

Prof. zw. dr hab. n. med. Janusz Klatka

Lublin, 5.02. 2019 r.

Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej

UM w Lublinie

## O C E N A

### **rozprawy doktorskiej lek. Olgi Sieniawskiej-Buccella pt. „Rola mikroRNA w patogenezie i prognostyce raka krtani”**

W roku 1874 John Erikson, szef słynnego Listera oświadczył : „chirurgia szybko zbliża się do osiągnięcia kresu perfekcji i doskonałości”. Od tego czasu upłynęło ponad 140 lat, które dość radykalnie zmieniły oblicze świata i stan nauki, w tym nauk medycznych. Stanęliśmy zwłaszcza w obliczu lawinowo narastającej zachorowalności na choroby nowotworowe coraz lepiej zdając sobie sprawę, że nie do chirurga należy ostateczne rozwiązanie problemu raka, bez względu na to, jak dalece postąpi rozwój technik operacyjnych. Pomimo rozwoju jaki dokonał się w leczeniu chirurgicznym raka krtani w ostatnim dwudziestoleciu, zwłaszcza w zakresie tzw. operacji zachowawczych i rekonstrukcyjnych, który doprowadził do poprawy wyników czynnościowych, nie uzyskano zwiększenia odsetka 5-letniego okresu przeżycia u leczonych chorych. Dotychczasowe kryteria oceny guza oraz choroby nowotworowej, oparte jedynie na klasyfikacji TNM i wynikach badań histopatologicznych, bez uwzględnienia cech związanych z jego biologią, wydają się być niewystarczające w prognozowaniu i wyborze optymalnego postępowania terapeutycznego.

Poznanie i właściwe wykorzystanie w praktyce klinicznej mechanizmów z zakresu immunologii, genetyki i biologii molekularnej, biorących udział w walce z nowotworem jest wiodącym tematem badawczym większości ośrodków naukowych na świecie.

Badania nad czynnikami mającymi wpływ na rozwój nowotworów w organizmie pozwoliły na ustalenie m.in., że mikroRNA są zaangażowane w kontrolę ekspresji genów kluczowych dla funkcji komórek, w tym za zróżnicowanie i kontrolę podziałów oraz apoptozę. Dane literaturowe wskazują m.in. na występowanie zależności między mikroRNA, a inicjacją i rozwojem nowotworów w obrębie głowy i szyi. Jednocześnie brak jest danych w piśmiennictwie dotyczących zależności między ekspresją mikroRNA a rozwojem raka krtani. Dlatego też podjęcie przez Doktorantkę badań nad rolą mikroRNA w patogenezie i prognostyce raka krtani, uważam za celowe i w pełni uzasadnione.

Praca doktorska lek. Olgi Sieniawskiej-Buccella liczy 105 stron tekstu, w tym 221 pozycji piśmiennictwa. Rozprawa ma układ typowy.

Doktorantka w 17-stronicowym wstępie przedstawiła szczegółowo i wyczerpująco aktualny stan wiedzy z zakresu epidemiologii raka krtani. W oparciu o najnowsze dane literaturowe przeanalizowała zachorowalność na raka krtani w Polsce w ciągu ostatniej dekady, uwzględniając płeć, wiek chorujących oraz umiejscowienie ogniska pierwotnego nowotworu. Szczegółowo omówiła czynniki ryzyka rozwoju raka. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka kompetentnie scharakteryzowała współczesne metody diagnostyki i leczenia raka krtani, co wskazuje na posiadaną przez nią bogatą wiedzę i doświadczenie w tym zakresie. W ostatnim podrozdziale Wstępu Doktorantka charakteryzuje mikroRNA. Opisuje zaangażowanie mikroRNA w kontrolę ekspresji genów kluczowych dla funkcji komórek, w tym na różnicowanie i kontrolę podziałów oraz apoptozę. Wskazuje, że zmiany w profilu ekspresji mikroRNA mogą powodować nieprawidłowości w przebiegu wielu procesów chorobowych przyczyniając się m.in. do rozwoju nowotworów. Doktorantka szczegółowo charakteryzuje etapy biogenezy i funkcję regulacyjną mikroRNA. Opis tych procesów Doktorantka zilustrowała czytelną ryciną. Podrozdział dotyczący mikroRNA kończą informacje o roli tej cząsteczki w patogenezie chorób nowotworowych. Doktorantka podkreśla, że analiza wyników dotychczas przeprowadzonych badań pozwala przypuszczać, że w przyszłości będzie możliwe wykorzystanie mikroRNA w diagnostyce, terapii i prognostyce onkologicznej.

Podsumowując ocenę tej części pracy stwierdzam, że we Wstępie przejrzysto i wyczerpująco zostały przedstawione współczesne metody diagnozowania i leczenia raka krtani. Doktorantka wykazała się znajomością aktualnych poglądów na temat roli mikroRNA w procesie kancerogenezy. W sposób jasny i przekonujący opisuje możliwości zastosowania mikroRNA w diagnostyce, terapii i prognostyce onkologicznej. Świadczy to o doskonałej orientacji Doktorantki w opracowywanym temacie. Wszystkie dane zostały poparte licznymi cytowaniami.

W dalszej części Autorka jasno precyzuje cele swoich badań, zestawiając je w dwóch czytelnych punktach, które są konsekwentnie realizowane w dalszej części badań.

Autorka postanowiła:

1. Ocenić związek między poziomem ekspresji wybranych mikroRNA (miR-29a-3p, miR-202-3p, miR-548aa, miR-3713 i miR-4768-3p) a:

- stopniem zaawansowania klinicznego raka krtani (TNM),

- paleniem tytoniu.

2. Ocenic związek między występowaniem wariantów polimorficznych genów (SNP) (DROSHA rs6877842, DICER1 rs3742330, DICER1 rs13078, DGCR8 rs1640299, DGCR8 rs3757, DGCR8 rs417309, RAN rs14035, TARBP2 rs784567, XPO5 rs11077) kodujących białka szlaku obróbki mikroRNA a:

- stopniem zaawansowania klinicznego raka krtani wg klasyfikacji pTNM,
- stopniem zaawansowania choroby nowotworowej,
- paleniem tytoniu.

U 48 pacjentów przeprowadzono analizę poziomu ekspresji mikroRNA a u 135 pacjentów analizę występowania wariantów polimorficznych genów (SNP) kodujących białka szlaku obróbki mikroRNA. Grupę kontrolną stanowiło 170 pacjentów, dobranych pod względem płci i wieku do grupy badanej.

Materiał do badań molekularnych obejmował utrwalone w bloczkach parafinowych tkanki pochodzące z guza krtani, pobrane od pacjentów podczas zabiegu operacyjnego. Badania obejmowały ocenę poziomu ekspresji wybranych mikroRNA (miR-29a-3p, miR-202-3p, miR-548aa, miR-3713 i miR-4768-3p). Stosowano analizę ilościową produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym (reakcja real-time RT-PCR). Dla ustalenia występowania wariantów polimorficznych genów (SNP): DROSHA, DICER1, DGCR8, RAN, TARBP2 i XPO5 kodujących białka szlaku obróbki mikroRNA prowadzono genotypowanie w celu oznaczenia SNP (TaqMan® SNP Genotyping Assays - Applied Biosystems).

Przeprowadzone badania wykazały, że określone poziomy ekspresji miR-29a i miR-548aa cechuje dodatnia korelacja zarówno ze stopniem zaawansowania miejscowego raka płaskonabłonkowego krtani jak również z występującymi przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych. Ekspresja miR-4768-3p była natomiast ujemnie skorelowana z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych. Stwierdzono ponadto, że ekspozycja na dym tytoniowy zmienia stopień ekspresji badanych mikroRNA w raku płaskonabłonkowym krtani. Ustalono, że poziom ekspresji miR-202-3p był znacznie zwiększony u pacjentów palących w porównaniu z pacjentami niepalącymi. Natomiast stopień ekspresji 4768-3p, miR-548aa i miR-3713 ulega znacznemu obniżeniu.

Analiza wyników badań w zakresie charakteryzacji wariantów polimorficznych genów kodujących białka szlaku biosyntezy mikroRNA w raku płaskonabłonkowym krtani, pozwoliła stwierdzić, że częstotliwość występowania polimorficznych wariantów GT i TT

genu XPO5 była większa u pacjentów z rakiem krtani w porównaniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono również, że częstotliwość występowania heterozygoty CT genu RAN jest większa w grupie kontrolnej niż u pacjentów z rakiem krtani. Wykazano zależność obecności z większym ryzykiem rozwoju raka płaskonabłonkowego krtani.

W dyskusji Doktorantka umiejętnie porównuje wyniki własne do uzyskanych przez innych autorów. Wykazuje się dużą wiedzą, logicznie próbuje interpretować uzyskane wyniki, odbiegające czasami od wyników przedstawianych w innych pracach. W dyskusji, jak i w pozostałych częściach pracy, wykorzystuje i cytuje 221 pozycji piśmiennictwa, przeważnie anglojęzycznego.

Całość pracy kończy się sześcioma wnioskami, znajdującymi swoje uzasadnienie w uzyskanych wynikach. Wnioski, stanowiące podsumowanie przeprowadzonych badań sformułowane są ostrożnie, co świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Po szczegółowym zapoznaniu się z każdą rozprawą doktorską przedstawianą mi do recenzji, zazwyczaj nasuwają mi się pewne uwagi krytyczne, które w związku z przysługującym mi prawem wskazuję w podsumowaniu recenzji. Z przyjemnością stwierdzam, że po lekturze tej pracy takich uwag nie mam.

Reasumując, w oparciu o przeprowadzone badania oraz wyniki uzyskane przy zastosowaniu nowoczesnych i wiarygodnych metod, głęboką wiedzę Autorki, jej samodzielność i swobodę poruszania się w temacie będącym przedmiotem badań, uważam, że omawiana rozprawa spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 poz 882 z późn. zmi.) i na tej podstawie mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie I Wydziału Lekarskiego WUM wnioski o dopuszczenie lek. Olgi Sieniawskiej - Buccella do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jestem głęboko przekonany, że przedstawioną mi do recenzji pracę można uznać za wyróżniającą się.

Kierownik Katedry i Kliniki  
Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

*Prof. dr hab. n. med. Jolanta Kluczyńska*

