

Akceptuję  
[Signature]  
Szczecin, 04.11.22

Dr hab. med. Ewa Jaworowska

Klinika Otolaryngologii Dorosłych i Dzieci

i Onkologii Laryngologicznej PUM w Szczecinie

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. med. Katarzyny Baranowskiej - Kempisty

**pt.: Ocena ekspresji markera komórek macierzystych TAZ w raku płaskonabłonkowym krtani**

promotor: prof. dr hab. n. med. Kazimierz Niemczyk

promotor pomocniczy: dr n. med. Wojciech Domka

Katedra i Klinika Otorinolaryngologii, Chirurgii Głowy i Szyi Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Klinice Otorinolaryngologii, Otorinolaryngologii Dziecięcej i Onkologii Laryngologicznej Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 1w Rzeszowie

Rak krtani należy do najczęściej występujących nowotworów głowy i szyi. Mimo postępu w zakresie diagnostyki i leczenia rak krtani, jaki dokonał się w ostatnich dekadach obecnego stulecia, nie obserwuje się znaczącej poprawy wyników leczenia tego nowotworu. Dane literaturowe i własne obserwacje wskazują, że standardowe metody leczenia takie jak chirurgia i radioterapia przynoszą dobre wyniki u chorych głównie we wczesnych stadiach zaawansowania klinicznego raka. Niestety, u większości chorych w zaawansowanych stadiach są nadal niezadawalające a stosowana terapia obarczona jest dużym ryzykiem działań niepożądanych. Dlatego też nową jakością w onkologii ostatnich lat stała się immunoterapia. Metoda ta jednak okazała się być najbardziej skuteczną w przypadkach nawrotów lub przerzutów odległych, które są odporne na standardowe leczenie. Immunoterapia zakłada uzyskanie odpowiedzi układu odpornościowego organizmu po zastosowaniu np. przeciwciał monoklonalnych i rozpoznaniu komórek nowotworowych jako „obce” oraz niszczeniu ich przez układ immunologiczny. Najbardziej znanym przeciwciałem jest Nivolumab oraz Pembroliumab, który łączy się z receptorem programowej śmierci i blokuje jego oddziaływanie z ligandem PDL-1. Leki te nie są jednak specyficzne dla raka krtani, a stosowane są w leczeniu innych nowotworów.

Wiadomo, że występowanie raka krtani uwarunkowane jest środowiskowo i związane jest przede wszystkim z intensywnym paleniem papierosów i nadużywaniem wysokoprocentowych napojów alkoholowych. Jednocześnie wiadomo, że nowotwory te występują tylko u części osób prowadzących taki styl życia, z drugiej zaś strony stwierdza się je również u ludzi o niskiej ekspozycji na kancerogeny, co bez wątplenia wskazuje na udział czynnika genetycznego w etiologii raka krtani.

Mimo postępów współczesnej biologii molekularnej rak krtani nadal pozostaje stosunkowo słabo określonym nowotworem z punktu widzenia genetyki a przebieg kliniczny trudny do przewidzenia wyłącznie na podstawie kryteriów kliniczno-histopatologicznych bez znanych markerów molekularnych.

Ostatnio, pewne nadzieje w tym zakresie wiąże się z rozwojem badań nad znaczeniem miRNA w patogenezie nowotworów głowy i szyi. Zaburzenia na każdym poziomie dojrzewania miRNA oraz zmiany ekspresji mogą mieć wpływ na kancerogenezę, mogą być związane ze stadium rozwoju nowotworu a także paleniem tytoniu. Daje to nowe możliwości w poszukiwaniu biomarkerów raka krtani, co w przyszłości może posłużyć do diagnozowania i monitorowania, a także implikować terapię spersonalizowaną.

Poszukiwanie biomarkerów raka krtani jest wciąż wyzwaniem dla laryngologów, genetyków, onkologów. Badania prowadzone przez lek. med. Katarzynę Baranowską - Kempistę i przedstawione w dysertacji wpisują się w ten nurt badań. Doktorantka podjęła bowiem ambitną próbę odpowiedzi na pytanie czy białko TAZ może być takim biomarkerem w raku krtani.

Dane literaturowe wskazują, że wykryte w 2000 roku białko TAZ uczestniczy w homeostazie komórek organizmu a wspólnie z białkiem YAP uczestniczą w szlaku sygnałowym Hippo odpowiadającym za proliferację, odnawianie, różnicowanie, przeżycie oraz apoptozę komórki. Pod wpływem rozregulowania działania TAZ może więc dochodzić do rozwoju wielu chorób takich jak np. włóknienie narządów, schorzeń z autoagresji oraz nowotworów. Dotychczas udowodniono, występowanie zwiększonej ekspresji białka TAZ między innymi w komórkach raka płuca, jamy ustnej, tarczycy oraz krtani oraz innych narządów.

Co istotne, w literaturze polskiej dotyczącej omawianego tematu można znaleźć jedynie nieliczne prace dotyczące znaczenia białka TAZ w niektórych nowotworach, natomiast brak jest publikacji naukowych poruszających badany problem w raku krtani.

Z powyższych powodów temat rozprawy wybrany przez Doktorantkę uważam za niezmiernie ważny, ciekawy i zarazem nowatorski.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja liczy 117 stron maszynopisu i zredagowana jest w typowym układzie przyjętym dla prac doktorskich. Praca napisana jest starannie z użyciem

poprawnej polszczyzny, posiada czytelną oprawę graficzną (zawiera 39 tabel, 27 rycin), ułatwiającą zapoznanie się z zawartością pracy.

**Tytuł** pracy doktorskiej sformułowany został w sposób zrozumiały. Rozprawę rozpoczynają słowa kluczowe w języku polskim i angielskim a następnie **Spis treści**, po którym kolejno następują: spis rycin oraz tabel, wykaz stosowanych skrótów, co w dużej mierze ułatwia lekturę całości pracy oraz streszczenie.

**W streszczeniu** w języku polskim i angielskim Doktorantka zawarła podsumowanie zagadnień omawianych w rozprawie oraz wnioski z przeprowadzonych badań. Są one jasno, poprawnie sformułowane i w pełni uzasadnione.

Kolejnym rozdziałem pracy jest liczący 46 stron **Wstęp**, na który składają się usystematyzowane logicznie cztery podrozdziały. W pierwszym z nich autorka wprowadza czytelnika w zagadnienia epidemiologii i etiologii raka krtani. Następnie przedstawia kliniczną i histopatologiczną charakterystykę wraz z oceną stopnia zaawansowania, metody diagnostyczne i terapeutyczne raka krtani. Kolejne trzy podrozdziały poświęcone są białku TAZ. Drugi podrozdział to - TAZ w warunkach fizjologicznych, trzeci - znaczenie TAZ w patomechanizmie różnych chorób. Rozdział zamyka podrozdział -TAZ w nowotworach. Zakres przedstawionych we wstępie wiadomości jest bardzo szeroki i dobrze świadczy o wiedzy Doktorantki oraz umiejętności logicznego i syntetycznego przedstawiania różnych wiadomości.

**Założenia i cel** pracy został przedstawiony w jasny i precyzyjny sposób. Jako główny cel autorka postawiła pogłębienie wiedzy na temat roli białka TAZ w patomechanizmie regulatorowym odpowiedzialnym za powstanie i progresję płaskonabłonkowego raka krtani. Cele szczegółowe obejmowały następujące zagadnienia:

1. Ocenę korelacji ekspresji białka TAZ w raku płaskonabłonkowym krtani w porównaniu ze zmianami nierakowymi w krtani.
2. Ocenę korelacji ekspresji białka TAZ ze stopniem zaawansowania raka krtani.
3. Ocenę korelacji ekspresji białka TAZ u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani o etiologii związanej i niezwiązanej z HPV.

Trzeba przyznać, że tak sprecyzowane cele są ambitne i wskazują na dążenie do uzyskania praktycznych wniosków.

**Materiał i metody** zostały omówione na czterech kolejnych stronach. W rozdziale tym zawarta jest charakterystyka grupy badanej i grupy kontrolnej, metodyka wykonywanych badań z oceną patomorfologiczną oraz analiza statystyczna. Na przeprowadzenie badań Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie (7/B/2019), która została załączona na końcu pracy.

Do grupy badanej zakwalifikowano 42 pacjentów z potwierdzonym histopatologicznie rakiem krtani. Określona została lokalizacja zmiany, zaawansowanie TNM, typ histopatologiczny, stopień zróżnicowania guza G (grading) oraz ekspresja białka p16. Uwzględniono również czynniki ryzyka takie jak palenie papierosów, alkohol, schorzenia współistniejące oraz z nimi związane stosowanie leków, wystąpienie wznowy miejscowej oraz zgon.

Grupę kontrolną stanowiło 40 pacjentów ze zmianami nierakowymi potwierdzonymi badaniem histopatologicznym. Brano pod uwagę lokalizację i rodzaj zmiany a także występowanie schorzeń przewlekłych oraz stosowanie leków ACE-inhibitorów, beta-blokerów, metforminy oraz statyn.

Zarówno pacjenci w grupie badanej jak i kontrolnej wolni byli od schorzeń autimmunizacyjnych a także nie przebyli radioterapii z powodu nowotworów głowy i szyi. Trzeba przyznać, że metodyka bardzo rozbudowana, pracowita ale pozwalająca na zgromadzenie dużej liczby danych do analiz.

Materiał do badań stanowiły preparaty histopatologiczne wykonane z tkanek pobranych podczas zabiegu operacyjnego mikrochirurgii krtani lub laryngektomii (gr. badana). Preparaty raka krtani zostały poddane barwieniu immunohistochemicznego z oceną ekspresji białka p16. Następnie wykonano barwienie immunohistochemiczne z wykorzystaniem białka TAZ we wszystkich preparatach. Preparaty z grupy badanej i kontrolnej zostały ocenione przez histopatologa. Oceniano oddzielnie ekspresję jądrową i cytoplazmatyczną.

W ostatniej części tego rozdziału Doktorantka zaprezentowała metody statystyczne zastosowane do realizacji projektu badawczego. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu Statistica v.13.0 (StatSoft). Do zbierania danych oraz wspomaganie analiz statystycznych zastosowano program MS Excel 2010 (Microsoft).

Kolejnym rozdziałem są **Wyniki**, które zaprezentowano na 24 stronach w postaci 22 rycin i 30 tabel i 1 wykresu. Sposób przedstawienia wyników tak niezwykle szerokiego materiału jest zadawalający i czytelny a krótkie komentarze pisemne stanowią cenny dodatek do wspomnianych form prezentacji danych.

W wyniku przeprowadzonych badań, Doktorantka wykazała istotnie statystyczną zależność pomiędzy poziomem ekspresji białka TAZ, zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórkowym, a występowaniem raka płaskonabłonkowego krtani. Stwierdziła ponadto korelację ekspresji jądrowej TAZ ze stopniem zróżnicowania histopatologicznego raka krtani oraz korelację ekspresji cytoplazmatycznej z wielkością guz nowotworowego. Nie wykazała natomiast istotności statystycznej pomiędzy występowaniem białka p16 a ilością TAZ. Ponadto ustaliła, że ilość białka TAZ jest zmniejszona u pacjentów z rakiem krtani przyjmujących statyny.

Bardzo mocną i niezwykle interesującą częścią pracy jest **Dyskusja**, w której Autorka zestawiała i skonfrontowała własne wyniki badań z danymi z piśmiennictwa w sposób

rzeczowy i konkretny. Rozważania i dyskusja naukowa została poparta rzetelnym przeglądem najnowszego piśmiennictwa światowego z ostatnich lat z zakresu omawianej tematyki. Z powodu nielicznych publikacji dotyczących roli białka TAZ w raku krtani Autorka większość wyników własnych konfrontowała z wynikami badań dotyczącymi roli TAZ w innych nowotworach. Doktorantka wykazała się nie tylko doskonałą znajomością zagadnienia ale również, co warto podkreślić, umiejętnością krytycznej i wyważonej oceny własnych obserwacji.

Bardzo bogata bibliografia w liczbie 171 pozycji w przeważającej liczbie anglojęzyczna wskazuje na staranne zapoznanie się z dotychczasowymi osiągnięciami w tym zakresie.

**Wnioski** są naturalną konsekwencją przeprowadzonej analizy wyników i stanowią odpowiedź na postawione w celu pracy pytania, bardzo ważne z punktu widzenia klinicysty, być może do wykorzystania w przyszłości w praktyce. Odnosi się to między innymi do 4. wniosku, w którym wykazała zmniejszenie ekspresji białka TAZ u pacjentów rakiem krtani przyjmujących statyny, co może być przesłanką do wyznaczenia nowych kierunków badań nad lekami w terapii nowotworowej. W ostatnim wniosku Autorka słusznie zauważa, że dalsze prace nad ekspresją TAZ, zwłaszcza na większej liczbie przypadków, są konieczne do ustalenia praktycznego zastosowania badań tego białka, jako tkankowego markera wpływającego na przebieg i rokowanie w raku krtani.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na drobne błędy i niedociągnięcia:

1. w części dotyczącej leczenia chirurgicznego str. 33 znalazły się powtórzenia -laryngektomia nadpierzścieniowa z następową CHP wg Labayle'a i nadpierzścieniowa z następową CHEP wg Mayera-Piqueta,
2. na stronie 63 podano, że do grupy kontrolnej zakwalifikowano 40 a nie 42 jak wynika z dalsze części pracy
3. nie zauważyłam w tekście odwołania do ryciny 5 na stronie 66

Powyższe uwagi nie umniejszają bardzo wysokiej oceny wartości pracy i uzyskanych wyników. Praca Doktorantki stanowi ambitną próbę pogłębienia wiedzy na temat roli białka TAZ w patomechanizmie regulatorowym odpowiedzialnym za powstanie i progresję raka płaskonabłonkowego krtani i co warto podkreślić, być może możliwość zastosowania wyników w praktyce klinicznej w przyszłości.

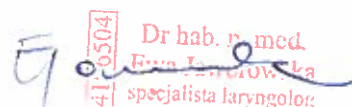
W **Podsumowaniu** stwierdzam, iż przedłożona mi do oceny praca doktorska lek. med. Katarzyny Baranowskiej-Kempisty została właściwie zaplanowana, konsekwentnie realizowana i ostatecznie wzorowo wykonana. Ponadto, w swojej dysertacji Autorka porusza wciąż aktualne, niezwykle istotne z punktu widzenia poprawy wyników leczenia raka krtani zagadnienia. Należy podkreślić, że przedstawione w rozprawie badania mają charakter nowatorski i pionierski przede wszystkim w piśmiennictwie polskim.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji, „ Rozprawa doktorska autorstwa lek. med. Katarzyny Baranowskiej - Kempisty spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. 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 art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce ( Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.)”.

Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Warszawie o dopuszczenie lek. med. Katarzyny Baranowskiej - Kempisty do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wysokie walory poznawcze i w przyszłości aplikacyjne ocenianej pracy doktorskiej wnoszę o wyróżnienie summa cum laude, jeśli zostały spełnione wszystkie z obowiązujących warunków stawianych przez Radę Dyscypliny Nauk Medycznych WUM.

Jednocześnie jako recenzent proponuję zgłoszenie rozprawy do Narody im. Prof. Jana Miodońskiego – najwyższej nagrody naukowej Polskiego Towarzystwa Otorynolaryngologów Chirurgów Głowy i Szyi, zgodnie z Regulaminem tej Nagrody.

Z poważaniem

  
41.0504 Dr hab. n. med.  
Ewa Jaworowska  
specjalista laryngolog

Dr hab. n. med. Ewa Jaworowska