

Sosnowiec, 24.02.2022

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
Katedra i Zakład Genetyki
Medycznej

41-200, Sosnowiec,
Jedności 8
www.sum.edu.pl

dr hab. n. med. Monika Paul-
Samojedny
tel.: (+ 48 32) 364-12-45
fax: (+48 32) 364-12-44
e-mail: mpaul@sum.edu.pl

Dr hab. n. med. Monika Paul-Samojedny
Katedra i Zakład Genetyki Medycznej
Śląski Uniwersytet Medyczny
Ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek. Piotra Januszyka pt. „Profil ekspresji genów i kodowanych przez nie białek związanych ze zjawiskiem utraty odpowiedzi na leczenie salinomycyną w raku endometrium”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została zawarta na osiemdziesięciu stronach wydruku komputerowego i posiada typowy dla opracowań naukowych układ. Została oparta o cykl trzech prac w czasopismach o łącznym współczynniku wpływu (IF) równym 8,323 i łącznej liczbie punktów ministerialnych równej 349. Publikacje wchodzące w skład cyklu dotyczą raka błony śluzowej macicy (raka endometrium), najczęściej występującego nowotworu ginekologicznego u kobiet w wieku około- i postmenopauzalnym.

Zgodnie z danymi zawartymi w bazie GLOBOCAN, tylko w 2020 roku odnotowano 9869 nowych przypadków zachorowań i 2195 zgonów na ten nowotwór, co stawia go odpowiednio na 4 pod względem zachorowalności oraz na 6 miejscu pod względem śmiertelności na liście nowotworów u kobiet w Polsce. Niestety liczba zachorowań na raka trzonu macicy wzrasta z roku na rok ze względu na wydłużenie życia i zwiększenie odsetka kobiet otyłych w Europie. Rak trzonu macicy występuje najczęściej u kobiet po menopauzie (pomiędzy 55 a 70 r. ż.), natomiast przypadki występowania tego nowotworu u kobiet przed menopauzą stanowią około 10-15% i są zwykle wynikiem długotrwałych cykli bezowulacyjnych (PCOS), a około 3% ma związek z mutacjami germinalnymi w obrębie genów mutatorowych (MLH1, PMS2, MSH2 i MSH6) warunkującymi występowanie zespołu Lyncha.

Zachorowalność na ten typ nowotworu przed 40 r. ż. jest natomiast rzadka i nie przekracza 4% wszystkich przypadków. Wyróżnia się dwa typy raka endometrium: typ 1 - gruczolakorak endometrioidalny (stanowi 80-90% wszystkich rozpoznań), który jest zależny od estrogenów i lepiej rokuje (G1-G3 wg FIGO) oraz typ 2 - gruczolakorak nieendometrioidalny, do którego zalicza się: raka surowiczego, raka jasnokomórkowego, guzy nieodróżnicowane oraz mieszane. Typ ten występują głównie u starszych kobiet i cechuje się gorszym rokowaniem (G3 wg FIGO) i brakiem związku z hiperestrogenizmem. Leczenie raka endometrium obejmuje chirurgię, radioterapię, chemioterapię oraz terapię hormonalną. W ostatnim czasie zwraca się uwagę na korelację pomiędzy nową klasyfikacją molekularną tego nowotworu, a tradycyjną - histomorfologiczną. Ze względu na korzyści kliniczne, jakie niesie uwzględnienie klasyfikacji molekularnej, zaleca się wdrażanie jej do procesu diagnostycznego. Niestety pomimo względnie dużej skuteczności terapii przeciwnowotworowej i często niskiego stopnia zaawansowania choroby w momencie jej rozpoznania, liczba zgonów w Polsce przewyższa nadal średnią europejską. Oporność komórek nowotworowych na stosowaną chemo- lub radioterapię stanowi jeden z największych problemów współczesnej onkologii klinicznej. Dostępne dane wskazują, że miRNA, stanowiące jeden z celów badawczych Doktoranta, mogą regulować ekspresję więcej niż 60% ludzkich genów obejmując m. in. onkogeny, geny supresorowe oraz geny związane z chemioopornością, a także z uwagi na fakt, że mechanizmy chemo- i radiooporności nie są w pełni poznane w przypadku raka endometrium, zasadne jest podjęcie przez Doktoranta badań, które pozwoliłyby je lepiej scharakteryzować. Podjęcie przez Doktoranta niniejszego tematu badawczego uważam, więc za uzasadnione i ważne z punktu widzenia zarówno poznawczego, jak i potencjalnie aplikacyjnego.

We *Wstępie* liczącym 6 stron maszynopisu, Doktorant zawarł podstawowe informacje dotyczące raka błony śluzowej macicy, krótką

charakterystykę salinomycyny, wskazał podstawowe mechanizmy odpowiedzialne za zjawisko utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie przeciwnowotworowe, zamieścił podstawowe informacje dotyczące uczestniczących w procesie apoptozy kaspaz, krótko opisał regulatorową rolę cząsteczek miRNA, a także udział semaforyn w procesie nowotworzenia. Odnosząc się do informacji zawartych we *Wstępie*, uważam, że Doktorant mógł nieco dokładniej scharakteryzować typy raka endometrium. Zabrakło także informacji o mechanizmie działania salinomycyny i jej zastosowaniu w terapii raka endometrium. We *Wstępie* nie wskazano również istotnych przyczyn genetycznych lekooporności nowotworów ogólnie (str. 10), a także nie zamieszczono informacji o przyczynach lekooporności w raku endometrium. Ponadto brakuje także informacji odnośnie wpływu salinomycyny na apoptozę. Dokładniej powinno być ponadto opisane powiązanie miRNA z lekoopornością.

Celem badań zaplanowanych przez Doktoranta było wyznaczenie profilu ekspresji mRNA i miRNA związanych ze zjawiskiem lekooporności i szlakiem sygnałowym zależnym 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. *Założenia i cel pracy* zostały jasno sformułowane, chociaż można było uniknąć powtórzenia w tym rozdziale fragmentu *Wstępu*.

W rozdziale *Materiał i Metody* Doktorant zamieścił informacje dotyczące linii komórkowej, na której były prowadzone badania oraz warunków prowadzenia jej hodowli, opis postępowania przeprowadzonego w celu ekstrakcji całkowitego RNA wraz z oceną jakościową i ilościową ekstraktów, krótki opis postępowania mającego na celu wyznaczenie profilu ekspresji mRNA i miRNA w komórkach raka endometrium eksponowanych na salinomycynę z wykorzystaniem mikromacierzy, a także opisał warunki analizy PCR w czasie rzeczywistym poprzedzonej odwrotną transkrypcją, krótką charakterystykę testu

immunoenzymatycznego ELISA oraz oznaczenia aktywności kaspazy 3, 8 i 9. W rozdziale tym zawarta została także charakterystyka grupy badanej - Pacjentek z rakiem endometrium oraz grupy kontrolnej wraz z opisem kryteriów włączenia i wyłączenia z badań, jak również opis badania immunohistochemicznego i użytych do analizy wyników metod statystycznych. W niniejszym rozdziale, zdaniem recenzenta, brakuje dokładniejszej charakterystyki linii komórkowej stanowiącej przedmiot prowadzonych badań, a także uzasadnienia, dlaczego wybrano tą a nie inną linię komórkową raka endometrium. Praca doktorska miałaby niewątpliwie większą wartość, gdyby badania przeprowadzono na więcej niż jednej linii komórkowej raka endometrium, zważywszy na heterogenność nowotworów. Po przeczytaniu tego rozdziału nasuwa się także pytanie odnośnie stosowanego stężenia salinomycyny - 1 μ M i czasu ekspozycji równego 12, 24 i 48 h – skąd takie stężenie i czas? Z obowiązku recenzenta muszą również zwrócić uwagę na błędy w opisie ekstrakcji RNA (str. 16) oraz brak wytłumaczenia, jakie komórki stanowiły hodowlę kontrolną (rozumiem, że komórki tej samej linii, tylko nieeksponowane na działanie salinomycyny?). Inne uwagi odnoszące się do tego rozdziału rozprawy doktorskiej to:

- zbyt pobieżnie opisana metodyka obejmująca analizę ekspresji genów z wykorzystaniem mikromacierzy oraz test immunoenzymatyczny;
- w rozdziale najpierw powinien być opisany materiał do badań a potem metody (a jest pomieszane);
- w rozdziale 3.8 (str. 21) brak charakterystyki bloczków parafinowych (jaki to był materiał?).

Rozdział *Wyniki* liczący 5 stron maszynopisu, obejmuje analizę profilu ekspresji ocenianych mRNA w hodowli komórkowej raka endometrium linii Ishikawa eksponowanych na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej, ocenę aktywności transkrypcyjnej genów szlaku kaspaz, ocenę zmiany profilu ekspresji wybranych genów pro- i antyapoptotycznych w tych

samych komórkach. W niniejszym rozdziale opisano także wyniki analizy mikromacierzowego profilu ekspresji miRNA różnicujących hodowlę komórkową Ishikawa eksponowaną na salinomycynę w porównaniu z hodowlą kontrolną. Przedstawiono również profil ekspresji miRNA potencjalnie regulujących ekspresję *CASP3*, *CASP8* i *CASP9* oraz wyniki oceny aktywności kaspazy 3, 8 i 9 w badanych komórkach. Rozdział ten zawiera także wyniki oceny profilu stężeń białek TUFT1, MTMR11, SLC30A5 w komórkach raka endometrium linii Ishikawa eksponowanych na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej, a także wyniki oceny profilu ekspresji SEMA3B w pochodzących od Pacjenteń próbkach raka endometrium o stopniu morfologicznego zróżnicowania od G1 do G3. Po zapoznaniu się z treścią tego rozdziału nasuwa się pytanie, dlaczego tylko dla trzech genów: *TUFT1*, *ABCB1* i *MTMR11* wykonano analizę RT-qPCR, podczas, gdy jako różnicujące wytypowano jeszcze geny *MX2*, *MYD88* i *SLC30A5* (str. 24), a ocena na poziomie białka odnosi się do białek TUFT1, MTMR11 i SLC30A5? W rozdziale *Wyniki* brakuje opisu jak wyglądała ekspresja genów różnicujących w raku endometrium względem kontroli – czy była wyższa, niższa? Inne uwagi w odniesieniu do wspomnianego rozdziału rozprawy doktorskiej:

- nie można użyć określenia „wyciszenie ekspresji genów” kodujących białka antyapoptotyczne, jeśli ta ekspresja występuje, tylko, że na niższym poziomie;

- napisano, że istotnie statystycznie wyższa ekspresja genów Bax i Bak sugeruje, że salinomycyna indukuje zaprogramowaną śmierć komórki przez ścieżkę zależną od mitochondriów (str. 26) jest zbyt daleko idącym wnioskiem, ponieważ ocena ekspresji jedynie dwóch genów związanych z regulacją tego procesu, bez potwierdzenia indukcji apoptozy z wykorzystaniem innych testów np. oceny wiązania aneksyny V-FITC, czy kondensacji chromatyny np. z wykorzystaniem cytometrii

przeptywowej, czy mikroskopii fluorescencyjnej, nie pozwala na taką interpretację uzyskanego wyniku;

- błędne sformułowanie na str. 28: „Ekspresję SEMA 3B zaobserwowano w błonie macicy komórek gruczołowych tylko w próbkach kontrolnych” – najprawdopodobniej wynikające z niepoprawnego tłumaczenia.

W rozdziale *Dyskusja* liczącym 8 stron maszynopisu Doktorant zwraca uwagę na problem efektywnej terapii w chorobach nowotworowych związany z nabywaniem przez komórki nowotworowe oporności na stosowane chemioterapeutyki. Charakteryzuje ponadto białka kodowane przez wytypowane geny różnicujące komórki raka endometrium linii Ishikawa eksponowane na salinomycynę od komórek stanowiących kontrolę, a także porównuje wyniki oceny aktywności kaspaz 3, 8 i 9. W kolejnej części *Dyskusji* porusza temat zaangażowania wytypowanych cząsteczek miRNA w regulację ekspresji mRNA *TUFT1*, *MTMR11* i *SLC30A5* oraz na ekspresję mRNA *CASP3*, *CASP8* i *CASP9*. Rozdział ten zawiera także ocenę znaczenia różnej ekspresji SEMA3B w bioptatach uzyskanych podczas zabiegu histerektomii od Pacjenteń ze zdiagnozowanym rakiem endometrium oraz Pacjenteń operowanych z przyczyn innych niż onkologiczne. Po przeczytaniu tego rozdziału nasuwają się następujące uwagi:

- napisanie na podstawie oceny zmian w ekspresji *TUFT1*, że salinomycyna zapobiega wystąpieniu lekooporności (str. 30) jest zbyt daleko idącym wnioskiem;

- niezrozumiałe jest dla recenzenta zdanie ze str. 30, akapit trzeci, brzmiące: „Nie można także, że ekspresja *TUFT1* może być jednym z bardziej czułych markerów monitorowania warunków panujących w mikrośrodowisku guza”;

- zbyt lakoniczny jest fragment dyskusji dotyczący genu *MTMR11* i *SLC30A5* oraz genów *CASP3*, *CASP8* i *CASP9*;

- zdanie ze str. 32, ostatni akapit: „Istotnym z punktu oceny efektywności terapii salinomycyną w przypadku raka endometrium jest fakt,

że na podstawie uzyskanych wyników mikromacierzowego profilu ekspresji wydaje się, że salinomycyna w trwały sposób indukuje zmiany w komórkach, w tym proces zaprogramowanej śmierci komórki”, jest zbyt daleko idącym stwierdzeniem, które nie ma pełnego uzasadnienia w uzyskanych wynikach;

- w kilku miejscach w pracy użyta nazwa salinomycin zamiast salinomycyna;
- zbyt lakoniczny opis dotyczący regulacji ekspresji genów kodujących kaspazy przez wytypowane miRNA;
- obecność pewnych rozbieżności pomiędzy wynikami zawartymi w publikacji dotyczącej SEMA3B a fragmentem dyskusji dotyczącym tego samego tematu;
- sprzeczne informacje o SEMA3B (str. 35) – określona jako supresor wzrostu guza, a w dalszej części napisano, że nasila sekrecję IL-8 promując proces przerzutowania.

Wątpliwości recenzenta budzi także ostatnie zdanie w *Dyskusji* (str. 36): „Potwierdzony został ścisły związek między potencjałem do przerzutowania a nasileniem procesu angiogenezy oraz występowanie interakcji pomiędzy szlakami sygnałowymi w procesie transformacji nowotworowej” – na jakiej podstawie wyciągnięto taki wniosek?

Rozdział *Wnioski* zawiera 7 wniosków, co do których recenzent ma pewne uwagi - a mianowicie: sugeruję przeredagowanie wniosków, ponieważ część z nich to powtórzenie wyników a nie wyciągnięty na ich podstawie wniosek. Ponadto wniosek 3 i 4 należałoby połączyć, mówią praktycznie o tym samym. Dodatkowo na podstawie wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej nie można jednoznacznie powiedzieć, nie przeprowadzając dodatkowych testów potwierdzających poczynioną obserwację, że salinomycyna indukuje proces apoptozy komórek raka endometrium w głównej mierze przez szlak mitochondrialny. Ponadto, zważywszy na fakt istnienia innych niż apoptoza, mechanizmów śmierci komórkowej, interesujące byłoby uzupełnienie niniejszych badań np. o ocenę ekspresji genów i białek związanych

z procesem autofagii, biorąc pod uwagę jej dwojaki wpływ na komórki nowotworowe. Dodatkowo, w opinii recenzenta wniosek 7 jest zbyt daleko idącym stwierdzeniem, ponieważ uzyskane wyniki wymagają jeszcze potwierdzenia chociażby w oparciu o badania z wykorzystaniem innych linii komórkowych raka endometrium.

Podsumowując - przedstawione uwagi krytyczne nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy doktorskiej, dlatego też pracę doktorską lek. Piotra Januszyka pt. „Profil ekspresji genów i kodowanych przez nie białek związanych ze zjawiskiem utraty odpowiedzi na leczenie salinomycyną w raku endometrium” oceniam pozytywnie ze względu na nowatorski charakter oraz cenne informacje dotyczące wpływu salinomycyny na ekspresję genów związanych z lekoopornością oraz procesem programowanej śmierci komórki typu I. Uzyskane przez Doktoranta wyniki mogą stanowić podstawę i nakreślać kierunek dalszych badań związanych z lekoopornością raka endometrium, a także innych nowotworów.

Niniejszym stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana Piotra Januszyka pod tytułem „Profil ekspresji genów i kodowanych przez nie białek związanych ze zjawiskiem utraty odpowiedzi na leczenie salinomycyną w raku endometrium” spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789).

Biorąc powyższe pod uwagę zwracam się do Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego z wnioskiem o dopuszczenie lek. Piotra Januszyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę fakt opublikowania wszystkich wchodzących w skład cyklu prac w czasopismach posiadających wskaźnik IF, wnioskuję o przyznanie nagrody dla niniejszej pracy.