej opisowej oraz drugiej, w której dołączone są kopie trzech prac oryginalnych, dodatkowe wyniki i odpowiednie oświadczenia. Pierwsza część liczy 70 stron, na co składają się streszczenia w języku polskim i angielskim, interesujące wprowadzenie w temat rozprawy, cele pracy z poszczególnymi zadaniami badawczymi określonymi w 6 punktach, dyskusja i podsumowanie najważniejszych wyników, jak również bibliografia składająca się ze 163 pozycji. Drugą część rozprawy stanowią trzy publikacje oryginalne oraz oświadczenia Doktorantki i współautorów odnoszące się do udziału w powstaniu prac.

Prace oryginalne, które stanowią zasadniczą część rozprawy to:

1. "Potential Limitations of the Sleeping Beauty transposon use in gene expression studies", *Acta Biochimica Polonica* 2019; 66 (3) 263-268;
2. The homeostatic function of Regnase-2 restricts neuroinflammation", *FASEB Journal* 2023; 37(3), e22798;

3. „Regnase-2 inhibits glioblastoma cell proliferation”, *Scientific Reports* 2024 (wg deklaracji Doktorantki przyjęta do druku i dostępna on-line co zostało sprawdzone)

We wszystkich trzech manuskryptach Doktorantka jest pierwszą autorką o wiodącym wkładzie (odpowiednio dla kolejnych prac 90%, 70% i 85%) co jest udokumentowane i potwierdzone oświadczeniami Doktorantki, Promotor oraz wszystkich współautorów poszczególnych prac.

W wyczerpującym tematykę **wprowadzeniu** Doktorantka w ciekawy sposób przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący patogenezy stanu zapalnego w OUN, roli komórek gleju, białek z rodziny regnaz oraz współczesnej terapii nowotworów mózgu, zwłaszcza pierwotnych, takich jak glejaki.

Moje krytyczne uwagi odnoszą się do błędów strony językowej rozprawy, których nie mogę nie zauważyć ze względu na moje skrzywienie zawodowe (wieloletniego redaktora i współautora podręcznika ‘Immunologia’ Gołąb J, Lasek W., Nowis, D, Stokłosa T, PWN 2023). Przykładowo, o ile układ immunologiczny (a nie układ odpornościowy, jak prawidłowo powinno się go określać) jest często stosowanym terminem i to jestem skłonny zaakceptować, to na pewno nie ma „*komórek immunologicznych*” (str. 14), podobnie jak nie ma „*komórek kardiologicznych*” czy „*komórek neurologicznych*”. Należy mówić o komórkach układu odpornościowego, ewentualnie o komórkach immunologicznie kompetentnych, co jest już pewną kalką językową o czym poniżej.

W niektórych sformułowaniach stosowany jest żargon, czy tzw. kalki językowe, jak np. „*chroniczny stan zapalny*” (a nie przewlekły) czy „*metastaza*” w znaczeniu tworzeniu przerzutów (a nie pojedynczego przerzutu co jest prawidłowym tłumaczeniem tego określenia). Można to częściowo usprawiedliwić mniejszym doświadczeniem Doktorantki w zakresie onkologii, onkogenetyki i stosowanych w tych dziedzinach nomenklatury.

Inna krytyczna uwaga odnosząca się do strony językowej rozprawy, którą chciałbym podnieść, dotyczy nazewnictwa genów. Zgodnie z wytycznymi towarzystw naukowych, ludzkie geny powinny być pisane wielką czcionką i kursywą, geny zwierzęce (w tym mysie) małą czcionką i kursywą analogicznie nazwy ludzkich i mysich białek wielką/małą czcionką. W większości przypadków Doktorantka stosuje prawidłowo tę regułę, ale ponieważ w pracy często występują naprzemiennie geny

ludzkie i mysie to pojawiają się pomyłki czy może raczej nieścisłości np. we wstępie na stronie 18, gdzie mowa jest o białkach człowieka, wkrada się niekonsekwencja w nazewnictwie (VEGF, /MMP-9, IL-6 ale w tym samym ciągu wymienione są Arg-1, Chil3, ludzkie? mysie?).

Są to jednak mniejszej wagi uwagi natury językowej, które nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

**Celem** pracy było zbadanie funkcji biologicznej regnazy 2 oraz zbadanie regulacji jej poziomu w przebiegu stanu zapalnego mózgu i w patogenezie glejaka wielopostaciowego. Doktorantka określa podstawowy cel pracy jako *przybliżenie funkcji biologicznej* co uważam, za zbyt ogólne i nieprecyzyjne określenie, można to oczywiście bronić tym, że trudno zakładać pełne poznanie roli takiego czynnika w każdej pracy. Istotne, że wymienione jest poniżej sześć punktów, które doprecyzowują tak sformułowany cel pracy doktorskiej. Mam jednak co do tych sześciu punktów (od 'a' do 'f') także parę uwag. W punkcie 'b' celem jest „sekwencjonowanie RNA”. O ile jest to nowoczesna technika molekularna, której zastosowanie jest jak najbardziej uzasadnione dla zbadania roli regnazy 2, to samo w sobie sekwencjonowanie nie powinno być celem rozprawy doktorskiej, dlatego tak sformułowany cel uważam za niefortunny. Natomiast dwa ostatnie punkty ('e' i 'f') są wydzielone jako osobne w sposób nieco sztuczny gdyż dotyczą de facto badania tego samego zagadnienia czyli wpływu Reg-2 na poziom wybranych transkryptów oraz na proliferację i cykl komórkowy komórek glejaka. Dlatego w mojej opinii należałoby potraktować te punkty łącznie jako zbadanie wpływu regnazy 2 na ekspresję wybranych genów i markerów stanu zapalnego.

**Wyniki** przedstawione w trzech manuskryptach oraz dołączone do rozprawy dodatkowe materiały uzupełniające pracę w *FASEB J* stanowią niezbity dowód na ogromny nakład pracy włożony przez Doktorantkę w same badania i w całą rozprawę. Nie mam żadnych wątpliwości, że przejście przez proces oceny recenzji w uznanych czasopismach jest gwarantem, iż opublikowane wyniki są rzetelnie przedstawione, odpowiednio przeniealizowane również pod kątem statystycznym i uzasadnione. Wyniki te znacząco poszerzają naszą wiedzę o roli regnaz, w tym zwłaszcza regnazy 2 w patogenezie i rozwoju nowotworów pochodzenia glejowego i związanymi z tym zaburzeniami w indukcji stanu zapalnego i funkcjonowaniu układu odpornościowego na poziomie OUN. Bardzo interesujące jest odkrycie znamiennej różnej roli regnazy 2 w

porównaniu do regnazy 1 w kontekście wpływu na procesy istotne w rozwoju glejaka, takie jak cykl komórkowy czy apoptoza.

Wyniki przedstawione w załączonych manuskryptach są szczegółowo omówione w części opisowej rozprawy w **dyskusji**. Doktorantka szczegółowo objaśnia i odnosi się do opublikowanych wyników, konfrontuje też te wyniki z danymi literaturowymi i wykazuje się właściwą znajomością dotychczas opublikowanych danych w zestawieniu z własnymi odkryciami.

Jestem pod dużym wrażeniem dojrzałości naukowej Doktorantki, która jest w pełni świadoma ograniczeń metod zastosowanych w badaniach i potrafiła odpowiednio przewidzieć oraz zaplanować odpowiednie eksperymenty kontrolne. Znakomitym przykładem jest tutaj np. edycja genomu, która może doprowadzić do wygenerowania licznych artefaktów. Doktorantka w celu sprawdzenia wygenerowanych modyfikacji zaplanowała odpowiednie eksperymenty badając znane substraty dla regnazy 2 co przy ograniczonej wiedzy na temat tego białka nie było sprawą oczywistą. Udało się także obejść problem polegający na braku dostępnych komercyjnie przeciwciał rozpoznających regnazę 2.

Pewien niedosyt pozostawia tylko skoncentrowanie się na IL-1 $\beta$ , IL-6 oraz lipokaliny 2 jako najważniejszych markerach stanu zapalnego w OUN regulujących ekspresję regnaz. Brakuje mi informacji, czy i ewentualnie jaką rolę pełniły inne cytokiny takie jak TNF- $\alpha$  (czynnik martwicy nowotworu), czy chemokiny, o których sama Doktorantka wspomina we wprowadzeniu jako o istotnych komponentach odpowiedzi przeciwzapalnej w OUN.

Na podstawie uzyskanych wyników zostały wyciągnięte liczne wnioski ujęte w **podsumowaniu**. Mam tutaj uwagę natury formalnej, podsumowanie powinno zawierać odpowiedź na postawione cele pracy sformułowane w postaci konkretnych wniosków odpowiadających postawionym celom. Tymczasem Doktorantka formułuje aż 15 punktów precyzyjnie określając, w jakiej publikacji i która rycina im odpowiada włącznie z jej autorstwem. Taka dokładność i transparentność jest oczywiście godna pochwały, rozumiem, też, że opublikowane wyniki znacząco przerosły początkowe założenia, ale trudno jest prawidłowo ocenić recenzentowi, które punkty odpowiadają na zadane w celach pytania, a które są dodatkową wiedzą zdobytą dzięki szeroko zakrojonym badaniom.

Mam nadzieję, iż w trakcie publicznej obrony Doktorantka będzie miała możliwość przedyskutowania i uporządkowania konkretnych odkryć wymienionych w podsumowaniu w stosunku do wcześniej postawionych celów jak również pokazania co jest wartością dodaną w pracy, czyli które z wymienionych odkrytych mechanizmów były nieoczekiwane i niejako przerosły początkowe założenia pracy. Jest to cecha każdego dobrze zrealizowanego projektu naukowego, iż przynosi on często więcej pytań niż odpowiedzi, ale powinno to być w rozprawie wyraźnie oddzielone.

**Biorąc pod uwagę nowatorski charakter pracy oraz tworzące go publikacje w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, w których Doktorantka, ma wiodący udział, stwierdzam w podsumowaniu, iż praca doktorska mgr Weroniki Sowińskiej jest niezwykle cenna w znaczeniu badania patogenezy jednego z najbardziej złośliwych i nieuleczalnych nowotworów człowieka jakim jest glejak wielopostaciowy.** Przeprowadzone badania mają dużą wartość poznawczą ale także potencjał translacyjny a uzyskane wyniki stanowią oryginalny dorobek naukowy Doktorantki. Przedstawione przez mnie uwagi krytyczne nie wpływają znacząco na moją pozytywną ocenę rozprawy i mam nadzieję, że zostaną skutecznie przedyskutowane podczas publicznej obrony.

Dlatego uważam, iż przedstawiona rozprawa spełnia warunki określone w artykułe 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami) w związku z czym chciałbym przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wnioski o dopuszczenie Pani mgr Weroniki Sowińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne oraz pragnę **wnioskować o wyróżnienie.**



Tomasz Stokłosa  
**KIEROWNIK**  
**Zakład Biologii i Genetyki Nowotworów**

**prof. dr med. Tomasz Stokłosa**