

9. Streszczenie rozprawy doktorskiej

Pracę doktorską stanowi zbiór 6 artykułów opublikowanych w czasopiśmie posiadających wskaźnik IF. Jestem autorem i współautorem tych artykułów, które powstały dzięki moim staraniom i inicjatywie w oparciu o uchwałę Komisji Bioetycznej OIL, która pozytywnie zaopiniowała projekt badania pt.: "Ocena przydatności mikroRNA jako biomarkera w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego". Jednocześnie zostałem wyznaczony na koordynatora tych badań.

Rak gruczołu krokowego jest schorzeniem, którego znaczenie, ze względu na wzrastającą wykrywalność, a także na wydłużenie życia mężczyzn ogromnie wzrosło.

Aktualne metody diagnostyczne nie są precyzyjne zarówno w zakresie samego rozpoznania nowotworu, jak i określenia jego charakterystyk tj stopnia złośliwości i stopnia zaawansowania. Ma to zasadniczy wpływ na dalsze postępowanie z pacjentem, zwłaszcza dotyczącym sposobów leczenia.

Dlatego istnieje pilna potrzeba opracowania nowych, nieinwazyjnych markerów nowotworowych umożliwiających wczesne wykrycie agresywnych nowotworów.

Głównym osiągnięciem pracy jest wykazanie, że zastosowanie różnych biomarkerów diagnostycznych, takich jak:

- multiparametrycznego rezonansu magnetycznego (radiological biomarkers),
- test genetyczny SelectMDx (genetic biomarkers),
- cząstki mikroRNA (molecular biomarkers),

umożliwia uzyskanie większej skuteczności procesu diagnostycznego polegającego na kwalifikowaniu chorych do biopsji gruczołu krokowego.

Celem pracy nr 1 [1 - pkt. 2, 11] była analiza krążących mikroRNA w surowicy jako nieinwazyjnych biomarkerów u pacjentów z rozpoznany rakiem gruczołu krokowego w porównaniu u osób zdrowych. To wstępne badanie objęło populację 62 pacjentów w średnim wieku 68,6 lat i średnim PSA

21,3 ng / ml. Jako kontrolę wykorzystano ośmiu zdrowych mężczyzn. miRNA oznaczono ilościowo w całkowitej frakcji RNA wyekstrahowanej z surowicy, określając poziomy pięciu mikroRNA (miR-106b, miR-141, miR-21, mir-34a i miR-375) ilościowo za pomocą RT-qPCR. Dobór rodzajów miRNA dokonano na podstawie danych z analizy literatury. W analizach oceniano korelację między danymi kliniczno-patologicznymi a poziomami ekspresji miRNA. Względne współczynniki ekspresji miR-106b, miR-141-3p, miR-21 i miR-375 były istotnie zwiększone (odpowiednio 1,8- 1,9-, 2,4 i 2,6-krotnie) w grupie z rozpoznaniem rakiem gruczołu krokowego w porównaniu ze zdrowymi osobami. Najwyższy obszar pod krzywą ROC równy 0,906 uzyskano dla miR-357, co wskazuje na bardzo dobre właściwości diagnostyczne tego biomarkera. Znalezione poziomy ekspresji mir-34a niezwiązany z rakiem. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze literaturowe dane dotyczące możliwości odróżnienia pacjentów z rakiem gruczołu krokowego od osób zdrowych przez oznaczanie odpowiednich miRNA (miR-141-3p, miR-21 i miR-375).

W pracy nr 2 czterdziestu pacjentów poddano analizie wykorzystując ich dane: antygen swoisty dla prostaty, wyniki badania mpMRI i skalę Gleasona (na podstawie biopsji stercza), u ośmiu pacjentów (20%) zdiagnozowano raka. Badanie mpMRI wykonywano już na samym początku ścieżki diagnostycznej, aby ocenić podjęcie decyzji o ewentualnej konieczności wykonania biopsji gruczołu krokowego.

Współczynnik Spearmana został wykorzystany do oceny zależności między badanymi cechami. Oceniono wydajność diagnostyczną jako pomiar obszaru pod krzywą (AUC) analizy charakterystyki krzywych ROC. W całej badanej grupie 55% chorych zostało poddanych biopsji pierwotnej, a u 45% pacjentów wykonano powtórny biopsję gruczołu krokowego, u których istniało podejrzenie raka stercza. Czterdzieści podejrzanych zmian na obrazach MRI zidentyfikowano za pomocą PI-RADS 1 - 5%, PI-RADS 2 - 17.5%, PI-RADS 3 - 32.5%, PI-RADS 4 - 27.5% i PI-RADS 5 - 17.5%. Najwyższą korelację

zaobserwowano dla wyników mpMRI i wyniku Gleasona ze współczynnikiem Spearmana równym 0,41 (95% CI: 0,104-0,646). Analiza ROC wykazała, że mpMRI rozróżnia kierowanie pacjentów do biopsji prostaty lub aktywnego nadzoru z AUC = 0,771 (0,117, 95% CI: 0,542-1,001).

Tematem pracy nr 3 był wpływ zastosowania testu genetycznego SelectMDX na proces diagnostyczny raka gruczołu krokowego. Test ten jest oparty na izolacji biomarkera mRNA w moczu. Obecność poziomów mRNA genów HOXC6 i DLX1 ocenia się w celu oszacowania ryzyka zarówno obecności raka gruczołu krokowego podczas biopsji, jak i obecności raka wysokiego ryzyka (Gleason score ≥ 7). Wykonane biopsje gruczołu krokowego u pacjentów z dodatnim wynikiem testu SelectMDx potwierdziły rozpoznanie raka gruczołu krokowego oraz wartość Gleason score ≥ 7 . Pacjenci ci zostali objęci leczeniem radykalnym. Pacjenci z ujemnym wynikiem testu (low risk) uniknęli wykonania natychmiastowej biopsji gruczołu krokowego i są poddani dalszej rutynowej obserwacji i nadzorowi.

Celem pracy nr 4 była ocena możliwości wykorzystania cząstek miRNA do stratyfikacji pacjentów z rakiem gruczołu krokowego i łagodnym jego rozrostem (BPH). Dziewięć cząstek miRNA (-21, -27b, -93, -141, -205, -221, -182, -375 i let-7a) o największej zgłaszanej mocy różnicowania na podstawie piśmiennictwa, zastosowano w badaniach porównawczych próbek surowicy i tkanki gruczołu krokowego. Zastosowano korelację Spearmana i analizę krzywych ROC, aby ocenić zdolność miRNA obecnych w surowicy do rozróżnienia pacjentów z PCa i BPH. Niniejsze badanie jasno pokazuje, że miR-93 i miR-375 mogą być brane pod uwagę jako pojedyncze nieinwazyjne cząsteczki krwi w celu odróżnienia pacjentów z PCa od pacjentów z BPH. Wskazujemy, że te dwa miRNA mają sześć wspólnych, powiązanych z PCa, genów docelowych (CCND2, MAP3K2, MXI1, PAFAH1B1, YOD1, ZFYVE26), które mają wspólną funkcję molekularną wiązania białek (termin GO: 0005515). Opisano również wysoką wartość diagnostyczną nowego miR-

182 pochodzącego z surowicy (AUC = 0,881, 95% przedział ufności, CI = 0,816–0,946, $p < 0,0001$, czułość i swoistość odpowiednio 85% i 79%).

Praca nr 5 jest pracą przeglądową, w której opisano obecnie rekomendowane metody diagnostyki raka gruczołu krokowego, a także innych testów i biomarkerów mających zastosowanie do badań przesiewowych. W tym celu dokonano analizy publikacji naukowych, przeglądu wytycznych Towarzystw Naukowych, a także ocen ekspertów. W pracy tej omówione są najnowsze metody zalecane w diagnostyce PCa takie jak: PSA (antygen swoisty dla prostaty), test PHI, 4Kscore oraz nowe technologie diagnostyczne m.in. testy Progens, SelectMDx, OncotypeDx oraz ExoDx Prostate IntelliScore.

Praca nr 6 stanowi podsumowanie aktualnej wiedzy dotyczącej roli cząstek miRNA w diagnostyce raka gruczołu krokowego. miRNA stanowią klasę małych o długości około 22 nukleotydów, niekodujących cząsteczek RNA, które biorą udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji licznych genów. W niniejszym przeglądzie opisano znaczenie miRNA w szlaku sygnałowym receptora androgenowego (AR signaling), w cyklu komórkowym, w procesie przejścia nabłonkowo - mezenchymalnego (EMT), w transformacji rakowych komórek macierzystych (CSC), a także rolę miRNA jako narzędzia terapeutycznego PCa. Najbardziej obiecującą grupą są markery molekularne, wśród których dużą nadzieję wiąże się z wykorzystaniem pozakomórkowych cząstek mikroRNA. Znalezienie lepszych biomarkerów PCa, na bazie miRNA, zastępujących obecny pomiar PSA, jest bardzo potrzebne w nowoczesnej praktyce onkologicznej.

Wnioski wynikające z realizacji rozprawy doktorskiej

W przeprowadzonych badaniach najwyższą korelację zaobserwowano dla wyników mpMRI i wyniku Gleasona ze współczynnikiem Spearmana równym 0,41 (95% CI: 0,104-0,646). Analiza ROC wykazała, że mpMRI rozróżnia kierowanie pacjentów do biopsji gruczołu krokowego lub aktywnego nadzoru z AUC = 0,771 (0,117, 95% CI: 0,542-1,001). W ogólnym ujęciu

przeprowadzone badania potwierdzają dane literaturowe o korzystnym wprowadzeniu mpMRI przed biopsją do współczesnej ścieżki diagnostycznej PCa. Ponadto poprawia się wydajność biopsji przezodbytniczej poprzez zwiększenie wykrywalności raka gruczołu krokowego w trakcie biopsji celowanej danymi z mpMRI. Zastosowanie mpMRI pozwoliło również uniknąć biopsji wśród pacjentów bez csPCa. Uzyskane wyniki i wnioski są podobne jak prezentowane w międzynarodowym badaniu PRECISION, które udowodniło wyraźną korzyść z wykonania mpMRI już na samym początku ścieżki diagnostycznej u pacjentów z podejrzeniem raka gruczołu krokowego.

Wykonane biopsje stercza u pacjentów z dodatnim wynikiem testu SelectMDx potwierdziły rozpoznanie raka gruczołu krokowego z wynikiem Gleason score ≥ 7 . Pacjenci ci zostali objęci leczeniem radykalnym. Z kolei, pacjenci z ujemnym wynikiem testu (low risk) uniknęli wykonania natychmiastowej biopsji stercza i są poddani dalszej rutynowej obserwacji i nadzorowi.

Z kolei w analizach nad molekułami miRNA oceniano korelację między danymi kliniczno-patologicznymi a poziomami ekspresji wybranych miRNA. Względne współczynniki ekspresji miR-106b, miR-141-3p, miR-21 i miR-375 były istotnie zwiększone (odpowiednio 1,8-, 1,9-, 2,4 i 2,6-krotnie) w grupie z PCa w porównaniu ze zdrowymi, kontrolnymi osobami. Najwyższy obszar pod krzywą ROC równy 0,906 uzyskano dla miR-375 co wskazuje na bardzo dobre właściwości diagnostyczne tego biomarkera. Wyniki prac potwierdzają wcześniejsze ustalenia dotyczące możliwości odróżnienia pacjentów z rakiem gruczołu krokowego od osób zdrowych przez oznaczanie odpowiednich miRNA (miR-141-3p, miR-21 i miR-375).

W podsumowaniu należy stwierdzić, że z uwagi na heterogeniczny charakter raka gruczołu krokowego, jeden test diagnostyczny nie odpowie na wszystkie pytania i dlatego zastosowanie wielu metod diagnostycznych pozwoli na lepsze – spersonalizowane doradztwo kliniczne dla pacjenta.