

DR HAB. N. MED. HUBERT WOLSKI

ZAKOPANE, 15.02.2022.

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

Rak endometrium jest najczęściej występującym rakiem żeńskiego układu rozrodczego. W Europie 1 do 2 kobiet spośród 100 zachoruje w ciągu swojego życia na raka trzonu macicy. Liczba zachorowań wzrasta w Polsce i w krajach Europy. Podstawą leczenia raka trzonu macicy jest zabieg chirurgiczny. Radioterapia i chemioterapia mają zastosowanie jako leczenie uzupełniające operację. Wymienione sposoby leczenia mają swoje zalety, działania niepożądane i przeciwwskazania. Dostępnych jest kilka możliwych metod leczenia, a ostateczny wybór jest efektem bilansu pomiędzy oczekiwanymi zyskami, a potencjalnym ryzykiem działań niepożądanych. Leczenie operacyjne umożliwia określenie stadium zaawansowania choroby. W odniesieniu do wszystkich stadiów choroby wciąż istnieją rozbieżności oraz brak silnych dowodów wskazujących na optymalną metodę leczenia. Stałe miejsce w leczeniu w ostatnich latach znajduje chemioterapia. Nie wiadomo jednak, jaka kombinacja leków jest najlepsza, aby była skuteczna i jak najmniej przynosiła działań



niepodążonych. Lepsze poznanie i zrozumienie molekularnych mechanizmów, które podlegają modyfikacji podczas leczenia onkologicznego oraz tych które mają związek z wystąpieniem lekooporności skłania do poszukiwania nowych systemów markerowych detekcji tego procesu, ale również zastosowania nowych leków. Obiecującym lekiem w terapii przeciwnowotworowej jest salinomycyna. Dane dotyczące wpływu salinomycyny na molekularne mechanizmy związane ze zjawiskiem lekooporności i udziałem szlaku kaspaz w raku endometrium są słabo poznane. Wydaje się, że dopiero rozwój wiedzy w tym zakresie pozwoli na lepsze zrozumienie występowania zjawiska utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie przeciwnowotworowe. W świetle powyższego uważam, że lekarz Piotr Januszy podjął niesłychanie istotny temat z zakresu wpływu salinomycyny na molekularne mechanizmy związane ze zjawiskiem utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie w raku endometrium.

Zasadniczym celem pracy by było wyznaczenie profilu ekspresji mRNA i miRNA związanych ze zjawiskiem lekooporności i szlaków sygnałowych zależnych od kaspaz w komórkach raka endometrium linii Ishikawa traktowanych salinomycyną w porównaniu do hodowli kontrolnej oraz określenie znaczenia SEMA3B w angiogenezie w kontekście raka endometrium. W celu realizacji celu nadrzędnego przyjęto następujące zadania badawcze: ocena wpływu salinomycyny na zmiany stężenia wybranych białek związanych ze zjawiskiem lekooporności w komórkach raka endometrium linii Ishikawa. Ocenę wpływu salinomycyny na zmiany aktywności kaspazy- 3, -8 i -9 w komórkach raka endometrium linii Ishikawa. Ocenę zmian ekspresji SEMA3B w materiale klinicznym – próbkach raka endometrium w stopniach histopatologicznego zróżnicowania G1-G3 i preparatach uzyskanych od grupy kontrolnej.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań i składa się z następujących rozdziałów: Wykaz Skrótów, Publikacji, Tabel, Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Spis Tabel, Spis Rycin, Oświadczenie współautorów publikacji, na podstawie której oparta jest rozprawa doktorska, Załączniki. W całości rozprawa zawarta jest na 80 stronach.

We Wstępie Doktorant skupia się na omówieniu problemu klinicznego raka endometrium, leku salinomycyny w klinice onkologicznej, rolę regulatorową mikro RNA. Szeroko omawia kaspazy. W dalszej części przedstawia semaforyny 3B w kontekście nowotworzenia. Dużo uwagi poświęcił zjawisku utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie przeciwnowotworowe. Wstęp bardzo dobitnie świadczy o przygotowaniu merytorycznym lekarza Piotra Januszego do prowadzenia zaplanowanych badań.

Eksperymenty przeprowadzone z użyciem materiału biologicznego pochodzącego od pacjentek zakwalifikowanych do badania otrzymały zgodę nr KNW/0022/KB/237/16 Lokalnej Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Badania zostało bardzo poprawnie zaprojektowane. Grupa badana liczyła 45 pacjentek z rozpoznaniem rakiem endometrioidalnym endometrium, w wieku powyżej 45 lat, w tym 17 pacjentek z rakiem w stopniu histopatologicznego zróżnicowania G1, 15 pacjentek z rakiem w stopniu G2 i 13 pacjentek z rakiem w stopniu G3. Próbkę zostały uzyskane w trakcie zabiegu histerektomii i następnie ocenione pod względem histopatologicznym, co pozwoliło na podział preparatów względem stopnia histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium. Podstawą do włączenia do badania były: wiek powyżej 45 lat, rozpoznanie raka endometrioidalnego endometrium, potwierdzone w badaniu histopatologicznym, BMI<40, potwierdzenie braku rozsiewu nowotworowego w przedoperacyjnych badaniach obrazowych, niestosowanie hormonalnej terapii zastępczej w okresie ostatnich 5 lat, wyrażenie świadomej, dobrowolnej zgody na udział w badaniu. Kryteria wyłączenia z grupy badanej były następujące: wiek poniżej 45 lat, przerost endometrium z atypią lub bez niej, rozpoznanie raka innego niż gruczolakorak endometrium, skrajna otyłość (BMI>40), stosowanie hormonalnej terapii zastępczej w okresie ostatnich 5 lat, stwierdzenie nieoperacyjności nowotworu, potwierdzenie rozsiewu nowotworowego w przedoperacyjnych badaniach obrazowych, brak wyrażenia świadomej, dobrowolnej zgody na udział w badaniu. Grupa kontrolna liczyła 15 pacjentek. Kryteria włączania z grupy kontrolnej były następujące: wiek powyżej 45 lat, wykluczenie chorób nowotworowych, BMI<40, niestosowanie hormonalnej terapii zastępczej w okresie ostatnich 5 lat, wyrażenie świadomej, dobrowolnej zgody na udział w badaniu. Kryteria wyłączenia z grupy badanej były następujące: wiek poniżej 45 lat, rozpoznanie choroby nowotworowej, skrajna otyłość (BMI>40), stosowanie hormonalnej terapii



zastępczej w okresie ostatnich 5 lat, brak wyrażenia świadomej, dobrowolnej zgody na udział w badaniu.

W pracy doktorant wykorzystał bloczki parafinowe, zdeponowane w archiwum Pracowni Patomorfologii Beskidzkiego Centrum Onkologii w Bielsku-Białej. Przeprowadzone badania immunohistochemiczne, kwantyfikacja oraz archiwizacja danych eksperymentalnych oraz ocena reakcji immunohistochemicznej opisane zostały bardzo starannie. Zastosowano również prawidłowe metody analizy statystycznej.

W toku badań Doktorant uzyskała interesujące wyniki oceniając mikromacierzowy profil ekspresji genów związanych z lekoopornością zaobserwował, że liczba różnicujących mRNA hodowlę inkubowaną z lekiem od kontroli w zależności od czasu ekspozycji komórek na salinomycynę jest następujący: H_12 vs K - 9 mRNA, H_24 vs K - 7 mRNA, H_48 vs K - 1 mRNA. Autor na podstawie przeprowadzonej analizy predykcyjnej, stwierdził największe powinowactwo pomiędzy *TUFT1* i hsa-miR-3188 (FC + 2.48), *MTMR11* i has-miR-16 (FC -1.74) oraz pomiędzy *SLC30A5* i hsa-miR-30d (FC -2.01).

W przedstawionej rozprawie doktorskiej udowodniono, że salinomycyna w największym stopniu zmienia profil ekspresji trzech genów związanych z utratą adekwatnej odpowiedzi na leczenie, mianowicie: *TUFT1*, *MTMR11*, *SLC30A5*. Podjęto również oceny zmian ekspresji dla *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*. Potwierdzono wcześniejsze doniesienia o odmienności profilu ekspresji SEMA3B w raku endometrium w stosunku do warunków fizjologicznych w zależności od stopnia histopatologicznego zróżnicowania raka oraz rodzaju komórek, w których oceniono ekspresję SEMA3B. Do zalet badania zaliczyć należy podjęcie oceny wpływu salinomycyny w zakresie skuteczności w leczeniu raka endometrium w sytuacjach klinicznych związanych z wysokim ryzykiem wystąpienia lekooporności. Problem ten nie był do tej pory podejmowany w opracowaniach naukowych.

Jednym z najistotniejszych fragmentów omawianej pracy jest ocena dla szlaku kaspaz obserwacja, że liczba mRNA różnicujących komórki raka endometrium eksponowanych na salinomycynę w porównaniu z hodowlą kontrolną dla każdego czasu inkubacji komórek z lekiem jest następująca: H_12 vs K - 8 mRNA, H_24 vs K - 10 mRNA, H_48 vs K - 3 mRNA. Ponadto zaobserwował, że 5 z 14 różnicujących mRNA różnicowało hodowlę raka



endometrium linii Ishikawa niezależnie od czasu inkubacji komórek z lekiem i odpowiadały genom: *CASP3*, *CASP8*, i *CASP9*. Najwyższe prawdopodobieństwo wpływu oddziaływania na ekspresję mRNA *CASP3* doktorant zaobserwował dla hsa-miR-30d (średnia wartość FC -2,01). Z kolei największe prawdopodobieństwo wpływu na profil ekspresji mRNA *CASP8* odnotował dla hsa-miR-21 (średnia wartość FC +1,31) a ekspresja ta wydaje się być potencjalnie regulowana przez hsa-miR-1271.

Dyskusja, w której rzetelnie porównano rezultaty zawarte w omawianej rozprawie z obserwacjami i wnioskami uzyskanymi przez innych autorów. W Dyskusji dużo miejsca Doktorant poświęcił wskazaniu potrzeby identyfikacji nowych markerów, które mogą być wykorzystywane w diagnostyce raka endometrium i detekcji lekooporności na leczenie. Wskazuje również, że przeprowadzone badania mogą mieć znaczenie w ustaleniu związku między ekspresją *SEMA3B*, a wskaźnikiem przeżycia całkowitego u pacjentów z rakiem endometrium. Na podstawie przeprowadzonych badań odnotowano ekspresję *SEMA3B* w komórkach nowotworowych endometrium, śródbłónka naczyniowego oraz zrębu guza, przy czym w komórkach raka endometrium największą ekspresję stwierdzono w stopniu G1, w komórkach zrębu w wycinkach G2, a w komórkach śródbłónka w próbkach raka o stopniu różnicowania G3.

Wnioski, w liczbie 7, są logicznym podsumowaniem przeprowadzonych badań. Najważniejsze z nich wskazują, że salinomycyna dodana do hodowli komórek raka endometrium indukuje zmiany ekspresji cząsteczek mRNA i miRNA związanych ze zjawiskiem lekooporności i zaprogramowanej śmierci komórki, a także, że w przypadku raka endometrium salinomycyna przeciwdziała wystąpieniu utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie oraz indukuje apoptozę komórek głównie przez szlak mitochondrialny. Stwierdzono również, iż w przebiegu raka endometrium ekspresja *SEMA3B* jest odmienna niż w warunkach fizjologicznych. Potwierdzony został ścisły związek między potencjałem do przerzutów, a nasileniem procesu angiogenezy oraz występowanie interakcji pomiędzy szlakami sygnałowymi w procesie transformacji nowotworowej. Ponadto potwierdzono, że salinomycyna w największym stopniu zmienia profil ekspresji trzech genów związanych z utratą adekwatnej odpowiedzi na leczenie, mianowicie: *TUFT1*, *MTMR11*, *SLC30A5*, jak również wpływ salinomycyny na szlak sygnałowy zależny od kaspaz. Oceniono również



geny, cząsteczki miRNA i białka mogą być użytecznymi uzupełniającymi markerami w diagnostyce raka endometrium i detekcji lekooporności na leczenie. Wnioski zarówno z przeprowadzonego badania jak i analizy danych literaturowych świadczą o podjęciu istotnego problemu badawczego w celu oceny doktoranta. Autor dostrzega nowe pola w poznaniu utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie przeciwnowotworowe.

W przeglądzie piśmiennictwa Doktorant zgromadził 103 pozycji, w większości są to publikacje danych z ostatnich kilku lat. Dodatkowo rozprawę zaopatrzono w streszczenie w języku polskim oraz angielskim.

Podsumowując podkreślić należy, że w rozprawie Doktorant przedstawił spójnie zaplanowane badania dotyczące istotnego problemu klinicznego. Dysertacja prezentuje wysoki poziom merytoryczny i bez wątpienia stanowi cenny wkład w poznanie nowych markerów w diagnostyce raka endometrium i detekcji lekooporności na leczenie. Wartością przedstawionej rozprawy jest wskazanie przez Doktoranta, że salinomycyna indukuje proces apoptozy komórek raka endometrium w głównej mierze przez szlak mitochondrialny, również, że salinomycyna dodana do hodowli komórek raka endometrium linii Ishikawa indukuje zmiany w transkrypcji mRNA i miRNA, w tym związanym ze zjawiskiem lekooporności. Doktorant potwierdził wpływ salinomycyny na szlak sygnałowy zależny od kaspaz. Wszystko to wpływa na całociowy dobry odbiór omawianej dysertacji.

Podjęcie stale aktualnego tematu z zakresu terapii nowotworów, zastosowanie poprawnych metod badawczych, właściwa umiejętność dyskusji tematu i prawidłowość wnioskowania składa się na rzetelne opracowanie uzyskanych wyników i przedstawienie interesujących wniosków. Niestety skład komputerowy pracy niesie wiele niedogodności w odbiorze treści zawartej w rozprawie, co nie zmienia oceny merytorycznej. W związku z powyższym mam zaszczyt złożyć wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Rzeszowie o dopuszczenie lekarza Piotra Januszka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. Hubert Wolski
specjalista ginekolog-położnik
tel. 602 491 180
6046817