

Kraków, 14.02.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Kojs

Oddział Ginekologii i Położnictwa

z Ginekologią Onkologiczną

Szpital Specjalistyczny im. L. Rydygiera w Krakowie

os. Złotej Jesieni 1, 31-826 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza Piotra Januszyka, pt. „Profil ekspresji genów i kodowanych przez nie białek związanych ze zjawiskiem utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie w raku endometrium”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lekarza Piotra Januszyka została przygotowana na podstawie monotematycznego cyklu 3 publikacji wyodrębnionych z jego dorobku naukowego. Wszystkie prace mają charakter artykułów oryginalnych, opublikowanych w cenionych, zagranicznych czasopismach posiadających współczynnik wpływu Impact Factor w latach 2019-2021. Należy zaznaczyć, że wszystkie załączone prace zostały opublikowane w czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej, a co za tym idzie zostały już wcześniej rzetelnie i pozytywnie zrecenzowane. Ujęte w rozprawie doktorskiej prace mają sumaryczny współczynnik wpływu IF 7,598 i 270 punktów MNiSW.

Wszyscy współautorzy publikacji wyrazili zgodę na przedłożenie tych prac przez lekarza Piotra Januszyka jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. Doktorant w 1 artykule jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, w kolejnym drugim autorem, a w trzeciej pracy z cyklu kolejnym.

Niniejsza rozprawa doktorska składa się ze spisu treści, wykazu skrótów, wykazu publikacji ją stanowiących, wykazu tabel, wstępu, materiału i metod, wyników, dyskusji, wniosków, piśmiennictwa, streszczenia w języku polskim i angielskim, oświadczeń współautorów, pełnych treści prac stanowiących rozprawę.

Pod względem edytorskim przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska liczy 80 stron i została przygotowana bardzo starannie, aczkolwiek Doktorant nie uniknął drobnych błędów edytorskich, które w żadnym wypadku nie umniejszają znaczenia pracy i badań Doktoranta. Nie wpływają także na zrozumienie tekstu pracy.

Tytuł rozprawy doktorskiej w pełni koresponduje z jej treścią, badaniami Doktoranta, przedstawionymi celami pracy i korespondującymi z nimi adekwatnie opracowanymi wnioskami.

We wstępie lekarz Piotr Januszyk w sposób syntetyczny przedstawia miejsce raka trzonu macicy wśród nowotworów ginekologicznych stwierdzanych u kobiet w wieku około- i postmenopauzalnym, kierując uwagę na czynniki predysponujące do jego rozwoju oraz kryteria różnicowania raka endometrium. W ten sposób Doktorant podkreśla zasadność prowadzonych badań i ich użyteczny charakter.

W dalszej kolejności przedstawiono charakterystykę antybiotyku jonoforowego – salinomycyny, na działanie której eksponowano wykorzystane w doświadczeniu komórki raka endometrium linii Ishikawa. Doktorant słusznie wskazuje, że brakuje doniesień wpływu salinomycyny w kontekście raka endometrium, co stanowi jeden z nowatorskich aspektów przedstawionej do recenzji pracy. Jednym z istotnych czynników determinującym powodzenie stosowanego leczenia jest przeciwdziałanie wystąpieniu zjawiska lekooporności, które występuje także w przypadkach raka endometrium. Doktorant w sposób logiczny i płynny przechodzi do kolejnych części wstępu, które zorientowane są na teoretycznym omówieniu kaspazy, semaforyny 3B oraz mikro RNA (miRNA), które uczestniczą w epigenetycznym mechanizmie regulacji ekspresji genów jako użytecznych uzupełniających molekularnych systemów markerowych, o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce oraz ocenie skuteczności terapii.

Istotne w tym kontekście jest przeprowadzenie wielostronnej ocenie zmian na poziomie molekularnym, gdyż tylko taka może wykazać złożony charakter oddziaływań pomiędzy poszczególnymi cytokinami, czynnikami wzrostowymi i aktywowanymi przez nie szlakami sygnalizacyjnymi.

Cel pracy został przedstawiony w sposób czytelny, a do jego zrealizowania przyjęto trzy zadania badawcze.

Doktorant w celu realizacji zamierzonych celów poprawnie dobrał materiał badany – hodowlę komórkową raka endometrium linii Ishikawa eksponowaną na działanie salinomycyny w porównaniu do hodowli kontrolnej oraz materiał kliniczny – próbki raka endometroidalnego endometrium w stopniu histopatologicznego różnicowania G1-G3 i preparaty endometrium uzyskane od pacjentek grupy kontrolnej. Metody analizy zostały dobrane poprawnie, są nowoczesne, umożliwiają analizę transkryptomu mRNA i miRNA, jak także wyznaczenie zmian stężenia wybranych białek – mikromacierze mRNA i miRNA, łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzona odwrotną transkrypcją, test immunoenzymatyczny ELISA, badanie immunohistochemiczne.

Na podstawie badań własnych, lekarz Piotr Januszyk zaobserwował, iż dodanie salinomycyny do hodowli komórkowej raka endometrium Ishikawa wpływa na transkryptom mRNA i miRNA komórek. Stwierdzono specyficznie różnicujące hodowlę z lekiem w porównaniu bez niego mRNA kodujące białka związane z lekoopornością po 12, 24 i 48 godzinach ekspozycji na lek. Nie było wspólnego mRNA różnicującego hodowlę raka endometrium z salinomycyną od kontroli niezależnie od czasu ekspozycji komórek na lek.

Cennym uzupełnieniem było wyznaczenie profilu ekspresji kaspaz: *CASP3*, *CASP8* i *CASP9* oraz ekspresji genów *Bcl-2l* i *Bcl-w* (antyapoptotyczne) oraz *Bax* i *Bak* (proapoptotyczne), w celu potwierdzenia lub wykluczenia indukcji przez salinomycynę apoptozy poprzez szlak mitochondrialnych w hodowli raka endometrium linii Ishikawa. Ta część analizy molekularnej sugeruje, że salinomycyna indukuje apoptozę komórek raka endometrium głównie poprzez szlak mitochondrialny.

Wykazano także, iż ekspresja wytypowanych mRNA jest zależna od cząsteczek miRNA, przy czym największe prawdopodobieństwo wpływu stwierdzono między mRNA *TUFT1* a hsa-miR-3188; mRNA *MTMR11* i hsa-miR-16; mRNA *SLC30A5* a hsa-miR-30d; mRNA *CASP3* a hsa-miR-30d; mRNA *CASP8* a hsa-miR-21; mRNA *CASP9* a hsa-miR-1271. By w pełni ocenić udział regulacyjnego wpływu miRNA na wzorzec ekspresji genów specyficznych dla zjawiska utraty wrażliwości na salinomycynę w linii Ichikawa, Doktorant ocenił wpływ leku na zmiany stężenia białka TUFT1, MTMR11 i SLC30A.

W ostatnim etapie przedstawiono zmiany stężenia SEMA3B w preparatach klinicznych raka endometrium w stopniu histopatologicznego G1-G3 w porównaniu do grupy kontrolnej, odnotowując istotne statystycznie różnice.

Dyskusja jest bardzo mocną stroną pracy. Pokazuje doskonale przygotowanie Doktoranta do pracy badawczej, dojrzałość naukową, umiejętność prowadzenia polemiki, bardzo dobrą znajomością zagadnień biologii molekularnej nowotworów i wykorzystania nowoczesnych technik i metod analizy transkryptomu i proteomu. Doktorant omawia uzyskane przez siebie wyniki w kontekście możliwości praktycznego, klinicznego wykorzystania wskazanych w rozprawie potencjałów markerów molekularnych, konfrontując je z obserwacjami innych Badaczy.

W podsumowaniu Doktorant zauważa prowadzone przez niego badania sugerują zasadność prowadzenia dalszych badań nad możliwością wykorzystania salinomycyny w terapii raka endometrium w innych modelach *in vitro*, a następnie *in vivo*, wykorzystania wytypowanych markerów molekularnych w ocenie potencjału terapeutycznego leku, jak także wskazują na ścisły związek między potencjałem do przerzutowania a nasileniem procesu angiogenezy oraz występowanie interakcji pomiędzy szlakami sygnałowymi w procesie transformacji nowotworowej.

Dobór piśmiennictwa jest poprawny, zastosowano ujednolicony system cytowania prac i zapisu bibliograficznego 103 pozycji, z których zdecydowana większość pochodzi z ostatnich 5 lat.

Wskazane w dalszej działalności badawczej Doktoranta byłoby:

1. określenie zmian profilu ekspresji genów i potencjalnie regulujących ich ekspresję miRNA związanych z lekoopornością, śmiercią komórki i angiogenezą w pozostałych liniach

komórkowych raka endometrium eksponowanych na salinomycynę i korelacja wykrytych zmian.

2. wyznaczenie zmian ekspresji poszczególnych semaforyn w hodowli komórkowej i materiale klinicznym.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa Doktorska lekarza Piotra Januszyka, pt. "Profil ekspresji genów i kodowanych przez nie białek związanych ze zjawiskiem utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie w raku endometrium" spełnia wszelkie warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim i dlatego mam zaszczyt przedłożyć Kolegium Nauk Medycznych Rady Naukowej Uniwersytetu Rzeszowskiego moją pozytywną ocenę dysertacji z wnioskiem o dopuszczenie lekarza Piotra Januszyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. med. ZBIGNIEW KOJS
Specjalista ginekologii onkologicznej
specjalista ginekolog-położnik
specjalista onkolog
Kraków, ul. Bogdanowicza 10
3196546 LEKARZ RR980604517