

Łódź, dn. 19.04.2021 roku

Katedra Nefrologii i Nadciśnienia Tętniczego
Klinika Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego
i Medycyny Rodzinnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek. Pawła Porzyckiego

***„Ocena przydatności nowych biomarkerów,
a w szczególności cząstek mikroRNA, w diagnostyce
i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego”***

Rak gruczołu krokowego jest najczęstszym nowotworem złośliwym u mężczyzn, oraz drugim, po raku płuca, pod względem ilości zgonów. W 2017 roku zdiagnozowano w Polsce ponad 16000 nowych zachorowań na raka prostaty oraz odnotowano ponad 5000 zgonów. Przeprowadzone badania przesiewowe przeprowadzone w Europie, w ciągu 13 lat obserwacji, doprowadziły do znacznego zmniejszenia śmiertelności z powodu raka prostaty o 21%.

Prawdopodobieństwo zachorowania na raka prostaty rośnie wraz z wiekiem. Rzadko rozpoznawany jest poniżej 40 r.ż. szczyt zachorowania występuje około 65-70 r.ż., osiągając ponad 60% ryzyko wystąpienia u osób powyżej 80 r.ż. Do czynników ryzyka także spożywanie produktów bogatobiałkowych. Otyłość jest następnym czynnikiem ryzyka a z kolei zwiększona aktywność fizyczna jest czynnikiem ograniczającym to ryzyko. Spożycie produktów zawierających karotenoidy zmniejsza ryzyko zachorowania na raka prostaty. Do czynników ryzyka należy także obciążenie genetyczne. Zachorowanie na raka prostaty u członka rodziny w pierwszej linii pokrewieństwa zwiększa ryzyko 2-3 krotnie. Im większa ilość przypadków zachorowania na raka prostaty w rodzinie, tym większe ryzyko, dochodzące nawet do 10-krotności ryzyka zachorowania w stosunku do populacji osób nieobciążonych dziedzicznie.

Jednym z badań pozwalających na wczesne wykrycie raka prostaty jest badanie poziomu antygenu specyficznego dla prostaty antygenu PSA. U 10% osób z poziomem PSA w granicach normy może dojść do zachorowania na raka prostaty. Z drugiej strony nawet u 25% mężczyzn z podwyższonym poziomem PSA nie ma raka prostaty. Badanie PSA powinni wykonywać mężczyźni po 50 r.ż. lub młodszy, w rodzinach których dochodziło do zachorowań na ten nowotwór. Badaniem bardziej specyficznym jest oznaczanie t.zw. „wolnego” PSA (fPSA). Jest to frakcja całkowitej ilości PSA, wynosząca około 5% - 40%, niezwiązana z enzymami proteolitycznymi. Stosunek fPSA do PSA całkowitego powinien wynosić więcej niż 25%. Jeśli jest mniejszy niż 10% uważa się, że ryzyko raka prostaty jest zwiększone. Jeszcze innym badaniem jest ocena gęstości PSA (stosunek stężenia PSA do objętości prostaty, ocenianej badaniem ultrasonograficznym (USG)).

Biomarkerem w diagnostyce raka gruczołu krokowego może być miRNA. Jest to miRNA mała cząsteczka RNA, która działa w wyciszaniu mRNA i regulacji transkrypcyjnej ekspresji genów. miRNA odgrywają kluczową rolę w patogenezie PCa poprzez regulację ekspresji genów zaangażowanych w główne etapy rakotwórczości. Badania wykazały, że większość ludzkich miRNA znajduje się w obszarach genomu, zwanych kruchymi miejscami, które są związane z rakiem. Ekspresja miRNA koreluje z różnymi nowotworami i uważa się, że geny te działają zarówno jako supresory nowotworów, jak i onkogeny. Wskazuje to, że miRNA mogą odgrywać kluczową rolę w rozwoju i progresji choroby nowotworowej.

Poddano analizie profile ekspresji miRNA i zaproponowano cząsteczki miRNA jako możliwe biomarkery dla wielu chorób, w tym raka gruczołu krokowego, stanowiąc spersonalizowaną strategię terapeutyczną u pacjentów z PCa. miRNA są małymi (długości 18-22 nukleotydów) endogennymi jednoniciowymi niekodującymi RNA. Cząsteczki te regulują ekspresję ponad 60% ludzkich genów. Negatywnie regulują swoje cele głównie odpowiednie mRNA na jeden z dwóch sposobów, w zależności od stopnia komplementowości miRNA i celu. Mechanizm regulacji w dół opiera się na niecałkowitym komplementarnym wiązaniu z docelowymi regionami nie ulegającymi translacji 3' mRNA 3' (3'UTR). W ten sposób miRNA represjonują, swój cel - ekspresję genu po transkrypcji na poziomie translacji. Po drugie, miRNA, które wiąże się z doskonałą lub prawie całkowitą komplementarnością z sekwencjami mRNA kodującymi białko, indukują rozszczepianie i degradację docelowych mRNA. Ponieważ regulują one ekspresję określonych genów docelowych, w tym genów supresorowych nowotworów i onkogenów, ich nieprawidłowa ilość i funkcja bierze udział w zmianie szeregu procesów molekularnych w tkankach, prowadząc do złożoności i heterogeniczności nowotworów.

Badania izolacji i charakterystyki miRNA opierają się na próbkach tkanek lub płynach ustrojowych, ponieważ miRNA są wyjątkowo stabilne w surowicy, osoczu i moczu, co czyni je szczególnie atrakcyjnymi w przypadku testów nieinwazyjnych. W płynach ustrojowych miRNA są chronione przed degradacją enzymatyczną poprzez ich połączenie z białkiem Argonaute2 i lipoproteinii, o wysokiej gęstości (HDL); ale także poprzez ich włączenie do pęcherzyków pozakomórkowych (EV - extravesicle) miRNA odgrywają kluczową rolę w patogenezie PCa poprzez regulację ekspresji genów biorących

udział w szlaku sygnałowym receptora androgenowego (AR - androgen receptor), cyklu komórkowym, apoptozie, procesie *EMT* (epithelial-mesenchymal transision), w kontroli macierzystości w CSCs (cancer stem cells) i wreszcie w powstawaniu przerzutów odległych. miRNA są atrakcyjnymi celami w badaniach przesiewowych, diagnozowaniu, prognozowaniu, monitorowaniu rozwoju nowotworu i pomaganiu w identyfikacji właściwego leczenia pacjentów.

Ciągle poszukiwane są, nieinwazyjne biomarkery (markery molekularne i genetyczne) do diagnostyki i prognozowania raka gruczołu krokowego. Dokonuje się również próby przystosowania już znanych narzędzi diagnostycznych takich jak badanie MRI (utworzenie nowego protokołu badania PIRADS v.2.0 lub już istniejąca jego aktualizacja v.2.1).

Kolejną próbą dokładniejszej diagnostyki jest tworzenie kalkulatorów ryzyka (risk calculators), które oceniają prawdopodobieństwo wysepnięcia raka gruczołu krokowego przy zastosowaniu naraz kilku, zazwyczaj różnych danych klinicznych (stężenie PSA, GS z biopsji rdzeniowej, odsetek raka w rdzeniach, liczba zajętych rdzeni przez raka itp.).

Przedstawiona do recenzji rozprawa złożona jest z:

- Tytuł rozprawy doktorskiej
- Autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa
- Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania
- Rak gruczołu krokowego
 - ✓ Epidemiologia
 - ✓ Klasyfikacja raka gruczołu krokowego
 - ✓ Klasyfikacja histopatologiczna raka gruczołu krokowego
 - ✓ Określenie stopnia złośliwości raka gruczołu krokowego
 - ✓ Rak istotny klinicznie / nieistotny klinicznie
 - ✓ Rozpoznawanie raka gruczołu krokowego - stan obecny
- Omówienie publikacji wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej

- Przebieg pracy naukowej
- Wykaz publikacji nie wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej
- Podsumowanie dorobku naukowego
- Streszczenie rozprawy doktorskiej
- Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim
- Wykaz publikacji z zakresu rozprawy doktorskiej:
 - ✓ Porzycki P., Ciszkowicz E., Semik M., Tyrka M. Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. *International Urology and Nephrology*. 2018; 50: 1619-1626.
 - ✓ Porzycki P., Ciszkowicz E. Detection of individual prostate cancer via multiparametric magnetic resonance imaging in own material - initial experience. *Journal of Contemporary Brachytherapy*. 2019,11,6:1-6.
 - ✓ Porzycki P., Ciszkowicz E. Initial experience with SelectMDx test in patients considered for prostate biopsy (abstract). *European Urology Supplements*. 2019; 18(2): e2316.
 - ✓ Ciszkowicz E., Porzycki P., Semik M., Kaznowska E., Tyrka M. MiR-93/miR-375: diagnostic potential, aggressiveness correlation and common target genes in prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(16): 5667.
 - ✓ Porzycki P., Ciszkowicz E. Modern biomarkers in prostate cancer diagnosis. *Central European Journal of Urology*, 2020; 73: 1-7
 - ✓ Porzycki P. Potencjalne kliniczne zastosowanie cząsteczek miRNA w diagnostyce raka prostaty. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*.
- Oświadczenia współautorów

Szczegółowa analiza prac stanowiących rozprawę doktorską:

Porzycki P., Ciszkowicz E., Semik M., Tyrka M.

Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition.

International Urology and Nephrology. 2018; 50: 1619-1626.

Analizowano krążące mikroRNA w surowicy jako biomarkery u pacjentów z rozpoznaniem rakiem gruczołu krokowego w porównaniu u osób zdrowych. Badanie objęło 62 pacjentów w średnim wieku 68,6 lat i średnim PSA 21,3 ng / ml. Kontrola to 8 zdrowych pacjentów. miRNA oznaczono ilościowo w całkowitej frakcji RNA wyekstrahowanej z surowicy i oznaczano poziomy pięciu mikroRNA (miR-106b, miR-141, miR-21, mir-34a i miR-375) ilościowo za pomocą RT-qPCR. Doboru miRNA dokonano na podstawie danych z analizy literatury. 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 do grupy kontrolnej. Najwyższy obszar pod krzywą ROC równy 0,906 uzyskano dla miR-357. Wskazuje to na duże właściwości diagnostyczne biomarkera. Znalezione poziomy ekspresji mir-34a niezwiązany z rakiem.

Porzycki P., Ciszkowicz E.

Detection of individual prostate cancer via multiparametric magnetic resonance imaging in own material - initial experience.

Journal of Contemporary Brachytherapy. 2019,11,6:1-6.

Czterdziestu pacjentów poddano analizie wykorzystując: antygen swoisty dla prostaty, wyniki badania mpMRI i skalę Gleasona, u ośmiu pacjentów (20%) zdiagnozowano raka. Badanie mpMRI wykonywano, aby ułatwić podjęcie decyzji o ewentualnej konieczności wykonania biopsji gruczołu krokowego.

Doktorant analizował wydajność diagnostyczną jako pomiar obszaru pod krzywą (AUC - area under curve) analizy charakterystyki krzywych ROC. Dokładność diagnostyczną, czułość i swoistość określono przy użyciu najlepszego punktu odcięcia na każdej krzywej ROC. Badanej grupie 55% chorych zostało poddanych biopsji pierwotnej, a u 45% pacjentów wykonano powtórna biopsję gruczołu krokowego, u których istniało podejrzenie nowotworu. 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 (Receiver Operating Characteristic) 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).

Porzycki P., Ciszkowicz E.

Initial experience with SelectMDx test in patients considered for prostate biopsy (abstract). European Urology Supplements. 2019; 18(2): e2316.

W pracy doktorant badał wpływ zastosowania testu SelectMDx na proces diagnostyczny raka gruczołu krokowego. Test ten jest oparty na izolacji biomarkera mRNA z 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. Wykonane biopsje gruczołu krokowego u pacjentów z dodatnim wynikiem testu SelectMDx potwierdziły rozpoznanie raka gruczołu krokowego oraz wartość Gleason score 2:7. 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.

Ciszkowicz E., Porzycki P., Semik M., Kaznowska E., Tyrka M.

MiR- 93/miR-375: diagnostic potential, aggressiveness correlation and common target genes in prostate cancer.

International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21(16): 5667

Doktorant oceniał możliwości wykorzystania cząstek miRNA stratyfikacji pacjentów z rakiem gruczołu krokowego i łagodnym+ jego, rozrostem (BPH). Dziewięć miRNA (-21, -27b, -93, -141, -205, -221, - 182, -375 i let-7a) o największej zgłaszanej mocy różnicowania na podstawie piśmiennictwa, doktorant zastosował w badaniach porównawczych próbek surowicy i tkanki prostaty. 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. Dwa miRNA mają sześć wspólnych, powiązanych z PCa, genów docelowych (CCND2, MAP3K2, MXII, PAFAH1B1, YOD1, ZFYVE26), które mają wspólną funkcję molekularną wiązania białek (termin GO: 0005515), oraz Opisano 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%).

Porzycki P., Ciszkowicz E.

Modern biomarkers in prostate cancer diagnosis.

Central European Journal of Urology, 2020; 73: 1-7

Jest to praca przeglądowa w której doktorant przedstawił aktualnie rekomendowane metody diagnostyki raka gruczołu krokowego, testów i biomarkerów mających zastosowanie do badań przesiewowych. Dokonano analizy publikacji naukowych, przeglądu wytycznych, a także ocen ekspertów. W pracy tej omówił najnowsze metody zalecane w diagnostyce PCa takie jak: PSA (antygen swoisty dla prostaty), test PHI, 4Kscore oraz nowe technologie diagnostyczne m.in. testy Progenesa, SelectMDx, OncotypeDx oraz ExoDx Prostate

IntelliScore.

Porzycki P.

Potencjalne kliniczne zastosowanie cząsteczek miRNA w diagnostyce raka prostaty. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.

W pracy stanowi podsumowano aktualną wiedzę dotyczącą 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. Opisano znaczenie miRNA w szlaku sygnałowym receptora androgenowego, w cyklu komórkowym, w procesie przejścia nabłonkowo - mezenchymalnego (EMT), w transformacji rakowych komórek macierzystych (CSC), a także rolę: miRNA jako narzędzia terapeutycznego PCa.

Na podstawie przeprowadzonych badań i stosownych publikacji doktorant przedstawia następujące wnioski:

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). Przeprowadzone badania potwierdzają dane literaturowe o korzystnym wprowadzeniu mpMRI przed biopsją diagnostyki 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.

Wykonane biopsje stercza u pacjentów z dodatnim wynikiem testu SelectMDx potwierdziły rozpoznanie raka gruczołu krokowego z wynikiem Gleason score ≥ 7 . Pacjenci zostali objęci leczeniem radykalnym. Z kolei, pacjenci z ujemnym wynikiem testu



(low risk) uniknęli wykonania natychmiastowej biopsji stercza i są poddani dalszej rutynowej obserwacji.

Z kolei w analizach nad molekulami miRNA doktorant ocenił 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).

Rozprawa przygotowana według odpowiednio dobranych celów, przejrzysta. Cele pracy zostały osiągnięte i opublikowane w czasopiśmie ze znaczącym IF. Zatem podlegały analizie i ocenie merytorycznym recenzentów.

Podsumowując podkreślam walory poznawcze, nowoczesność, oryginalność przeprowadzonych badań, co potwierdzają dobre publikacje.

Rozprawa doktorska lek. Pawła Porzyckiego spełnia ustawowe wymogi uzyskania stopnia naukowego doktora nauk medycznych. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Uniwersytetu Rzeszowskiego Kolegium Nauk Medycznych o dopuszczenie lek. Pawła Porzyckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK KLINIKI
Nefrologii, Nadietologii i Diabetologii
Kliniki Nefrologii, Nadietologii i Diabetologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
prof. dr hab. n. med. Jacek Rysz