



*Łódź, dnia 21 stycznia 2019*

*Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Starska-Kowarska*

*I Katedra i Klinika Otolaryngologii i Laryngologii Onkologicznej*

*Uniwersytetu Medycznego w Łodzi*

## **OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**lek. Olgi Sieniawskiej-Buccella**

**pt.: „ROLA mikroRNA W PATOGENEZIE I PROGNOSTYCE RAKA KRTANI”**

Statystyki dotyczące chorób nowotworowych i dane epidemiologiczne wskazują, że płaskonabłonkowe raki regionu głowy i szyi (ang. *head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC), w tym raki krtani, zajmują nadal wysokie miejsce wśród najczęstszych nowotworów rozpoznawanych w populacji światowej wśród mężczyzn, stanowiąc równocześnie główną przyczynę zgonów w populacji polskiej. Analiza porównawcza notowanych współczynników zachorowań z powodu raka krtani w Polsce, sięgająca ponad 12/100 000 nowych przypadków *carcinoma laryngis* rozpoznanych w populacji, dowodzi, że Polska nadal pozostaje krajem wysokiego ryzyka rozwoju tego typu nowotworu w Europie i na świecie. Niestety, pomimo coraz szerzej dostępnych i wykorzystywanych nowoczesnych metod diagnostycznych, zastosowania najnowszych sposobów postępowania terapeutycznego, w tym mikrochirurgii robotowej (ang. *transoral robotic surgery*, TORS) z wykorzystaniem lasera CO<sub>2</sub> oraz prowadzenia wielośrodkowych i wielokierunkowych badań z dziedziny onkologii klinicznej, biologii molekularnej, immunologii nowotworów i patomorfologii nie przyniosły poprawy odsetka 5-letnich przeżyć chorych, utrzymujących się nadal na niezadowolającym poziomie 40-50%. Co istotne, powszechnie zaakceptowane i stosowane w praktyce onkologicznej algorytmy diagnostyczno-kliniczne, powstałe w oparciu o wciąż poszerzaną wiedzę dotyczącą patogenezы i mechanizmów regulacyjnych w chorobie

nowotworowej oraz wieloletnie dane kliniczne nie stanowią wystarczających narzędzi dla wyboru najlepszej w danym przypadku metody postępowania terapeutycznego, jak też nie pozwalają na precyzyjne wskazanie czynników rokowniczych u chorych z nowotworami regionu głowy i szyi. Dlatego nadal naukowcy poszukują nowych wskaźników rzeczywistej inwazyjności biologicznej guza, uwzględniających także cechy indywidualne i osobnicze pacjentów, które pozwoliłyby na wskazanie optymalnego modelu postępowania diagnostyczno-leczniczego u każdego chorego, a więc indywidualizację i personalizację terapii.

Od początku lat 90 ubiegłego wieku w literaturze światowej wskazuje się na znaczącą rolę mechanizmów związanych z aktywnością jednoniciowych, niekodujących cząsteczek mikroRNA (miRNA) i regulacją za ich pośrednictwem ekspresji genów kluczowych dla podziałów i różnicowania komórek organizmu ludzkiego, zjawiska apoptozy oraz kontroli potranskrypcyjnej szlaków regulacyjnych m.in. cyklu komórkowego i innych istotnych procesów wewnątrzkomórkowych. Dane naukowe z ostatnich lat dowodzą potencjalnego znaczenia i możliwość praktycznego wykorzystania profilu ekspresji aktywnych cząsteczek miRNA w komórkach nowotworowych, wiążąc aktywność tego typu mRNA jako onkogenów (onkomirów), genów supresorowych oraz genów odpowiedzialnych za stabilność genomu i tym samym związku z onkogenezą. Profil aktywności konkretnych cząsteczek miRNA stał się podstawą do opracowania nowoczesnych teorii dotyczących inicjacji procesu neoplastycznego, zjawiska dalszej metaplastji płaskonabłonkowej oraz progresji zmian nowotworowych, co więcej – użyteczności tych biologicznych parametrów jako czynników diagnostycznych i rokowniczych w wielu nowotworach różnego pochodzenia histologicznego.

W świetle najnowszej wiedzy o zmienności ludzkiego genomu i regulatorowych mechanizmach zachodzących w przebiegu kancerogenezy oraz w związku z szybkim postępem w stosowanych technologiach analizy DNA, w tym, coraz szerzej stosowanych, dotychczas niedostępnych w codziennej praktyce metod genetycznych, należy spodziewać się w najbliższych latach, rozpowszechnienia indywidualnego podejścia i wskazania osobniczych zmian molekularnych i genetycznych zachodzących w komórkach nowotworowych u konkretnego chorego, warunkujących właściwe rozpoznanie i leczenie choroby nowotworowej. Poszukiwanie „spersonalizowanych” mechanizmów i uwarunkowań przebiegu kancerogenezy regulowanych przez cząsteczki mikroRNA jest obecnie jednym z ciekawszych kierunków badań z zakresu onkologii. Zatem, tematyka podjętych przez Doktorantkę lek. Olgę Sieniawską-Buccella badań jest bardzo interesująca, jak też daje możliwość poszerzenia wiedzy na temat zastosowania profilu miRNA i genów kodujących białka związane z regulacją szlaku aktywacji i obróbki miRNA jako metody oceny biologii

komórki nowotworowej, także w odniesieniu do ryzyka rozwoju nowotworu i zaawansowania klinicznego u chorych z rakiem krtani.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. Olgi Sieniawskiej-Buccella została przygotowana pod opieką naukową Pani Prof. dr hab. n. med. Ewy Osuch-Wójcikiewicz z Katedry i Kliniki Otolaryngologii I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego jako Promotora. Praca jest napisana i opracowana w układzie typowym dla rozpraw doktorskich. Całość rozprawy obejmuje 106 stron maszynopisu i podzielona jest na 7 rozdziałów oraz dołączoną opinią Komisji Bioetycznej przy WUM oraz kilkanaście odpowiadających omawianym problemom naukowym podrozdziałów, które w sposób uporządkowany, z zachowaniem odpowiednich proporcji przedstawiają i omawiają przeprowadzone przez Doktorantkę badania. Praca zawiera 16 rycin i 14 tabel, przedstawiających zestawienie rezultatów przeprowadzonych doświadczeń i rozważań naukowych w formie wykresów pozwalających na zapoznanie się z uzyskanymi wynikami. W pracy zacytowano 221 pozycji piśmiennictwa polskiego i obcojęzycznego, z czego około 40% prac obejmuje publikacje odnoszące się do tematu badawczego z ostatnich 10 lat. Na podstawie sprawdzenia cytowań wrywkowo wybranych pozycji piśmiennictwa mogę przyjąć, że sposób przytaczania danych literaturowych jest poprawny. Praca napisana jest dobrą polszczyzną, a sposób formułowania zdań jest poprawny i zrozumiały. W ocenie rozprawy wskazać należy na konsekwentne i logiczne prezentowanie uzyskanych wyników badań, co czyni pracę przejrzystą i łatwą w czytaniu. Zwraca również uwagę, szczególnie we wstępie i dyskusji dysertacji, umiejętność z jaką Doktorantka porusza się wśród danych literaturowych dotyczących tak trudnej tematyki jaką jest biologia i genetyka nowotworów, patomechanizmów związanych z aktywnością cząsteczek miRNA i białek regulatorowych obróbki miRNA, występowania wariantów polimorficznych genów (SNP) oraz właściwa interpretacja wyników badań własnych i licznych opublikowanych wniosków innych autorów.

Tytuł pracy sformułowany jest krótko i jasno oraz w sposób właściwy opisuje zakres i rodzaj przeprowadzonych badań.

We Wstępie dysertacji Doktorantka w zwięzły sposób przedstawia epidemiologię raka krtani w Polsce i na świecie, etiopatogenezę oraz metody diagnostyki omawianej choroby nowotworowej. W kolejnym obszernym podrozdziale szeroko i szczegółowo omawia charakterystykę, biogenezę i funkcję regulatorową wybranych mikroRNA, oraz udział zjawiska polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) cząsteczek regulatorowych szlaku obróbki miRNA w procesie kancerogenezy. Dokładnie omawia konkretne przykłady mikroRNA w chorobach nowotworowych u człowieka oraz możliwość klinicznego wykorzystania wiedzy dotyczącej ekspresji wybranych miRNA w diagnostyce, terapii przeciwnowotworowej i prognozowaniu przebiegu choroby i czasu przeżycia u chorych

z rozpoznanymi guzami złośliwymi różnego pochodzenia. Charakteryzuje także szczegółowo elementy szlaku wewnątrzkomórkowej obróbki mikroRNA i funkcję regulacyjną genów kodujących/białek m.in. Drosha/DGCR8, Dicer/Ago/TRBP/PACT w oparciu o dane literaturowe.

W rozdziale drugim Doktorantka sformułowała cele badawcze pracy doktorskiej, które zostały określone jasno i rzeczowo.

Rozdział Materiał i Metody zawiera dokładny opis badanej grupy 48 pacjentów (dalej określonej jako grupa mikroRNA) oraz 135 chorych (dalej grupa SNP) leczonych w latach 2010-2013 w Klinice Otolaryngologii Wydziału Lekarskiego WUM z powodu potwierdzonego histopatologicznie raka płaskonabłonkowego krtani i poddanych chirurgicznemu usunięciu guza pierwotnego i regionalnych węzłów chłonnych szyi oraz w uzasadnionych przypadkach leczeniu uzupełniającemu (radio- i chemioterapia). Grupę kontrolną stanowiło 170 pacjentów poddanych mikrochirurgii krtani z powodu innych niż nowotwory złośliwe, hospitalizowanych także w Klinice Otolaryngologii WUM. Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (uchwała z dnia 23 marca 2010 roku). Autorka przedstawiła jasne kryteria *włączenia* chorych do grupy badanej. Dodanie do przyjętych kryteriów informacji dotyczącej braku przeszłości onkologicznej i zastosowania wcześniej leczenia onkologicznego u chorych z grupy badanej uzasadnia zrezygnowanie z umieszczenia w tekście kryteriów *wyłączenia*, które w tej sytuacji wydają się zbędne. Rozdział zawiera także dokładne omówienie zastosowanych metod i narzędzi badawczych, jak też odpowiednio dobranych metodach analizy statystycznej, które nie budzą zastrzeżeń. Zwraca uwagę zastosowanie szerokiego panelu analizowanych cząsteczek mikroRNA oraz genów kodujących białka obróbki miRNA w badaniach dotyczących występowania wariantów polimorficznych genów (polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, SNP). Zastosowanie nowoczesnych metod biologii molekularnej i genetyki oraz tak wielowymiarowy aspekt analizy wybranych biomarkerów stanowią o dużej wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej. Koniecznym wydaje się jednak zwrócenie uwagi oraz konieczność przedyskutowania liczebności relatywnie małych podgrup chorych dla zaproponowanych badań populacyjnych, jakimi niewątpliwie z natury są badania wariantów polimorficznych genów, szczególnie po uwzględnieniu podziału na podgrupy pT i pN i związku z tym wpływu na uzyskane wyniki i wnioski. Uzupełnienia wymaga także informacja dotycząca kryterium wyboru konkretnych polimorfizmów, a mianowicie czy podstawę stanowił przegląd piśmiennictwa dotyczącego poruszanego problemu, wcześniej przeprowadzone przez zespół wstępne badania czy informacja o wybranych SNP z ogólnodostępnej NCBI SNP database.

W kolejnej części dysertacji Doktorantka szczegółowo i w uporządkowany sposób omawia uzyskane Wyniki przeprowadzonych badań *ex vivo*, które przedstawia także w

formie wykresów i tabel. Kolejność prezentacji rezultatów jest przejrzysta, logiczna i stanowi odpowiedź na kolejno stawiane w pracy cele, zgodnie z założeniami rozprawy. Doktorantka w 9 podrozdziałach przedstawia ocenę ekspresji wybranych mikroRNA tj. miR-29a-3p, miR-202-3p, miR-548aa, miR-3713 i miR-4768-3p ocenionych w archiwalnych skrawkach parafinowych, w odniesieniu do ekspresji genu referencyjnego RNU6B w tej samej tkance. Na tym etapie badań rodzi się w sposób naturalny pytanie o analizę ekspresji badanych cząsteczek miRNA w tkance *nienowotworowej* jako układu kontrolnego, powszechnie analizowanego w literaturze, np. w preparatach całkowicie usuniętych krtani, w tkance pobranej z możliwie najbardziej odległego miejsca od nowotworowych zmian pierwotnych tj. z nabłonka krtani bez potwierdzonych ognisk *carcinoma* w przeprowadzonych badaniach patomorfologicznych. Myślę, że uzupełnienie ww. obserwacji przed publikacją wyników badań w czasopiśmie o randze międzynarodowej przyczyni się do przedstawienia bardziej miarodajnych i w pełni rzetelnych wniosków oraz pozwoli na podjęcie próby selekcji chorych z rzeczywiście zwiększonym ryzykiem raka krtani i tym samym klinicznego wykorzystania rezultatów badań w przyszłości. Propozycja uzupełnienia badań o proponowane analizy w żadnym jednak stopniu nie zmniejsza wartości merytorycznej Dysertacji, a stanowić może cenne źródło dodatkowych informacji w zakresie biologii raka krtani.

Doktorantka wykazała znamiennej korelację poziomu ekspresji określonych mikroRNA i stopniem zaawansowania raka krtani, wskazując na rolę miR-29a i miR-548aa jako onkomirów oraz miR-4768-3p jako supresora rozwoju choroby. Wykazała także istotny stopień zależności między poziomem ekspresji określonych mikroRNA tj. miR-202-3p, miR-548aa, miR-3713 i miR-4768-3p i czasem trwania nałogu palenia tytoniu w badanej grupie chorych. Przeprowadzona analiza statystyczna wskazała także na istotne korelacje występowania wariantów polimorficznych genów kodujących białka szlaku biosyntezy miRNA z ryzykiem rozwoju raka krtani oraz stopniem progresji miejscowej i węzłowej zmian. Wpływ SNP na wzrost ryzyka choroby nowotworowej dotyczył osobników z wariantami polimorficznymi rs 3742330 genu DICER1, rs13078 genu DICER1, rs784567 genu TARBP2 oraz rs11077 genu XPO5. Funkcja ochronna została dowiedziona dla SNP rs14035 genu RAN. Wpływ na stopień zaawansowania klinicznego zmian dotyczył wariantów polimorficznych genów: DGCR8 (rs417309), DICER1 (rs13078), TARBP2 (rs784567) oraz genu XPO5 (rs11077). Mam jedynie sugestię dotyczącą konieczności uzasadnienia w Dysertacji wyboru homozygot typu dzikiego jako układu genotypowego referencyjnego, a nie, jak to jest przyjęte w literaturze dotyczącej analizowania ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej, wyboru najczęściej w danej populacji występującego genotypu jako punktu odniesienia. Komentarza wymaga także odniesienie wyników do małej liczebności grup dla określonych genotypów, co w pewnym stopniu ogranicza możliwość wysuwania ostatecznie wiążących wniosków.

W przeprowadzonej w rozdziale 5 Dyskusji Doktorantka zestawiała i porównała wyniki przeprowadzonych badań z danymi z piśmiennictwa w sposób rzeczowy i konsekwentny. Rozważania i dyskusja naukowa została poparta rzetelnym przeglądem światowego piśmiennictwa z danej problematyki a Doktorantka zinterpretowana właściwie uzyskane rezultaty pracy w odniesieniu do wyników innych badaczy. Wykazała umiejętność krytycznej i wyważonej oceny swoich obserwacji oraz dobrej znajomości poruszanych, tak trudnych i złożonych zagadnień genetycznych. Na uwagę zasługuje fakt łatwego prowadzenia dyskusji pomimo tak dużej liczby publikacji dotyczących omawianego tematu i różnych, często odmiennych a nawet przeciwstawnych wniosków dotyczących określenia roli wybranych mikroRNA w różnych chorobach nowotworowych, co dowodzi wiedzy Doktorantki. Brak jednoznacznych wyników badań dla raków krtani w badanym zakresie, wskazuje na aktualny wymiar przeprowadzonych analiz. W ocenie porównawczej Doktorantka słusznie zauważa różnice w metodologii i materiale stosowanych w pracach innych badaczy, jako czynników będących przyczyną rozbieżności wyników i różnic w sumarycznej interpretacji wyników badań w raku płaskonabłonkowym krtani oraz w innych typach nowotworów. Wartość praktyczną przeprowadzonych przez Doktorantkę analiz potwierdza fakt wykorzystania łatwo dostępnego i nie wymagającego szczególnych procedur (jak ma to miejsce w przypadku zastosowania materiału świeżego tkankowego) archiwalnego materiału biologicznego od pacjentów (błoczki parafinowe), który pozwala na ocenę badanych parametrów w sposób niezbyt kosztochłonny.

Wnioski zawarte w rozdziale podsumowującym przeprowadzone analizy są zgodne z przyjętymi celami pracy oraz w sposób logiczny wynikają z przeprowadzonych badań. Przedstawione wnioski są oryginalnymi wnioskami Doktorantki sformułowanymi przejrzysto i precyzyjnie.

Przekazane bezpośrednio Doktorantce nieliczne uwagi stylistyczne i edytorskie mają wyłącznie charakter redakcyjny i nie mają wpływu na wysoką ocenę merytoryczną pracy.

Na podstawie dokonanej oceny całości pracy stwierdzam, że rozprawa doktorska **lek. Olgi Sieniawskiej-Buccella pt.: „ROLA mikroRNA W PATOGENEZIE I PROGNOZYSTYCIE RAKA KRTANI”** stanowi samodzielne rozwiązanie przez Doktorantkę problemu naukowego wskazując na jej dużą wiedzę teoretyczną i umiejętność krytycznej oceny porównawczej wyników pracy własnej. Oceniona przeze mnie rozprawa doktorska w pełni spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). W związku z powyższym mam zaszczyt i przyjemność przedłożyć Wysockiej Radzie I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek

o dopuszczenie Doktorantki lek. Olgi Sieniawskiej-Buccella do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Starska-Kowarska  
I Katedra i Klinika Otolaryngologii i Laryngologii Onkologicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi