Załącznik nr 2

Zakład Patologii

Katedra Onkologii

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Dr n.med. Dorota Jesionek-Kupnicka

AUTOREFERAT

Łódź 2019

Łódź dn. 08.03.2019

AUTOREFERAT W JĘZYKU POLSKIM

1. Imię i Nazwisko: Dorota Jesionek-Kupnicka

2. Posiadane dyplomy stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej

- 1988 - Dyplom lekarza na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej (obecnie Uniwersytet Medyczny w Łodzi)
- 1992 - I stopień specjalizacji z patomorfologii
- 1996 - II stopień specjalizacji z patomorfologii
- 1994 - Praca doktorska na Akademii Medycznej w Łodzi. Tytuł: "Histoklinika stwardnienia guzkowego (NS) ziarnicy złośliwej z uwzględnieniem cech immunofenotypowych komórek Reed-Sternberga i Hodgkina"

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

- 1992 - 2007 - asystent w Zakładzie Patologii, Katedra Onkologii UMED Łódź
- 2007-2016 - adiunkt w Zakładzie Patologii, Katedra Onkologii UMED Łódź
- 2016- do teraz -starszy wykładowca, koordynator dydaktyczny w Zakładzie Patologii, Katedra Onkologii UMED Łódź
- 2005-do teraz - Zakład Patomorfologii SYNEVO Łódź, przy Szpitalu im. Kopernika w Łodzi-asystent i koordynator Pracowni Immunohistochemii
- 2018- Kierownik Zakładu Patomorfologii Synevo przy Szpitalu im. Kopernika w Łodzi

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowo/artystycznego:

Charakterystyka wybranych zaburzeń molekularnych w glejaku wielopostaciowym ze szczególnym uwzględnieniem genów MGMT i TP53.

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania

Cykl 4 oryginalnych publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach z listy JCR (zagranicznych i polskich). Łączny współczynnik Impact Factor (IF) wyniósł 6.768, MNiSW 85 (z roku publikacji). Przedstawione przeze mnie prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych:

1. **Jesionek-Kupnicka D,** Braun M, Trąbska-Kluch B, Czech J, Szybka M, Szymańska B, Kulczycka-Wojdala D, Bieńkowski M, Kordek R, Zawlik I. MiR-21, miR-34a, miR-125b, miR-181d and miR-648 levels inversely correlate with *MGMT* and *TP53* expression in primary glioblastoma patients. Archives of Medical Science 2017; *https://doi.org/10.5114/aoms.2017.69374*. (IF -2,344; MNiSW-30).
2. **Jesionek-Kupnicka D,** Szybka M, Małachowska B, Fendler W, Potemski P, Piaskowski S, Jaskólski D, Papierz W, Skowroński W, Och W, Kordek R, Zawlik I. *TP53* promoter methylation in primary glioblastoma: relationship with *TP53* mRNA and protein expression and mutation status. DNA Cell. Biol. 2014;33(4): 217-226. (IF-2.055; MNiSW-20).
3. **Jesionek-Kupnicka D,** Szybka M, Potemski P, Kulczycka-Wojdala D, Jaskólski D, Bieńkowski M, Skowroński W, Papierz W, Kordek R, Zawlik I. Association of loss of heterozygosity with shorter survival in primary glioblastoma patients. Pol. J. Pathol. 2013; 64(4):268-275. (IF- 0.832; MNiSW - 15).
4. Jesień-Lewandowicz E*, **Jesionek-Kupnicka D***, Zawlik I*, Szybka M, Kulczycka-Wojdala D, Liberski PP, Kordek R. High incidence of *MGMT* promoter methylation in primary glioblastomas without correlation with *TP53* gene mutations. Cancer Genet. Cytogenet. 2009;188(2):77-82. (IF -1.537; MNiSW-20). (*równy udział w pracy)

c) **omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy**/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Od początku mojej pracy badawczej po doktoracie, jednym z głównych wątków badań jest neuropatologia w zakresie zagadnień dotyczących diagnostyki guzów mózgu, w tym diagnostyki histopatologicznej, ultrastruktury i badań molekularnych oraz apoptozy w chorobach neurodegeneracyjnych. W ramach Katedry Onkologii nawiązałam współpracę z Zakładem Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Zakładem Biologii Molekularnej i Kancerogenezy Uniwersytetu Medycznego (UMED) w Łodzi oraz z oddziałami neurochirurgii (Kliniką Neurochirurgii Szpitala im. Barlickiego UMED w Łodzi, z Oddziałem Neurochirurgii Dziecięcej ICZMP w Łodzi oraz Oddziałami Neurochirurgii im. Kopernika w Łodzi, Olsztynie i w Kaliszu). We współpracy interdyscyplinarnej powstał cykl prac oryginalnych, w których w 7 jestem pierwszym (w tym w jednej równorzędnym pierwszym autorem) i w pozostałych 9 współautorem. Prace oryginalne są opublikowane w czasopismach z listy JCR o łącznym IF-19,973 MNiSW-193 (po wyłączeniu prac do cyklu). Ponadto jestem pierwszym autorem w 6 i współautorem w 3 pracach kazuistycznych dotyczących guzów mózgu oraz rzadkiej choroby Krabbego. Prace kazuistyczne (oprócz jednej) są opublikowane w czasopismach z listy JCR o łącznym IF 5,317; MNiSW-119 (wykaz publikacji w załączniku nr 4). Praca dotycząca

rzadkiego pierwotnego chłoniaka OUN z komórek brzeżnych (*ang.* MZL, marginal zone lymphoma) odzwierciedla połączenie moich zainteresowań z zakresu neuropatologii oraz nowotworów układu chłonnego, które są moją kolejną pasją diagnostyczno-naukową [Jesionek-Kupnicka D *i wsp.* Clin. Neuropathology 2013].

Jako osiągnięcie naukowe przedstawiam cykl 4 prac dotyczących **charakterystyki molekularnej glejaka wielopostaciowego (*ang.* GB, *glioblastoma*) WHO GIV** w kontekście asocjacji z rutynowo stosowanymi czynnikami prognostycznymi i przeżyciem pacjentów.

Glejak wielopostaciowy WHO GIV jest najczęstszym pierwotnym nowotworem OUN i stanowi 12–15% wszystkich guzów mózgu, częstość występowania w USA szacuje się 3,19 na 100 000 [Ostrom 2014]. Nowotwór charakteryzuje się intensywną proliferacją i skłonnością do nawrotów oraz jest nieuchronnie śmiertelny w krótkim czasie po diagnozie, pomimo intensywnego skojarzonego leczenia. Obecny standard leczenia tzw. "protokół Stuppa", polega na resekcji chirurgicznej guza w możliwie jak najszerszym, bezpiecznym zakresie a następnie radioterapii ze współistniejącą i uzupełniającą chemioterapią temozolomidem (TMZ), co pozwala na uzyskanie mediany przeżycia około 15 miesięcy [Stupp R *i wsp.*, 2005, 2009]. Mimo badań licznych markerów molekularnych dotyczących zarówno klasyfikacji diagnostycznej, stratyfikacji prognostycznej i predykcyjnej określającej przewidywanie odpowiedzi na terapię u pacjentów z glejakami, znaczenie prognostyczne markerów molekularnych w GB jest nadal kontrowersyjne, w przeciwieństwie do lepiej poznanych markerów w glejakach o niższym stopniu złośliwości WHO GII i GIII [Eckel-Passow JE i *wsp.*, 2015].

Celem przedstawionego cyklu publikacji było określenie zaburzeń epigenetycznych statusu metylacyjnego promotorów *TP53* i *MGMT* (za pomocą analizy MSP (*ang.* Methylation-Specific PCR) oraz ekspresji *TP53 i MGMT* na poziomie transkrypcyjnym (ekspresja mRNA określona metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy DNA (*ang.* qPCR, quantitative polymerase chain reaction) i na poziomie translacyjnym (ocena immunohistochemiczna ekspresji białka) w pierwotnym glejaku wielopostaciowym. Przeprowadziliśmy również analizę mutacji *TP53* i *IDH1* (metodą sekwencjonowania Sangera), amplifikacji genu receptora naskórkowego czynnika wzrostu *EGFR* (*ang.* epidermal growth factor receptor) (metodą multiplex PCR), ocenę utraty heterozygotyczności (*ang.* LOH, loss of heterozygosity) 1p, 19q, 9p, 10q, 13q, 17p i kodelecji 1p/19q (metodą PCR); kolejnym celem było określenie wpływu wyselekcjonowanych microRNA na regulację ekspresji *TP53* (*miR-21, miR-34a, miR-125b*) i *MGMT* (*miR-648 i miR-181d*). Analizowaliśmy również powiązanie analizowanych zaburzeń molekularnych z czasem przeżycia pacjentów z pierwotnym glejakiem wielopostaciowym.

Badania dotyczące glejaka wielopostaciowego przeprowadziliśmy z wykorzystaniem tkanek guzów mózgu w materiale pooperacyjnym w tkankach mrożonych oraz utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (*ang.* FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded) na grupie 32 pacjentów

zdiagnozowanych w latach 2001-2003 [praca 4], na grupie 42 pacjentów zdiagnozowanych w latach 2002-2005 [prace 2,3] (w tej grupie badania LOH przeprowadziliśmy również z krwi pacjentów), oraz na grupie 49 pacjentów zdiagnozowanych w latach 2006-2011 [praca 1].

Według klasycznego modelu kancerogenezy, większość przypadków glioblastoma WHO GIV stanowią pierwotne nowotwory, powstające *de novo* z komórek prekursorowych gleju, pozostałe rzadsze wtórne glioblastoma powstają wskutek progresji glejaków o niższym stopniu złośliwości WHO GII oraz WHO GIII [Ohgaki H *i wsp.,* 2004; Ohgaki H i Kleihus P 2009, 2013]. W pierwotnym GB, najczęstszymi zmianami molekularnymi są LOH 10q (ponad 70%), amplifikacja *EGFR* (około 40%), amplifikacja *MDM2,* LOH 10p i 10q, oraz mutacja *p16INK4a* i *PTEN*. We wtórnym GB, pierwszym wspólnym zdarzeniem molekularnym w wieloetapowej kancerogenezie jest mutacja *IDH1, TP53* oraz LOH 17p, 10q i 19q [Ohgaki H *i wsp.,* 2004, Ohgaki H i Kleihus, 2009].

Gen supresorowy *TP53* zlokalizowany na chromosomie 17p13.1, odgrywa kluczową rolę w cyklu komórkowym, odpowiedzi komórkowej na uszkodzenie DNA, śmierci komórki i jej różnicowaniu. W glioblastoma mutacje *TP53* są mutacjami zmiany sensu (*ang.* missense mutations), częściej występują w GB wtórnym (56-67%) i wydają się być wczesnym zdarzeniem związanym ze złośliwą transformacją w szlaku progresji do wtórnego GB. W pierwotnym GB mutacje *TP53* są wykazywane w 28% do 38% [Ohgaki H i Kleihus P 2005, McLendon R *i wsp.,* 2008]. W pierwotnym GB, mutacje punktowe *TP53* są równomiernie rozłożone w eksonach 5-8 (mutacje hot-spots), podczas gdy we wtórnym GB najczęstszym punktem mutacji jest kodon 248 i 273 (ekson 7 i 8) i mutacje G: C / A: T w miejscach CpG (cytozyna-fosfo-guanina, region metylacji). Wykazano, że mutacja w kodonie 175 była związana z krótszym czasem przeżycia pacjentów [Ohgaki *i wsp.,* 2004]. Zgodnie z tym modelem, pierwotny glejak wielopostaciowy charakteryzuje się oprócz rzadszej mutacji *TP53* , wysoką częstością amplifikacji *EGFR* (około 40%) i niską częstotliwością mutacji *IDH1* (<5%) [Ohgaki H i Kleihus P 2005, 2013; McLendon R *i wsp.*, 2008; Karsy M i *wsp.*, 2012].

W naszych badaniach zastosowaliśmy następujące kryteria dla kwalifikacji guza jako pierwotny GB: wywiad kliniczny trwający krócej niż 3 miesiące i cechy histopatologiczne GB z pierwszej biopsji bez żadnych dowodów na obecność gwiaździaków o niższym stopniu złośliwości WHO GII/GIII oraz skąpodrzewiaka [Watanabe K i *wsp.,* 1997]. Nowotwory z grup badanych spełniały następujące kryteria molekularne GB pierwotnych: częstość amplifikacji *EGFR* (38%), mutacji *IDH1* (2%) i mutacji *TP53* (26%) [praca 2,3], amplifikacji *EGFR* (22%), mutacji *TP53* (31%) w pracy [praca 4], częstość mutacji *TP53* (24%) oraz wszystkie mutacje *IDH1*-wildtype [praca 1]. Wszystkie mutacje *TP53* były mutacjami zmiany sensu i były równo rozłożone w eksonach 5, 6, 7, 8. Nie było różnicy w przeżyciu i wieku pacjentów w zależności od statusu mutacji *TP53* [praca 1,2,3].

Mutacja *IDH1/IDH2,* kodująca dehydrogenazę izocytrynianową została włączona do klasyfikacji WHO 2016 jako charakterystyczne zaburzenie (stempel molekularny) dla wtórnych GB, powstających wskutek progresji glejaków o niższym stopniu złośliwości WHO GII i GIII, w przeciwieństwie do pierwotnych GB, określonych jako *IDH*-wildtype (bez mutacji). *IDH1* jest zmutowany w 50-80% gwiaździaków, skąpodrzewiaków, oligoastrocytoma i wtórnych GB, z czego najczęstszą mutacją jest *IDH1* R132H (90%). Mutacja *IDH2* występuje jedynie w 3% glioblastoma [Koh J *i wsp.,* 2015; Von Deimling A i *wsp.*, 2011]. Obecnie według klasyfikacji WHO 2016 glejak wielopostaciowy dzieli się na 3 grupy: i) *IDH*-wildtype, co odpowiada zdefiniowanemu klinicznie, histologicznie i molekularnie pierwotnemu (*de novo*) GB, występującemu najczęściej u pacjentów po 55 roku życia (średnia 62 lata); ii) *IDH*-mutant , który odpowiada wtórnemu GB, powstającemu wskutek progresji glejaków o niższym stopniu złośliwości WHO GII i GIII, u młodszych pacjentów (średnia wieku 44 lata) oraz iii) glioblastoma, NOS (*ang.* NOS, not otherwise specified, nie określony inaczej), w przypadkach, w których status mutacji *IDH* nie został określony lub jest niejednoznaczny [Louis DN *i wsp.,* 2016]. Immunohistochemiczna ocena białka IDH1 R132H, może mieć zastosowanie w diagnostyce rutynowej glejaków, jako „ekwiwalent" określenia statusu mutacji. My również stosujemy tę metodykę w rutynowej diagnostyce guzów mózgu.

W badaniu z użyciem bazy danych The Cancer Genome Atlas (TCGA) wykazano, że pacjenci z GB z mutacją *IDH1* mieli lepsze przeżycie, ponadto wiek pacjentów, status *MGMT* oraz mutacja *IDH1* z fenotypem hipermetylacyjnym wysp CpG (*ang.* GCIMP, CpG island hypermethylator phenotype) (*IDH1*/G-CIMP) miały niezależne znaczenie prognostyczne w analizie wieloczynnikowej, jednakże dotyczy to tylko nielicznych (6%) pacjentów z GB [Brennan CW i *wsp.,* 2013; Ceccarelli, M *i wsp.,* 2016]. Stąd też ich ograniczone zastosowanie dla większości pacjentów z GB, co pozostawia niezaspokojoną potrzebę identyfikacji biomarkerów przewidujących przeżycie pacjentów.

Praca 4. Jesień-Lewandowicz E*, Jesionek-Kupnicka D*, Zawlik I*, Szybka M, Kulczycka-Wojdala D, Rieske P, Sieruta M, Jaskólski D, Och W, Skowroński W, Sikorska B, Potemski P, Papierz W, Liberski PP, Kordek R. High incidence of *MGMT* promoter methylation in primary glioblastomas without correlation with *TP53* gene mutations. Cancer Genet. Cytogenet. 2009;188(2):77-82. (* równy udział).

Celami badania były: i) ocena częstości metylacji promotora *MGMT*; ii) ocena związku metylacji *MGMT* z mutacjami *TP53;* iii) ocena związku metylacji promotora *MGMT* i mutacji *TP53* z przeżyciem u pacjentów z glioblastoma, którzy nie otrzymali chemioterapii.

Metylacja promotora genu *MGMT* jest jedynym do tej pory uznanym czynnikiem predykcyjnym dla GB, jest związana z lepszą odpowiedzią na leczenie adjuwantowe temozolomidem, pacjenci z

pozytywnym statusem metylacji *MGMT* w guzie mają dłuższą medianę całkowitego przeżycia do 23 miesięcy [Stupp R *i wsp.*, 2009].

Enzym O^6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) jest kluczowym enzymem naprawy DNA, który swoiście usuwa promutagenną grupę metyl/alkilową z pozycji O^6 guaniny poprzez przeniesienie go do miejsca akceptorowego cysteiny na białku i przywraca mu guaninę do jej normalnej formy bez powodowania pęknięć nici DNA [Pegg AE 2000]. Komórki z zaburzoną funkcją MGMT tracą zdolność do naprawy *O^6*-methyloguanine (O^6MeG) i są bardziej wrażliwe na mutagenne i cytotoksyczne działanie czynników alkilujących [Yarosh DB *i wsp.*, 1983]. Uszkodzona (nie naprawiona przez MGMT) *O^6*-methyloguanina (O^6MeG) może powodować abberacje chromosomalne, mutacje punktowe i transformację nowotworową. Komórki wykazujące aktywność MGMT (Mer^+ - methyl excision repair positive) wykazują oporność na działanie środków alkilujących i mniejszą częstość apoptozy w porównaniu z komórkami bez aktywności MGMT (Mer-) [Meikrantz W *i wsp.*, 1998; Kaina B *i wsp.*, 1997]. W glejakach z mutacją *TP53* apoptoza indukowana jest zarówno przez zmetylowaną guaninę w pozycji O^6 (O^6MeG) (poprzez aktywację mitochondrialną), jak i na drodze zależnej od Fas kontrolowanej przez *TP53* [Roos WP *i wsp.*, 2007]. Metylacja pozycji O^6-guaniny zwykle wynika z metylacji promotora *MGMT*, która powstaje w 45% do 72% GB [Hegi ME i wsp. 2005, Jesień-Lewandowicz E *i wsp, . 2009 [praca* 4), [13] Crinière E *i wsp.* 2007, Preusser M *i wsp.* 2011]. Rola metylacji *MGMT* w patogenezie GB została przeze mnie wraz ze współautorami opisana w rozdziale podręcznika [Zawlik I *i wsp.*, 2011].

Dlatego też ważnym etapem cyklu prac dotyczących GB było wdrożenie aplikacyjne badania metylacji *MGMT* jako czynnika predykcyjnego i określenie częstości jego występowania w materiale pooperacyjnym z guzów od pacjentów z glejakiem wielopostaciowym [praca 4]. W pracy tej określiliśmy status metylacji *MGMT* w grupie 32 pacjentów, a została ona wykryta u 72% pacjentów, natomiast w pracy 1. w grupie 49 pacjentów metylacja *MGMT* została wykryta u 39% pacjentów, co świadczy, zgodnie z piśmiennictwem, o dużej zmienności populacyjnej występowania metylacji *MGMT* w glioblastoma. Dodatkowo w naszej pracy metylacja promotora genu *MGMT* nie korelowała z częstością mutacji *TP53*. Co więcej nie wykazaliśmy znamiennie statystycznego związku z mutacjami z tranzycją G:C do A:T w regionie metylacji - zmianami opisywanymi w glejakach o niższym stopniu złośliwości. W grupie badanej mutacje *TP53* G:C/A:T wystąpiły u 26% (6/23) pacjentów z metylacją *MGMT* i w 11% (1/9) bez metylacji *MGMT* (p=0.376).

W tej grupie pacjentów diagnozowanej w latach 2001-2003, leczonych standardowo przed erą temozolomidu (resekcja chirurgiczna guza z radioterapią - tylko jeden pacjent był leczony dodatkową chemioterapią), nie wykazaliśmy związku pomiędzy metylacją *MGMT* a rokowaniem oraz wiekiem pacjentów. Według aktualnych zaleceń terapeutycznych, ze względu na to, iż wszyscy pacjenci z GB

odnoszą korzyść z leczenia temozolomidem, nie ma wskazań do rutynowego oznaczania metylacji *MGMT,* jednak wiele ośrodków na świecie stosuje tę ocenę.

Praca 3. Jesionek-Kupnicka D, Szybka M, Potemski P, Kulczycka-Wojdala D, Jaskólski D, Bieńkowski M, Skowroński W, Papierz W, Kordek R, Zawlik I. Association of loss of heterozygosity with shorter survival in primary glioblastoma patients. Pol. J. Pathol. 2013; 64(4):268-275.

Celem pracy były badania częstości **utraty heterozygotyczności (LOH)** na chromosomach 1p, 19q, 9p, 10q, 13q, and 17p oraz kodelecji 1p/19q w glioblastoma, w grupie GB scharakteryzowanej molekularnie według klasycznych markerów: amplifikacji *EGFR*, mutacji *IDH1* oraz *TP53*. Celem było określenie znaczenia prognostycznego utraty heterozygotyczności (LOH) w obrębie wymienionych loci u pacjentów z GB, którzy histopatologicznie nie mieli komponentu skąpodrzewiaka.

Aktualna klasyfikacja WHO 2016 glejaków naciekających jest znacznie zmieniona, ze względu na inkorporację zaburzeń molekularnych do rozpoznania jednostki nozologicznej. Skąpodrzewiaki WHO GII (*ang.* oligodendroglioma) są zdefiniowane molekularnie jako nowotwory, które wymagają obecności zarówno mutacji *IDH1/IDH2*, jak i kodelecji 1p/19q [Louis DN *i wsp.,* 2016], która jest ich „stemplem genetycznym" (*ang.* hallmark), zalecanych do potwierdzenia diagnozy skąpodrzewiaka metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*ang.* FISH, fluorescence in situ hybridization) [Stupp R *i wsp.,* 2014, Louis DN *i wsp.,* 2016].

Utrata całego ramienia chromosomów 1p/19q **(kodelecja lub utrata heterozygotyczności 1p/19q)** występuje głównie w skąpodrzewiakach, które również mogą ulegać progresji do GB. Wtórne GB na podłożu skąpodrzewiaka wiążą się z lepszym rokowaniem i większą wrażliwością zarówno na radioterapię jak i chemioterapię [Jenkins RB *i wsp.,* 2006; van den Bent MJ *i wsp.,* 2013]. Chociaż wystąpienie 1p/19q było skojarzone z lepszym rokowaniem w GB [Hill C *i wsp.,* 2003; Schmidt MC *i wsp.,* 2002], inne badania nie wykazały żadnego wpływu na rokowanie GB, nawet z komponentem skąpodrzewiakowym [Pinto LW *i wsp.,* 2001]. W badaniu EORTC/NCIC na grupie 360 przypadków GB, komponent skąpodrzewiakowy (GB-O) został znaleziony w 15% wszystkich przypadków, ale kodelecję 1 p/19q znaleziono tylko w jednym przypadku [Hegi Me *i wsp.* 2012]. Według piśmiennictwa, pomimo intensywnych badań molekularnych czynniki prognostyczne pierwotnego glioblastoma, w tym utraty heterozygotyczności i kodelecji 1p/19q są nadal dyskusyjne.

Wpływ utraty heterozygotyczności na chromosomach 1p, 19q, 9p, 10q, 13q i 17p na rokowanie u pacjentów z glioblastoma odnotowano wcześniej [Ohgaki H *i wsp.,* 2004]. Gorsze rokowanie było głównie wiązane z LOH 10q, szczególnie w *locus PTEN*, ale ich prognostyczny wpływ na glioblastoma jest kontrowersyjny [Houllier C *i wsp.,* 2006; Tada K i *wsp.,* 2001]. W naszym badaniu utratę heterozygotyczności LOH (w co najmniej jednym *loci* na wszystkich badanych chromosomach) wykryliśmy w 65% (26/40) przypadków glioblastoma, najczęściej LOH 10q w 36% (14/39) przypadków,

kodelecja 1p/19q wynosiła 7% (3/35) i nie współwystępowała z mutacją *IDH1*, co jest zgodne z histopatologicznym brakiem składnika skąpodrzewiakowego w tych przypadkach.

Pacjenci z LOH w co najmniej jednym z badanych *loci* na wszystkich chromosomach, mieli istotnie gorsze rokowanie niż pacjenci bez LOH. Mediana czasu przeżycia pacjentów z LOH (+) (dowolny LOH; n = 26), z wyjątkiem LOH 13q, wynosiła 11 miesięcy (zakres od 2-19 miesięcy), natomiast mediana czasu przeżycia w grupie LOH (-) (brak LOH; n = 14) wynosiła 13 miesięcy (zakres od 6-48 miesięcy) (p = 0.007). LOH 13q został wyłączony z tego obliczenia, ponieważ był związany ze współczynnikiem ryzyka (*ang.* HR, hazard ratio) poniżej 1.00, podczas gdy wszystkie inne LOH były związane z HR> 1.00. Jednowymiarowa analiza Coxa potwierdziła, że u pacjentów z LOH w którymkolwiek z badanych *loci* było znacznie zwiększone ryzyko śmierci (HR 3.07; 95% CI: 1.29-7.31; p = 0.006). Nie było statystycznie istotnego związku między LOH 1p/19q a przeżyciem (HR 1.17, 95% CI: 0.360-3.800, p = 0.790). Nie było statystycznie istotnego związku między innymi LOH jako pojedynczym parametrem a całkowitym przeżyciem. Asocjacja między LOH (jako pojedynczym parametrem lub grupą LOH) a wiekiem również nie była statystycznie istotna.

W tej grupie pacjentów dwa przypadki wykazywały współistnienie zmian molekularnych, uważanych za wzajemnie wykluczające się tj. mutacji *TP53* i amplifikacji *EGFR*. Jednoczesne występowanie mutacji *TP53* i amplifikacji *EGFR* było rzadko opisywane w przypadkach GB [Ueki K *i wsp., 2002*) i miało niekorzystną wartość prognostyczną dla całkowitego przeżycia [Ruano Y *i wsp.,* 2009). Ponadto jeden przypadek z mutacją *TP53* i amplifikacją *EGFR* oprócz LOH17p wykazywał dodatkowo LOH10q, LOH9p a drugi oprócz LOH17p wykazywał LOH10q, LOH 19q co sugerowało, że kumulacja zmian molekularnych w glejaku wielopostaciowym może się wiązać z krótszym przeżyciem.

Praca 2. Jesionek-Kupnicka D, Szybka M, Małachowska B, Fendler W, Potemski P, Piaskowski S, Jaskólski D, Papierz W, Skowroński W, Och W, Kordek R, Zawlik I. *TP53* promoter methylation in primary glioblastoma: relationship with *TP53* mRNA and protein expression and mutation status. DNA Cell. Biol. 2014;33(4): 217-226.

Prawie wszystkie GB wykazują zmiany w trzech ścieżkach molekularnych: szlaki *RTK/ RAS/PI-3K* w 88% przypadków, *TP53* w 87% i *RB1* w 78% [Cancer Genome Atlas Research Network 2008].

Związek pomiędzy metylacją a ekspresją *TP53* w GB wciąż nie był dobrze znany. Co ciekawe, promotor *TP53* nie zawiera wysp CpG w regionie 5' i podstawowy region promotora o długości 85 pz (nt760-844) jest niezbędny do umożliwienia pełnej aktywności promotora, albo przez bezpośrednie blokowanie transkrypcji czynnika wiążącego lub kierując wiązaniem białek represorowych [Bienz-Tadmor B *i wsp.,* 1985]. Wykazano, że region ten ulega metylacji w innych nowotworach [Pogribny IP i James SJ, 2002; Agirre X *i wsp.,* 2003; Hurt EM *i wsp.,* 2006].

Regulacja ekspresji *TP53* jest złożona i obejmuje zarówno mechanizmy translacyjne (głównie w przypadku choroby przewlekłej np. stres genotoksyczny) [Reisman D i Rotter V 1993] oraz posttranslacyjne mechanizmy kontrolujące poziomy wewnątrzkomórkowe białka TP53 po ostrym uszkodzeniu DNA [Kastan MB *i wsp.,* 1991]. Eksperymentalnie wykazano, że leczenie 5-aza-2-deoksycytydyną (5-aza-dC) może indukować szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA- zależny od TP53 niezależnie od stanu metylacji promotora *TP53* bez zwiększania poziomów transkryptów genu [Karpf AR i *wsp.,* 2001]. Wykazano obniżenie poziomu transkrypcji *TP53* w hodowlach komórek transfekowanych plazmidem z promotorem *TP53* zawierającym metylowany CpG [Schroeder M i Mass MJ, 1997]. Zmiany w metylacji pojedynczego miejsca CpG regionu promotora *TP53* prowadzą do inicjacji metylacji *de novo* i stopniowego rozprzestrzeniania się metylacji związanej z inaktywacją transkrypcji *TP53* i zmniejszoną ekspresję *TP53* u szczurów [Pogribny IP i *wsp.,* 2000]. Zredukowany poziom *TP53* przez metylację promotora dwunukleotydu CpG odnotowano w niektórych nowotworach takich jak ostra białaczka limfoblastyczna (*ang.* ALL, acute lymphoblaastic leukemia), raku wewnątrzprzewodowym piersi (*ang.* DCIS, ductal carcinoma *in situ*) i raku wątrobowokomórkowym (*ang.* HCC, hepatocellular carcinoma) [Pogribny IP i *wsp.*, 2000; Kang JH i wsp., 2001; Agirre X i *wsp.*, 2003), natomiast w GB mechanizm ten jest słabo poznany.

Dlatego też celem pracy było zbadanie, czy metylacja głównego promotora *TP53* odgrywa rolę w wyciszaniu ekspresji transkrypcyjnej genu i translacyjnej białka TP53.

Celem tej pracy była ocena statusu *TP53*, a szczególnie wpływu metylacji i mutacji genu na ekspresję mRNA i nadekspresję białka w immunohistochemii. Ocenialiśmy wzajemną zależność między zmianami *TP53* (metylacja a poziom mRNA, mutacje a nadekspresja białka) z innymi zmianami molekularnymi (metylacja *MGMT* i amplifikacja *EGFR*). Oceniliśmy również wpływ wszystkich zmian molekularnych na przeżycie pacjentów.

Grupa badawcza obejmowała materiał tkankowy pooperacyjny od 42 pacjentów z GB (21 kobiet i 21 mężczyzn) w wieku od 23 do 76 lat, średnia wieku wynosiła 59.1 ± 11.8 lat. Grupa została również scharakteryzowana pod względem statusu amplifikacji *EGFR* (wykryta w 38% (15/40) oraz mutacji *IDH1* w kodonie 132 (tylko jeden przypadek wykazywał mutację 2% (1/42).

Częstość metylacji promotora *TP53 w* badanej przez nas grupie pacjentów wynosiła 21% (9/42). Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą jest to pierwszy raport pokazujący tak wysoką częstość metylacji promotora *TP53* w pierwotnym GB. Nie wykazaliśmy związku między metylacją promotora *TP53* a poziomem mRNA *TP53* ($p = 0.572$) i między metylacją promotora *TP53* a ekspresją białka TP53 ($p = 0.045$). Nie stwierdziliśmy istotnych związków między ekspresją mRNA *TP53* a mutacją genu *TP53* ($p = 0.908$). Jednakże, istotny związek występował między mutacją *TP53* a ekspresją białka TP53 ($p = 0.002$). Nie wykazaliśmy również wpływu badanych zaburzeń na przeżycia pacjentów. Nasze dane sugerują, że

metylacja głównego promotora *TP53* nie odgrywa roli w wyciszaniu ekspresji transkrypcyjnej genu i translacyjnej białka TP53. Ekspresja *TP53* jest prawdopodobnie regulowana przez inne genetyczne i epigenetyczne mechanizmy związane z genami uczestniczącymi w szlaku *TP53,* szczególną rolę odgrywają tutaj mikroRNA. Dodatkowo ekspresja *MGMT* może być obniżona niezależnie od metylacji promotora przez wydłużenie regionu 3'- nieulegającego translacji mRNA, powodując alternatywnie poliadenylowany transkrypt wrażliwy na regulację zależną od mikroRNA [Kreth S *i wsp.,* 2013]. Dlatego też w dalszej części projektu w pracy 1. oceniliśmy ekspresję wybranych mikroRNA biorących udział w regulacji *TP53* i *MGMT*.

Praca 1. Jesionek-Kupnicka D, Braun M, Trąbska-Kluch B, Czech J, Szybka M, Szymańska B, Kulczycka-Wojdala D, Bieńkowski M, Kordek R, Zawlik I. MiR-21, miR-34a, miR-125b, miR-181d and miR-648 levels inversely correlate with *MGMT* and *TP53* expression in primary glioblastoma patients. Archives of Medical Science 2017; https://doi.org/10.5114/aoms.2017.69374.

Praca ta dotyczyła oceny ekspresji wybranych mikroRNA, które w piśmiennictwie zostały zidentyfikowane jako wykazujące zmienioną ekspresję w GB i związane z regulacją *TP53*: *miR-21, miR-34a, miR-125b* [Feng Z *i wsp.,* 2011; Fan YN *i wsp.,* 2014] oraz z regulacją *MGMT*, takich jak: miR-181b i miR-648 [Zhang W *i wsp.,* 2012, Bradley BS *i wsp.,* 2014, Kreth S *i wsp.,* 2013]. Ekspresja tych mikroRNA została oceniona pod kątem zależności z ekspresją *TP53,* metylacją *TP53,* mutacjami *TP53* i nadekspresją IHC białka TP53 oraz między poziomem mRNA *MGMT,* metylacją promotora *MGMT* i nadekspresją IHC białka MGMT w tkance nowotworowej pacjentów z GB w grupie 49 pacjentów.

Aktywność *TP53* jest ściśle związana z mikroRNA, ponieważ reguluje ona ekspresję i dojrzewanie kilku mikroRNA, podczas gdy jego ekspresja i funkcja jest modyfikowana przez inne mikroRNA [Feng Z *i wsp.,*2011]. MikroRNA to krótkie (20-24 nt) niekodujące RNA regulacyjne, które odgrywają kluczową rolę w wyciszaniu RNA i postranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, zaangażowanych w różnorodne procesy fizjologiczne i patologiczne, takie jak rozwój i różnicowanie komórek, proliferacja komórek, metabolizm i apoptoza, wpływając zarówno na stabilność, jak i translację mRNA [Ambros V i Lee RC 2004; Bartel DP 2004; Calin GA i Croce CM 2006]. MikroRNA uczestniczą w negatywnej regulacji (obniżaniu) ekspresji genów poprzez wiązanie z sekwencją *seed* (*ang.* seed sequence) w 3'-UTR (region nieulegający translacji) matrycowego RNA (mRNA) genu docelowego, co powoduje represję translacji i/lub degradację mRNA [Baulcombe D 2002]. Uważa się, że mikroRNA odgrywają ważną rolę w kancerogenezie, regulując ekspresję różnych onkogenów i genów supresorowych nowotworów [Calin GA i Croce CM 2006], a ponadto, co ciekawe, same mają funkcje zarówno genów supresorowych jak i onkogenów, biorących udział w rozwoju nowotworów [Esquela-Kerscher S i Slack FJ 2006]. Zmiana profilu ekspresji mikroRNA jest związana ze zmianami genetycznymi i epigenetycznymi, w tym delecją, amplifikacją, mutacją punktową i nieprawidłową metylacją DNA.

Wykazano, że mikroRNA ulega różnej ekspresji w glejakach WHO GII i GIII oraz GB (WHO GIV) w porównaniu z prawidłową tkanką mózgu [Dong H *i wsp.*, 2010; Bradley BS *i wsp.*, 2014]. Ponadto mikroRNA mogą funkcjonować jako geny związane z promowaniem wrażliwości lub oporności na chemio- i radioterapię nowotworów [Kato M *i wsp.*, 2009]. Wykazano również, że mają one znaczenie prognostyczne i mogą stać się celem terapeutycznym u pacjentów z glejakami. Onkogenne mikroRNA, zwane "oncomirami", sprzyjają rozwojowi nowotworu przez negatywne hamowanie genów supresorowych guza i/lub genów kontrolujących wzrost, różnicowanie lub apoptozę komórek.

MiR-34a należy do sieci regulatorów *TP53,* poprzez wzajemne oddziaływanie między białkami i niekodującymi RNA w tym kluczowym szlaku supresorowym nowotworów. *TP53* może bezpośrednio regulować ekspresję członków rodziny miR-34. Gen *miR-34a* znajduje się w chromosomie 1 p36, w niekodującym regionie B30 kb poniżej przewidywanego miejsca wiązania *TP53*, działa, jako supresor w wielu nowotworach, w tym w glioblastoma, poprzez promowanie apoptozy zależnej od *TP53*, zatrzymanie cyklu komórkowego w powiązaniu z kinazami zależnymi od cyklin CDK4 i CDK6 oraz BCL2 [Feng Z *i wsp.*, 2011], hamuje samoodnowę komórek macierzystych nowotworów, promuje wrażliwość komórek nowotworowych na chemio- i radioterapię [Kato M *i wsp.*, 2009] oraz hamuję inwazję.

W glejakach, poziomy ekspresji *miR-34a* korelują dodatnio ze stopniem złośliwości wg. WHO, oraz mają wartość prognostyczną – u pacjentów z glejakami WHO GIII I G IV niższa ekspresja *miR-34a* korelowała z gorszym przeżyciem (okresem wolnym od bez progresji i całkowitym przeżyciem). Analiza jednoczynnikowa i wieloczynnikowa ujawniła, że *miR-34a* był niezależnym wskaźnikiem prognostycznym dla glejaków [Gao H i *wsp.*, 2013].

MiR-21 jest jednym z najczęściej ulegających podwyższonej ekspresji mikroRNA w ludzkich liniach komórkowych oraz tkance nowotworowej z GB [Piwecka M i *wsp.*, 2015; Bradley BS i wsp., 2005; Zhou X *i wsp.*, 2010]. Nadekspresja *miR-21* może modulować leczenie, ponieważ znacząco hamowała wpływ temozolomidu (TMZ) na apoptozę, poprzez podwyższenie ekspresji antyapoptotycznego białka BCL2 i obniżenie ekspresji proapoptotycznych białek BAX i kaspazy-3 [Shi L *i wsp.*, 2010]; z kolei obniżenie ekspresji *miR-21* wzmacniała działanie leków cytotoksycznych (TMZ, doksorubicyny, paklitakselu i sunitynibu) w liniach komórkowych GB [Ren Y i *wsp.*, 2010; Wong ST *i wsp.*, 2012; Zhang S *i wsp.*, 2015]. Kilka badań wykazało, że przejściowa transfekcja antysensownym *miR-21* zwiększa wrażliwość linii komórkowej glejaka na chemio- i radioterapię [Ren Y *i wsp.*, 2010, Shi L *i wsp.*, 2010].

Mir-125b należy do grupy mikroRNA, która ulega stałej obniżonej ekspresji w GB i wykazuje działanie supresorowe na rozwój nowotworu min. poprzez wpływ na proliferację komórek glejowych macierzystych (*ang.* GSC, glial stem cell) [Zhao B *i wsp.*, 2014], na regulacje cyklu komórkowego [Wu N *i wsp.*, 2012) oraz angiogenezę indukowaną poprzez czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (*ang.* VEGF, Vascular endothelial growth factor) poprzez zwiększenie ekspresji białka palca cynkowego

związanego z myc (*ang.* MAZ, Myc-associated zinc finger protein), czynnika transkrypcyjnego, który reguluje VEGF [Smits *i wsp.*,2012]. Z kolei nadekspresja *miR-125b* zmniejszała ekspresję białek regulatorowych cyklu komórkowego w liniach komórkowych glejaków, uniemożliwiając zatrzymanie cyklu komórkowego w przejściu fazy G1/S [Shi L *i wsp.*, 2012].

MiR-181d i ***miR-648*** zostały zidentyfikowane, jako najważniejsze post-transkrypcyjne regulatory *MGMT*. Ekspresja *MGMT* może być kooperatywnie obniżona przez *miR-181d i miR-648* na poziomie potranskrypcyjnym lub translacyjnym, ponieważ *miR-181d* indukuje degradację mRNA *MGMT*, podczas gdy miR-648 wpływa na translację białka *MGMT* [Kreth S *i wsp.*, 2013, Zhang W *i wsp.*, 2012].

W naszym badaniu [praca 1.] wyniki ekspresji mRNA *TP53* były wymierne u 41 (84%) pacjentów. Poziomy mRNA *TP53* były niższe w próbkach nowotworowych niż w próbkach z prawidłowego mózgu. Poziom mRNA *TP53* był wyższy u pacjentów z nadekspresjąT P53 niż u pacjentów bez nadekspresji białka TP53 (p = 0.048). Metylację promotora *TP53* w tej grupie badanej wykryliśmy tylko u 4 (8%) pacjentów, natomiast nie wykryliśmy związku między mutacjami *TP53* a metylacją promotora *TP53* (p = 1.000). Białko TP53 ulegało nadmiernej ekspresji u 20 (41%) pacjentów. Ani mutacje *TP53*, ani metylacja promotora nie wpływały na poziomy ekspresji *TP53* (p = 0.846 i p = 0.938) (podobnie jak w pracy 2). W niniejszym artykule potwierdziliśmy również poprzednie ustalenia braku związku między metylacją promotora *TP53* a poziomem mRNA *TP53* lub nadekspresją jądrową białka [praca 2]. Dodatkowo, ekspresja *TP53* nie była związana z mutacjami *TP53.*

W tej grupie pacjentów metylację *MGMT* wykryliśmy w 19 (39%) przypadkach. Nadekspresję białka MGMT ocenianą immunohistochemicznie, stwierdziliśmy u 17 (35%) pacjentów. Wyniki ekspresji mRNA *MGMT* były wymierne u 45 (92%) pacjentów. Poziomy mRNA *MGMT* były wyższe w próbkach tkanek guza niż w prawidłowych próbkach tkanek. Ekspresja *MGMT* była niższa u pacjentów z metylacją *MGMT* niż u pacjentów bez metylacji *MGMT* (p=0.024). Nadekspresja immunohistochemiczna MGMT nie była związana ze zwiększonymi poziomami ekspresji mRNA *MGMT* (p = 0.065). Nie wykryliśmy mutacji *IDH1* (status wildtype GB). Dziewięciu (18%) pacjentów nie miało żadnej z badanych zmian molekularnych.

W naszym badaniu wykazaliśmy, że poziomy ekspresji *miR-34a* i *TP53* były ujemnie skorelowane u pacjentów z immunohistochemicznie wykrytą nadekspresją białka TP53 (r = -0,56, p = 0,019), a poziomy ekspresji *miR-21* i *TP53* były ujemnie skorelowane u pacjentów z mutacjami *TP53* (r = -0,67, p = 0,033). Wykryliśmy ujemną korelację między *miR-21* i poziomem mRNA *TP53* u pacjentów z mutacjami *TP53*. Wyższa ekspresja tego mikroRNA została wykryta w tkankach guza niż w prawidłowej tkance mózgowej. Poziom *miR-21* był niższy u pacjentów z metylacją *MGMT* niż u pacjentów bez metylacji *MGMT* (p = 0,039). Niektórzy autorzy twierdzą, że *miR-21* jest negatywnym czynnikiem prognostycznym, ale nie zostało to potwierdzone w naszym badaniu.

Wykryliśmy ujemną korelację między ekspresją *MGMT* a *miR-648* u pacjentów z metylacją promotora *MGMT*. Dodatkowo zaobserwowaliśmy ujemną korelację między mRNA *MGMT* i *miR-181d*. Chociaż ta zależność nie była istotna statystycznie, potwierdza wcześniejsze doniesienie, że *miR-181d* może indukować degradację mRNA *MGMT* [Kreth S i *wsp.* 2013]. U pacjentów z metylacją *MGMT* poziom ekspresji *MGMT* był ujemnie skorelowany z poziomami ekspresji *miR-648* i *miR-125b* (odpowiednio r = -0,61, p = 0,027 i r = -0,34, p = 0,073). Nie zaobserwowaliśmy związku tych microRNA z przeżyciem w badanej grupie pacjentów. Nasze badania pokazują, że wybrane mikroRNA są znacząco skorelowane z poziomami *MGMT* i *TP53*, ale stopień tej korelacji różni się w odniesieniu do statusu mutacji i metylacji promotora *TP53 i MGMT*.

Przeanalizowaliśmy również wpływ zmian molekularnych unieczynniających *TP53 i MGMT* na przeżycie całkowite, ale analizy te nie wykazały wartości prognostycznej żadnej z badanych zmiennych, w tym poziomów wybranych mikroRNA. Biorąc pod uwagę, że poprzednie doniesienia w literaturze wskazywały na ich prognostyczny wpływ w GB, uważamy, że nasza analiza może być niedoszacowana, ze względu na zbyt małą grupę badaną pacjentów.

Wnioski

1. Częstość metylacji *MGMT* w pierwotnym glioblastoma charakteryzuje się dużą zmiennością (w naszych pracach 39% i 72%). Metylacja *MGMT* w naszych badaniach nie miała związku z wiekiem pacjentów i nie była niezależnym czynnikiem prognostycznym dla pacjentów leczonych standardowo radioterapią. Nie wykazaliśmy zwiększonej liczby mutacji *TP53* z G: C do A: T u pacjentów z metylacją *MGMT*.

2. Pacjenci z LOH w co najmniej jednym z badanych *loci* na wszystkich chromosomach, mieli istotnie gorsze rokowanie niż pacjenci bez LOH (z wyjątkiem LOH13q) pod względem mediany czasu przeżycia oraz zwiększonego ryzyka śmierci. Nie wykazaliśmy wpływu pozostałych badanych zaburzeń molekularnych takich jak mutacja, ekspresja, metylacja *TP53*, ekspresja i metylacja *MGMT* oraz amplifikacja *EGFR* na czas przeżycia pacjentów z pierwotnym glioblastoma.

3. Kodelecja 1p/19q była rzadka w pierwotnym glioblastoma i nie występowała z mutacją *IDH1*, co jest zgodne z histopatologicznym brakiem składnika skąpodrzewiakowego; nie stwierdziliśmy wpływu tej kodelecji na przeżycie pacjentów. Dlatego też dodatkowe oznaczanie kodelecji 1p/19q, jako markera prognostycznego w glejaku wielopostaciowym wydaje się niecelowe.

4. Częstość metylacji promotora *TP53* w badanych grupach pacjentów była zmienna wynosiła 8% i 21%. Nie wykazaliśmy związku między metylacją promotora *TP53* zarówno z poziomem mRNA *TP53* jak i ekspresją białka TP53, niezależnie od częstości metylacji promotora *TP53*. Nie wykazaliśmy istotnych związków między ekspresją mRNA *TP53* a mutacją genu *TP53*. Stwierdziliśmy jednak istotny

związek między mutacją *TP53* a ekspresją białka TP53. Nasze dane sugerują, że metylacja głównego promotora *TP53* nie odgrywa roli w wyciszaniu ekspresji transkrypcyjnej oraz translacyjnej i jest regulowana przez inne genetyczne i epigenetyczne mechanizmy związane z genami uczestniczącymi w szlaku *TP53* w tym mikroRNA.

5. Wybrane mikroRNA są znacząco skorelowane z poziomami *MGMT* i *TP53*, ale stopień tej korelacji różni się w odniesieniu do statusu mutacji, nadekspresji i metylacji promotora *MGMT i TP53*. Poziomy ekspresji *miR-34a* i *TP53* były ujemnie skorelowane u pacjentów z immunohistochemicznie wykrytą nadekspresją białka TP53, poziomy ekspresji *miR-21* i *TP53* były ujemnie skorelowane u pacjentów z mutacjami *TP53*. Wykryliśmy ujemną korelację między *miR-21* i poziomem mRNA *TP53* u pacjentów z mutacjami *TP53*.

6. Wykryliśmy ujemną korelację między ekspresją *MGMT* a *miR-648* u pacjentów z metylacją promotora *MGMT,* ujemną korelację między mRNA *MGMT* i mRNA *miR-181d.* U pacjentów z metylacją *MGMT* poziom ekspresji *MGMT* był ujemnie skorelowany z poziomami ekspresji *miR-648* i *miR-125b.*

Wyniki te sugerują, że wyselekcjonowane mikroRNA (szczególnie *miR-34a, miR-125b* i *miR-648*) odgrywają istotną rolę w patogenezie glioblastoma, ponieważ mogą wpływać na ekspresję genów supresorowych (*TP53*) i genów naprawy DNA (*MGMT*) w zależności od ich statusu mutacyjnego i metylacyjnego w pierwotnym glioblastoma, co w przyszłości może przełożyć się na opracowanie terapii opartej na niekodujących RNA.

Piśmiennictwo

[1] Agirre X, Vizmanos JL, Calasanz MJ et al. Methylation of CpG dinucleo- tides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP53 correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. Oncogene 2003;22:1070–1072.

[2] Amatya VJ, Naumann U, Weller M, Ohgaki H. TP53 promoter methylation in human gliomas. Acta Neuropathol 2005; 110:178-84.

[3] Ambros V, Lee RC. Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning. Methods Mol Biol 2004; 265:131–58.

[4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116: 281–297.

[5] Baulcombe D. DNA events: an RNA microcosm. Science 2002; 297:2002–2003.

[6] Bienz-Tadmor B, Zakut-Houri R, Libresco S, et al. The 5¢ region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. EMBO J 1985; 4a:3209–3213.

[7] Bradley BS, Loftus JC, Mielke CJ, Dinu V. Differential expression of microRNAs as predictors of glioblastoma phenotypes. BMC Bioinformatics 2014;15:21.

[8] Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. Cell 2013; 155:462–477.

[9] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer 2006; 6:857–66.

[10] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature 2008; 455:1061-1068.

[11] Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, et al. TCGA Research Network. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. Cell 2016;164: 550-563.

[12] Chan JA, Krichevsky AM., Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Res. 2005; 65:6029–6033.

[13] Costa PM, Cardoso AL, Nóbrega C, et al. MicroRNA-21 silencing enhances the cytotoxic effect of the antiangiogenic drug sunitinib in glioblastoma. Hum Mol Genet 2013; 22:904–918.
[14] Crinière E, Kaloshi G, Laigle-Donadey F, et al. MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities. J Neurooncol 2007; 83:173-9.
[15] Dong H, Siu H, Luo L, Fang X, Jin L, Xiong M. Investigation gene and microRNA expression in glioblastoma. BMC Genomics. 2010;11(Suppl 3): S16
[16] Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, et al. Glioma groups based on 1p/19q, IDH and TERT promoter mutations in tumors. N Engl J Med 2015;372:2499–2508
[17] Esquela-Kerscher A and Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. Nature Rev Cancer 2006; 6:259-269.
[18] Esteller M and Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. J Pathol 2002; 196:1–7.
[19] Fan YN, Meley D, Pizer B, Sée V. Mir-34a mimics are potential therapeutic agents for p53-mutated and chemo-resistant brain tumour cells. PLoS One. 2014; 9:e108514.
[20] Feng Z, Zhang C, Wu R, Hu W. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. J Mol Cell Biol 2011; 3:44-50.
[21] Gao H, Zhao H, Xiang W. Expression level of human miR-34a correlates with glioma grade and prognosis. J Neurooncol. 2013 Jun;113(2):221-8
[22] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med 2005; 352:997-1003.
[23] Hegi ME, Janzer RC, Lambiv WL, et al.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Presence of an oligodendroglioma-like component in newly diagnosed glioblastoma identifies a pathogenetically heterogeneous subgroup and lacks prognostic value: central pathology review of the EORTC_26981/NCIC_CE.3 trial. Acta Neuropathol 2012; 12: 841-852.
[24] Hill C, Hunter SB, Brat DJ. Genetic markers in glioblastoma: prognostic significance and future therapeutic implications. Adv Anat Pathol 2003; 10:212-217.
[25] Hurt EM, Thomas SB, Peng B, Farrar WL. Reversal of p53 epigenetic silencing in multiple myeloma permits apoptosis by a p53 activator. Cancer Biol Ther 2006; 5:1154–1160.
[26] Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, et al. A t (1; 19) (q10; p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. Cancer Res 2006;66:9852-9861.
[27] Kaina B, Ziouta A, Ochs K, Coquerelle T. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex–, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. Mutat Res. 1997; 381:227–241.
[28] Kang JH, Kim SJ, Noh DY, et al. Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. Lab Invest 2001; 81:573–579.
[29] Karpf AR, Moore BC, Ririe TO, Jones DA. Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2¢-deoxycytidine. Mol Pharmacol 2001;59:751–757.
[30] Karsy M, Gelbman M, Shah P, Balumbu O, Moy F, Arslan E. Established and emerging variants of glioblastoma multiforme: review of morphological and molecular features. Folia Neuropathol 2012; 50: 301-321.
[31] Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 1991;51:6304–6311.
[32] Kato M, Paranjape T, Ullrich R, et al. The MiR-34 microRNA is required for the DNA damage response in vivo in C. elegans and in vitro in human breast cancer cells. Oncogene 2009;28:2419–2424
[33] Koh J, Cho H, Kim H, at al. IDH2 mutation in gliomas including novel mutation. Neuropathology. 2015 Jun;35(3):236-44.
[34] Kreth S, Limbeck E, Hinske LC, et al. In human glioblastomas transcript elongation by alternative polyadenylation and miRNA targeting is a potent mechanism of MGMT silencing. Acta Neuropathol 2013;125: 671-681.
[35] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. 2016; 131:803-820.
[36] McLendon R, Friedman A, Bigner D, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature 2008; 455: 1061-1068.

[37] Meikrantz W, Bergom MA, Memisoglu A, Samson L. O6-alkylguanine DNA lesions trigger apoptosis. Carcinogenesis 1998; 19:369–372.
[38] Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. Clin Cancer Res 2013; 19:764–772.
[39] Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. Acta Neuropathol 2005; 109: 93-108.
[40] Ohgaki H, and Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. Cancer Sci 2009; 100: 2235–2241.
[41] Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. Cancer Res 2004; 64, 6892–6899.
[42] Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011. Neuro-oncol. 2014; 16 iv1–iv63.
[43] Pegg A E. Repair of O (6)-alkylguanine by alkyltransferases. Mutat Res. 2000; 462: 83-100.
[44] Pinto LW, Araújo MB, Vettore AL, et al. Glioblastomas: correlation between oligodendroglial components, genetic abnormalities, and prognosis. Virchows Arch 2008; 452: 481-490.
[45] Piwecka M, Rolle K, Belter A, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues. Mol Oncol. 2015; 9:1324-1340.
[46] Pogribny IP and James SJ. Reduction of p53 gene expression in human primary hepatocellular carcinoma is associated with promoter region methylation without coding region mutation. Cancer Lett 2002; 176, 169–74.
[47] Pogribny IP, Pogribna M, Christman JK, James SJ. Single-site methylation within the p53 promoter region reduces gene expression in a reporter gene construct: possible in vivo relevance during tumorigenesis. Cancer Res 2000; 60: 588–594.
[48] Preusser M, de Ribaupierre S, Wöhrer A, et al. Current concepts and management of glioblastoma. Ann Neurol 2011; 70:9-21.
[49] Reisman D and Rotter V. The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 suppressor gene. Nucleic Acids Res 1993;21, 345–350.
[50] Ren Y, Zhou X, Mei M, et al. MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol. BMC Cancer. 2010; 10:27.
[51] Roos WP, Batista LF, Naumann SC, et al. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion. Oncogene 2007; 26: 186-197.
[52] Ruano Y, Ribalta T, de Lope AR, et al. Worse outcome in primary glioblastoma multiforme with concurrent epidermal growth factor receptor and p53 alteration. Am J Clin Pathol. 2009 Feb; 131(2):257-63.
[53] Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, et al. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. J Neuropathol Exp Neurol 2002; 61:321-328.
[54] Schroeder M and Mass MJ. CpG methylation inactivates the transcriptional activity of the promoter of the human p53 tumor suppressor gene. Biochem Biophys Res Commun 1997; 235:403–406.
[55] Shi L, Chen J, Yang J, Pan T, Zhang S, Wang Z. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. Brain Res. 2010; 1352: 255–264.
[56] Shi L, Wan Y, Sun G, Gu X, et al. Functional differences of miR-125b on the invasion of primary glioblastoma CD133-negative cells and CD133-positive cells. Neuromolecular Med. 2012; 14:303–316.
[57] Smits M, Wurdinger T, van het Hof B, et al. Myc-associated zinc finger protein (MAZ) is regulated by miR-125b and mediates VEGF-induced angiogenesis in glioblastoma. FASEB J. 2012;26: 2639–2647.
[58] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol 2009; 10: 459-66. 5.
[59] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 2005; 352: 987-96.
[60] Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, et al. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: correlation with patient age and survival. J Neurosurg 2001; 95: 651-659.
[61] Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, et al. Correlationof histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. Clin Cancer Res 2002; 8:196-201.
[62] Watanabe K, Sato K, Biernat W, et al. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. Clin Cancer Res 1997; 3: 523-530.

[63] Van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. J Clin Oncol 2013;31:344-350.
[64] Von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. Brain Pathol 2011; 21:74–87.
[65] Wong ST, Zhang XQ, Zhuang JT, et al. MicroRNA- 21 inhibition enhances in vitro chemosensitivity of temozolomide-resistant glioblastoma cells. Anticancer Res. 2012; 32:2835–2841.
[66] Wu N, Xiao L, Zhao X, Zhao J, et al. miR-125b regulates the proliferation of glioblastoma stem cells by targeting E2F2. FEBS Lett. 2012; 586 (21): 3831–3839.
[67] Yarosh DB, Foote RS, Mitra S, Day RS 3rd. Repair of O6-methylguanine in DNA by demethylation is lacking in Mer-human tumor cell strains. Carcinogenesis 1983; 4:199–205.
[68] Zhang S, Han L, Wei J, et al. Combination treatment with doxorubicin and microRNA-21 inhibitor synergistically augments anticancer activity through upregulation of tumor suppressing genes. Int J Oncol. 2015; 46: 1589–1600.
[69] Zhang W, Zhang J, Hoadley K, et al. MiR-181d: predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression. Neuro Oncol 2012; 14: 712-719.
[70] Zhao B, Bian EB, Li J, et al. New advances of microRNAs in glioma stem cells, with special emphasis on aberrant methylation of microRNAs. J. Cell. Physiol. 2014; 229 (9): 1141–1147.
[71] Zhou X, Ren Y, Moore L, et al. Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. Lab Invest. 2010; 90:144–155.
[72] Conti A, Aguennouz M, La Torre D, et al. miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors. J Neurooncol 2009;93:325-332.
[73] Zawlik I, Jesionek-Kupnicka D and Pawel P. Liberski. Role of MGMT in Glioblastomas W: Tumors of the Central Nervous System, Volume 1, Part 2, 131-136 Eds.2011 M. A. Hayat.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo/badawczych

W trakcie mojej pracy naukowo-zawodowej jako patomorfolog onkologiczny we współpracy klinicznej, zajmowałam się zagadnieniami histo-klinicznymi różnych nowotworów z zastosowaniem technik immunohistochemii (*ang.* IHC, immunohistochemistry) na materiale tkankowym, w tym metody mikromacierzy tkankowych (*ang.* TMA, tissue microarray), cytometrii przepływowej (*ang.* FCM, flow cytometry), badań cytogenetycznych, hybrydyzacji *in situ* (*ang.* ISH, in situ hybridization), metody znakowania komórek apoptotycznych przy użyciu znakowania końca nici dUTP-digoksygeniny za pomocą transferazy deoxynukleotydowej (*ang.* TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling), badań mikroskopii elektronowej a także technik molekularnych. Główny nurt badań dotyczył neuropatologii oraz nowotworów limfo- i mieloproliferacyjnych. Oprócz prac oryginalnych jestem również autorem prac kazuistycznych dotyczących neuropatologii, hematopatologii oraz innych nowotworów (pierwszym autorem 6 prac i współautorem 10 prac kazuistycznych opublikowanych w czasopismach z listy JCR oraz współautorem 16 prac kazuistycznych opublikowanych w czasopismach z poza listy JCR).

Inne kierunki pracy naukowej dotyczyły następujących zagadnień:

5.1. Neuropatologia

5.2. Nowotwory limfo-i mieloproliferacyjne

5.3. Rak żołądka i jelita grubego

5.4. Poszukiwanie pierwotnej lokalizacji nowotworów przerzutowych w wątrobie i podstawowy algorytm diagnostyczny.

5.5. Dermatopatologia

5.6. Rak piersi i inne nowotwory ginekologiczne

5.1 Neuropatologia

5.1.1 Badania molekularne

Pozostałe prace z zakresu badań molekularnych w neuropatologii, które powstały w naszym zespole we współpracy z Zakładem Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Katedry Onkologii UMED w Łodzi dotyczyły analizy mutacji genu *TP53* (sekwencjonowanie DNA i cDNA) w glejaku wielopostaciowym, oraz innych nowotworach, dwie prace dotyczyły badania heterozygotyczności mutacji *TP53* w glioblastoma oraz w liniach komórkowych, jedna praca dotyczyła badania przesiewowego amplifikacji *EGFR* i polisomii chromosomu 7 w korelacji z rokowaniem pacjentów w glioblastoma oraz jedna praca ekspresji *WWOX* w glioblastoma.

Badania, które zostały opublikowane w artykule *„Szybka M, Zawlik I, Kulczycka D, Golańska E, Jesień E, **Kupnicka D**, Stawski R, Piaskowski S, Bieniek E, Zakrzewska M, Kordek R, Liberski PP, Rieske P. Elimination of wild-type P53 mRNA in glioblastomas showing heterozygous mutations of P53. Br. J. Cancer 2008; 98(8): 1431-1433. (IF- 4.846; MNiSW- 24)"* dotyczyły sekwencjonowania 50 glioblastoma pod kątem mutacji *TP53*. Pięć guzów wykazało heterozygotyczne mutacje, podczas gdy trzy były przypuszczalnie heterozygotyczne. Sześć z tych ośmiu GB wykazało eliminację mRNA *TP53* typu dzikiego. Wyniki analizy sekwencjonowania wykazały, że większość glejaków prezentujących heterozygotyczne mutacje genu *TP53* nie prezentowała mRNA *TP53* typu dzikiego, co wskazuje na istnienie nieznanego mechanizmu odpowiedzialnego za preferencyjną ekspresję zmutowanego mRNA *TP53* i eliminację dzikiego typu mRNA *TP53* u chorych z glioblastoma wykazujących mutację heterozygotyczną genu *TP53*.

Praca *"Stoczynska-Fidelus E, Szybka M, Piaskowski S, Bienkowski M, Hulas-Bigoszewska K, Banaszczyk M, Zawlik I, **Jesionek-Kupnicka D**, Kordek R, Liberski PP, Rieske P. Limited importance of the dominant-negative effect of TP53 missense mutations. BMC Cancer. 2011; 13:11-243. (IF- 3,011; MNiSW-30)"* miała na celu oszacowanie znaczenia dominującego-negatywnego efektu (*ang.*DNE, dominant-negative effect) dla mutacji *TP53*, analizowany był odsetek przypadków GB oraz linii komórkowych wykazujących pojedynczą heterozygotyczną mutację *TP53*. Ponadto przeprowadzona została analiza statystyczna baz danych *TP53* IARC i SANGER. Procent pojedynczych heterozygotycznych mutacji *TP53* opisanych w bazach danych jest niski (35% *in vivo* i 10% *in vitro*), odsetek pojedynczych heterozygotycznych mutacji w próbkach nowotworowych (*in vivo*) jest zawyżony w bazach danych. Wyniki pracy pozwoliły na sugestię, że obecnie zgłaszany odsetek pojedynczych heterozygotycznych

mutacji *TP53* w próbkach nowotworu i liniach komórek nowotworowych jest zawyżony a wielkość DNE mutacji *TP53* jest wątpliwa. Niemniej jednak, efektu tego nie należy lekceważyć i nie wykluczamy, że odgrywa on ważną rolę na najwcześniejszych etapach powstawania nowotworu.

W kolejnych pracach dotyczących analizy sekwencjonowania genu *TP53* w różnych nowotworach, w tym glejakach WHO GII i GIII wykazaliśmy, że sekwencjonowanie cDNA poprawia wykrywanie mutacji *TP53* w tych nowotworach. Sugerujemy, że faktyczna częstość występowania mutacji *TP53* w tych nowotworach jest zaniżona na poziomie analizy DNA, a ocena zmiany powinna zostać przeprowadzona przy użyciu analizy cDNA.

Praca *„Szybka M, Zakrzewska M, Rieske P, Pasz-Walczak G, Kulczycka-Wojdala D, Zawlik I, Stawski R,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Liberski PP, Kordek R. cDNA sequencing improves the detection of P53 missense mutations in colorectal cancer. BMC Cancer (online). 2009; 9:1-8. (IF- 2,736; MNiSW- 27)" dotyczyła* analizy 23 przypadków raka jelita grubego, natomiast w pracy *„Piaskowski S, Zawlik I, Szybka M, Kulczycka-Wojdala D, Stoczyńska-Fidelus E, Bieńkowski M, Robak T, Kusińska R,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Kordek R, Rieske P, Liberski PP. Detection of P53 mutations in different cancer types is improved by cDNA sequencing. Oncol. Lett. 2010; 1:717-721. (IF-0; MNiSW-2)" badania* zostały rozszerzone o analizę porównawczą 115 przypadków różnych typów nowotworów (40 przypadków inwazyjnego raka piersi, 23 przypadków ostrej białaczki szpikowej, 12 przypadków gwiaździaków (7 przypadków gwiaździaka anaplastycznego WHO GIII i 5 przypadków gwiaździaka rozlanego WHO G II) oraz 40 przypadków mięsaków tkanek miękkich). Wyniki z tych dwóch prac potwierdziły, że sekwencjonowanie cDNA jest lepszym sposobem detekcji mutacji genu *TP53* niż sekwencjonowanie DNA w różnych nowotworach.

W pracy *„Bieńkowski M, Piaskowski S, Stoczyńska-Fidelus E, Szybka M, Witusik-Perkowska M, Jesień-Lewandowicz E, Jaskólski DJ., Radomiak-Załuska A,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Sikorska B, Papierz W, Rieske P, Liberski PP. Screening for EGFR Amplifications with a Novel Method and Their Significance for the Outcome of Glioblastoma Patients. Plos One 2013;8(6):1932-6203. (IF- 3.534; MNiSW-40)"* na grupie 83 pacjentów z glioblastoma opisana została nowatorska metoda badania przesiewowego amplifikacji *EGFR* i polisomii chromosomu 7 z ilościowym Real-Time PCR na poziomie DNA. Badanie wykazało pozytywną wartość rokowniczą ekspresji *EGFRvIII,* natomiast gorszą wartość rokowniczą amplifikacji *EGFR* u młodszych pacjentów oraz u pacjentów leczonych radioterapią, szczególnie w kombinacji z polisomią chromosomu 7, natomiast lepszą w połączeniu z homozygotyczną delecją *CDKN2A.* Wyniki podkreślają konieczność rozróżniania obu mechanizmów zwiększonej liczby kopii *EGFR* (amplifikacji i polisomii).

W pracy „Kosla *K, Pluciennik E, Kurzyk A,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Kordek R, Potemski P, Bednarek AK. Molecular analysis of WWOX expression correlation with proliferation and apoptosis in glioblastoma multiforme. J Neurooncol. 2011;101(2):207-213. (IF- 2,929; MNiSW- 27)"* pod kierunkiem Profesora Andrzeja Bednarka z Zakładu Kancerogenezy Molekularnej, Katedry Medycyny Molekularnej i

Biotechnologii UMED w Łodzi została wykryta wysoka częstość ekspresji genu *WWOX* w GB, który jest genem supresorowym zaangażowanym w kancerogenezę i progresję wielu różnych nowotworów. Badanie wykazało wysoką częstość delecji genomowych na końcu 30' genu W*WOX* w GB. Utrata heterozygotyczności LOH oraz metylacja promotora może zmniejszać ekspresję WWOX. Transkrypcja *WWOX* w GB jest silnie związana z proliferacją (pozytywna korelacja z ekspresją genu *Ki-67)* i apoptozą (pozytywna korelacja z ekspresja genu BCL-*2)* oraz bierze udział w transdukcji sygnału przez szlak *ErbB4.* Dlatego dezaktywacja genu *WWOX* wydaje się odgrywać ważną rolę w procesie nowotworzenia GB.

W pracy kazuistycznej *„**Jesionek-Kupnicka D**, Kulczycka D, Rieske P, Szybka M, Jabłońska J, Potemski P, Kolasa P, Liberski P, Kordek R. The infrequent simultaneous genetic alterations in glioblastoma multiforme (LOH 10, 17, 19q, TP53 mutation and EGFR amplification) with short clinical course. Pol J Pathol. 2007;58(2):79-85. (IF-0; MNiSW-6)"* opisaliśmy złożone zaburzenia molekularne w glioblastoma u 57-letniego pacjenta tj. jednoczesne występowanie mutacji *TP53*/amplifikacji *EGFR,* które są uważane za wzajemnie wykluczające się, oprócz LOH17p dodatkowo była wykryta utrata heterozygotyczności LOH10q i LOH19p oraz nadekspresja IHC białka TP53 i IGFB2, bez nadekspresji IHC PTEN, P16, PI3-K u pacjenta z krótszym przeżyciem, co sugerowało, że kumulacja zmian molekularnych w glejaku wielopostaciowym może się wiązać z gorszym rokowaniem (obserwacja obecnie potwierdzona przez niezależnych badaczy w dużych grupach chorych).

Ponadto jestem autorem pracy poglądowej dotyczącej zaburzeń molekularnych w glejaku wielopostaciowym pt. *„**Jesionek-Kupnicka D**, Pasz-Walczak G, Kubiak R, Kordek R. Zaburzenia molekularne w glejaku wielopostaciowym - nowe kierunki badań i perspektywy. Współ. Onkol.2004; 8(6):313-316. (IF-0; MNiSW-4")*

5.1.2. Guzy mózgu-diagnostyka

Praca histo-kliniczna *„Fiks T, **Jesionek-Kupnicka D,** Zakrzewski K, Polis L, Liberski PP. Clinico-pathological analysis of pilocytic astrocytomas and gangliogliomas Pol J Pathol. 2001;52(1-2):47-51. (IF-0; MNiSW-5)"* została wykonana z dr Tomaszem Fiksem pod kierunkiem Prof. Pawła P. Liberskiego z Zakładu Patomorfologii Centrum Zdrowia Matki Polki (CZMP) w Łodzi we współpracy z Oddziałem Neurochirurgii CZMP i dotyczyła analizy patologiczno-klinicznej serii 58 gwiaździaków pilocytarnych (*ang.*PA, pilocytic astrocytomas) WHO GI i 11 zwojakoglejaków (*ang.*GG, ganglioglioma) WHO GI u dzieci. Dodatkowa analiza z użyciem panelu immunohistochemicznego markerów neuronalnych i glejowych (Synaptofizyna, NFP, GFAP) pozwoliła na reklasyfikację 11 przypadków z silną ekspresją SYN i/lub NFP rozpoznanych pierwotnie jako gwiaździaki pilocytarne (PA) na ganglioglioma (GG). W korelacji klinicznej całkowite 5-letnie przeżycie dla PA wyniosło 88,9% natomiast dla GG 70%, co wskazuje na znaczenie kliniczne dokonanej reklasyfikacji.

W pracy kazuistycznej *„**Jesionek-Kupnicka D**, Liberski PP, Kordek R, Kolasa P, Alwasiak J. Metaplastic meningioma with lipomatous changes. Folia Neuropathol. 1997;35(3):187-90. (IF- 0, MNiSW-8)"* opisaliśmy rzadkie lipomatyczne zmiany metaplastyczne w oponiaku typu przejściowego, prawdopodobnie związane z wydłużonym przebiegiem klinicznym u pacjenta z 30 letnim wywiadem, z początkową diagnozą stwardnienia rozsianego. Histologicznie obecne były duże obszary złożone z komórek z lipidową akumulacją cytoplazmatyczną, ściśle przypominających dojrzałe adipocyty. Zostało omówione również zjawisko metaplazji tłuszczowej w innych guzach mózgu i histogeneza tych zmian w oponiakach na tle embriogenezy.

Natomiast w pracy *„**Jesionek-Kupnicka D**, Smolewski P, Kupnicki P, Płuciennik E, Zawlik I, Papierz W, Kordek R. Primary extranodal marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue type in the central nervous system (MZL CNS) presented as traumatic subdural hematoma and subarachnoid bleeding-case report. Clin. Neuropathology 2013;32 (5):384-392. (IF- 1,311; MNiSW -20)"* opisaliśmy bardzo rzadki przypadek pierwotnego pozawęzłowego chłoniaka strefy brzeżnej z komórek B ośrodkowego układu nerwowego (*ang.* EMZL CNS, Extranodal marginal zone B cell lymphoma of central nervous system) zlokalizowanego w oponach twardych, o niezwykłej klinicznej i radiologicznej prezentacji naśladującej krwawienie podpajęczynówkowe i krwiak podtwardówkowy po urazie głowy. Podczas pilnej kraniotomii do drenażu krwiaka stwierdzono masę patologiczną, naciek histopatologicznie i immunohistochemicznie spełniał kryteria chłoniaka pozawęzłowego strefy brzeżnej z komórek B. Analiza molekularna potwierdziła monoklonalność rearanżacją genu łańcucha ciężkiego immunoglobulin (*IgH*) metodą PCR. Pacjentka przeszła pomyślnie radioterapię i uzyskała pełną odpowiedź z długim wywiadem całkowitej remisji. Rozpoznanie rzadkiego typu chłoniaka w rzadkiej anatomicznej lokalizacji jest bardzo ważne ze względu na właściwe postępowanie z pacjentem.

Ponadto jestem współautorem 3 prac dotyczących rzadkich guzów OUN:

1. *Braun M, Tomasik B, Bieńkowski M, Wiśniewski K, **Kupnicka DJ**, Jaskólski D, Papierz W, Fijuth J, Kordek R. Recurrent Pineocytomalike Papillary Tumor of The Pineal Region: A Case Report and Literature Review. World Neurosurg. 2018; 120:1-14 (IF- 1,924; MNiSW-30)*
2. *Kolasa M, **Jesionek-Kupnicka D**, Kordek R, Kolasa P. Primary spinal cord melanoma - a case report. Folia Neuropathol. 2010;48(3):212-6. (IF-1.222; MNiSW-20).*
3. *Kuncman W, Braun M, Kuncman Ł, Kupnicki P, Piotrowski M, **Jesionek-Kupnicka D**, Kordek R. A malignant astrocytoma with uncommon angiocentric features and dot-like EMA expression. Contemp Oncol (Pozn). 2018;22(3):205-208. Epub 2018 Sep 30. (IF-0; MNiSW-14).*

5.1.3 Badania ultrastrukturalne w neuropatologii

W pięciu pracach wykonanych w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Zakładu Patologii Molekularnej i Neuropatologii w Łodzi u Prof. Pawła P. Liberskiego zajmowałam się badaniami ultrastruktury guzów mózgu oraz choroby Krabbego i utraty neuronów w chorobie Creutzfelda-Jakoba. W badaniu

*„**Jesionek-Kupnicka D**, Kordek R, Biernat W, Zakrzewski K, Polis L, Alwasiak J, Liberski PP. Ultrastructural study of subependymal giant cell astrocytoma: unusual paracrystalloid inclusions in tumour cells. Pol J Pathol. 1997;48(3):189-95. (IF-0; MNiSW-5)" opisaliśmy* cechy ultrastrukturalne, w tym rzadko opisywane inkluzje parakrystaloidalne w komórkach rzadkiego guza pochodzenia glejowego- podwyściółkowego gwiaździaka olbrzymiokomórkowego (*ang.* SEGA, Subependymal giant cell astrocytoma) u dwóch siedmioletnich chłopców ze stwardnieniem guzowatym (*ang.* TSC, tuberous sclerosis complex). Ponadto w analizie cytogenetycznej opisaliśmy częściową utratę na chromosomie 22q w obu tych przypadkach. Zgodnie z naszą wiedzą był to pierwszy cytogenetyczny opis SEGA związanych z TSC (*Debiec-Rychter M, **Jesionek-Kupnicka D**, Zakrzewski K, Liberski PP. Cytogenetic changes in two cases of subependymal giant-cell astrocytoma. Cancer Genet Cytogenet. 1999;109(1):29-33). (IF- 1.756; MNiSW-10).*

W pracy *„**Jesionek-Kupnicka D**, Majchrowska A, Krawczyk J, Wendorff J, Barcikowska M, Lukaszek S, Liberski PP. Krabbe disease: an ultrastructural study of globoid cells and reactive astrocytes at the brain and optic nerves. Folia Neuropathol. 1997;35(3):155-62. (IF-0; MNiSW-8)"* przedstawiliśmy szczegółowe ultrastrukturalne badanie biopsji mózgu wraz z pośmiertnymi wycinkami mózgu i nerwu wzrokowego z przypadku choroby Krabbe'go u 10 miesięcznego dziecka, stosunkowo rzadkiej leukodystrofii spowodowanej mutacją w genie galaktocerebrozydazy (GALC) zmapowanym w regionie 14q31. GALC odpowiada za hydrolizę lizosomalną kilku galaktolipidów, w tym galaktozyloceramidu, głównych sfingolipidów istoty białej ośrodkowego układu nerwowego, galaktozylosphingozyny (psychozyny) i galaktozylodiglucerydu. Główne cechy neuropatologiczne, takie jak nagromadzenie komórek globoidalnych (CD68/PAS/Ferrytyna pozytywnych), utratę mieliny i wyraźną glejozę zaobserwowaliśmy w istocie białej. Ultrastrukturalne badanie komórek globoidalnych wykazało nagromadzenie krystaloidów cewkowych, które są wysoce specyficzne dla tej choroby. Omówiliśmy różnice w chorobie Gauchera i patomechanizm uszkodzenia neuropatologicznego.

W artykule *„**Jesionek-Kupnicka D**, Zakrzewski K, Polis L, Liberski PP. The ultrastructural study of primary intracranial germ cell tumours. Pol J Pathol. 1999;50(2):107-13.(IF 0; MNiSW-5)"* badania dotyczyły serii 5 rzadkich pozagonadalnych pierwotnych guzów ośrodkowego układu nerwowego (OUN) z komórek rozrodczych (*ang. germ cell tumors*) u dzieci, które ultrastrukturalnie wykazały rzadko opisywane międzykomórkowe struktury podobne do desmosomów oraz kieszonek w błonie jądrowej, będących rezultatem wgłobień i „podwijania" błony jądrowej.

Praca *„**Jesionek-Kupnicka D**, Sikorska B, Klimek A, Kordek R, Liberski PP. Angioganglioglioma transitional form between anglioglioma and gangioglioma? Ultrastruct. Pathol.2003; 27(4): 423-432; (IF-0. 86; MNiSW-8)"* dotyczyła opisu nietypowego guza u 46 letniego mężczyzny z bardzo długim wywiadem klinicznym napadów padaczkowych od ósmego roku życia. W badaniu histopatologiczno-immunohistochemicznym oraz ultrastrukturalnym obecne były trzy wzajemnie przeplatające się

komponenty: gwiaździaka pilocytarnego, proliferacji naczyniowej podobnej do malformacji tętniczo-żylnej (*ang.* AVM, arteriovenous malformation), nowotworowego składnika zwojowego. Dlatego zaproponowaliśmy określenie angiogangliogliomа dla nowotworu, który może stanowić nową odrębną jednostkę kliniczno-patologiczną o cechach nowotworowych i hamartomatycznych.

5.1.4 Apoptoza

Kolejne prace z zakresu neuropatologii łączą się z cyklem prac oceniających indeks apoptotyczny (*ang.* AI, apoptotic index) w nowotworach OUN u dzieci oraz w chorobie neurodegeneracyjnej Creutzfelda-Jakoba (*ang.* CJD, Creutzfelda-Jakob disease), a także w raku żołądka. Do identyfikacji komórek apoptotycznych użyliśmy techniki znakowania końca nici dUTP-digoksygeniny za pomocą transferazy deoxynukleotydowej (TUNEL) oraz w CJD dodatkowo mikroskopii elektronowej.

W pracy: *„**Jesionek-Kupnicka D,** Kordek R, Buczyński J, Liberski PP. Apoptosis in relation to neuronal loss in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2001;61(1):13-9. (IF-0,767; MNiSW -8)"* wskazaliśmy na role apoptozy w utracie neuronów w doświadczalnej chorobie Creutzfeldta-Jakoba u myszy, z zastosowaniem metody TUNEL i mikroskopii elektronowej. Wykazaliśmy, że śmierć apoptotyczna komórek wzrasta kolejno u myszy w schyłkowej fazie choroby w sposób zależny od czasu po inokulacji i może przyczynić się do utraty neuronów u myszy zakażonych domózgowo szczepem CJD Fujisaki.

Praca *„Buczyński J, **Jesionek-Kupnicka D,** Kordek R, Zakrzewski K, Polis L, Liberski PP. Apoptosis in non-astrocytic brain tumours in children. Fol. Neuropathol. 2002; 40(3):155-159. (IF- 0,394; MNiSW-7)"* dotyczyła badania wskaźnika apoptotycznego (*ang.* AR, apoptotic ratio) i indeksu proliferacyjnego w grupie nowotworów u dzieci: 19 rdzeniaków zarodkowych WHO GIV (*ang.* medulloblastoma), 15 wyściółczaków WHO GII (*ang.* ependymoma), z których 6 było anaplastycznych WHO GIII (*ang.* anaplastic ependymoma). Wartość AR różniła się statystycznie pomiędzy guzami i była najwyższa w rdzeniaku zarodkowym, w porównaniu z wyściółczakiem anaplastycznym i wyściółczakiem (p=0.003).

5.1.5 Neurologia, prace eksperymentalne

We współpracy z Kliniką Neurologii UMED w Łodzi, w badaniu *„Juryńczyk M, Walczak A, Jurewicz A, **Jesionek-Kupnicka D,** Szczepanik M, Selmaj K. Immune regulation of multiple sclerosis by transdermally applied myelin peptides. Ann Neurol. 2010 Nov;68(5):593-601. (IF -10,746; MNiSW-32)"* po raz pierwszy wykazany został potencjał immunoregulacyjny przezskórnej immunizacji mieszaniną 3 peptydów mielinowych na powstanie odpowiedzi immunologicznej w skórze, węzłach chłonnych i komórkach odpornościowych krwi obwodowej, u 30 pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (*ang.* MS, multiple sclerosis) w porównaniu z grupą kontrolną otrzymującą *placebo*. Peptydy mielinowe takie jak: podstawowe białko mielinowe (*ang.* MBP, myelin basic protein), białko proteolipidowe (*ang.* PLP, *proteolipid protein*) i glikoproteina oligodendrocytów mieliny (*ang.* MOG, *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) pełnią funkcję kluczowych autoantygenów w MS. Terapia specyficzna dla antygenu,

ukierunkowana na selektywne hamowanie autoreaktywnych odpowiedzi, jest obiecująca dla kontrolowania stwardnienia rozsianego bez zaburzania homeostazy całego układu immunologicznego. W rocznym badaniu z grupą kontrolną *placebo* stwierdziliśmy, że peptydy mielinowe podawane przezskórnie pacjentom z MS aktywowały komórki dendrytyczne (HLA)-DP, -DQ, -DR oraz CD1a pozytywne) w skórze w miejscu immunizacji (ocena metodą IHC) i indukowały unikalną populację ziarnistych komórek dendrytycznych w lokalnych węzłach chłonnych (ocena FCM). Na obwodzie, przezskórna immunizacja peptydami mielinowymi spowodowała wytworzenie komórek T regulatorowych typu 1, wytwarzających interleukinę-10, supresję specyficznych autoreaktywnych odpowiedzi proliferacyjnych i supresję interferonu-γ i wytwarzanie transformującego czynnika wzrostu-β (test immunoenzymatyczny (*ang.* ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) oraz test na bazie estru karboksyfluoresceiny sukcynimidylowej (*ang.* CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester-based assay).

Praca *„Kowalska - Ludwicka K, Cala J, Grobelski B, Sygut D,* ***Jesionek-Kupnicka D****, Kołodziejczyk M, Bielecki S, Pasieka Z. Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves. Arch. Med. Sci. 2013;1-8:1734-1922 (IF- 1,890; MNiSW-20)"* powstała pod kierunkiem Prof. Zbigniewa Pasieki z Zakładu Chirurgii Doświadczalnej, UMED w Łodzi we współpracy z Instytutem Biochemii Technicznej, Politechniki Łódzkiej. Przedmiotem pracy eksperymentalnej na nerwach udowych szczurów była bakteryjna nanoceluloza, naturalny polimer wytwarzany przez bakterie - *Gluconacetobacter xylinus*, służący do odbudowy uszkodzonych tkanek. Celem eksperymentu było opracowanie i analiza kanałów prowadzących celulozę *in vivo* w celu rekonstrukcji uszkodzonych nerwów obwodowych. W grupie eksperymentalnej zastosowano tubulizację, podczas gdy w grupie kontrolnej zastosowano tradycyjne połączenie koniec-koniec. Czas obserwacji wynosił 30, 60, 90 i 180 dni. Ocena wyników obejmowała analizę histologiczną i pooperacyjną obserwację odzyskiwania zdolności motorycznych. Przerost tkanki łącznej i dezorganizacja struktur nerwowych były widoczne w 86,7% próbek kontrolnych, podczas gdy w grupie celulozowej tylko w 35% ($p = 0.002$). Odzyskanie motoryki nie różniło się znacząco ($p > 0.050$) w dwóch grupach. Neurotuby celulozowe skutecznie zapobiegają powstawaniu nerwiaków, mają bardzo dobrą biokompatybilność, pozwalają na właściwe prowadzenie rosnących aksonów i sprzyjają gromadzeniu się wewnątrz czynników neurotroficznych, ułatwiając w ten sposób proces regeneracji nerwów.

5.2. Nowotwory limfo- i mieloproliferacyjne.

Obok neuropatologii w centrum moich szczególnych zainteresowań zarówno w pracy naukowej jak i diagnostycznej znajdują się nowotwory limfo- i mieloproliferacyjne. W bliskiej współpracy z Kliniką Hematologii i Kliniką Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Zakładem Diagnostyki Hematologicznej i Oddziałem Hematologii, Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHiT) w Warszawie powstał cykl prac, w którym jestem pierwszym autorem lub

współautorem dotyczących oznaczeń markerów immunohistochemicznych i polimorfizmów genów *HLA-G*, *IKZF1* oraz *CD38* w korelacji z przebiegiem klinicznym nowotworów z dojrzałych komórek B takich jak chłoniak rozlany z dużych komórek B (*ang.* DLBCL, Diffuse large B-cell lymphoma), przewlekła białaczka limfocytowa (*ang.* CLL, Chronic lymphocytic leukemia) oraz prekursorowych ostra białaczka szpikowa (*ang.* AML, Acute myeloid leukemia). Na początku mojej działalności podoktoranckiej, jako kontynuacja pracy doktorskiej, zajmowałam się cechami immunohistochemicznymi i hybrydyzacją *in situ* (ISH) wirusa EBV (test EBER) w klasycznym chłoniaku Hodgkina (*ang.* CHL, Classical Hodgkin's lymphoma).

Ponadto jestem pierwszym autorem i współautorem prac poglądowych dotyczących diagnostyki nowotworów układu chłonnego:

1. *Jabłońska J,* ***Jesionek-Kupnicka D.*** *Usefulness of immunohistochemistry in identification of prognostically important subgroups (GCB and ABC) in a heterogeneous group of diffuse large B-cell lymphomas-a review article. Pol. J. Pathol. 2008; 59(3):121-127. (IF-0; MNiSW-6)*
2. ***Jesionek-Kupnicka D.*** *Aktualne zasady diagnostyki nowotworów limfoidalnych. Cytometria Pol. 2012; 1(1): 1-17. (IF-0; MNiSW-0)*
3. *Szumera-Ciećkiewicz A, Rymkiewicz G, Grygalewicz B,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Gruchała A, Ziarkiewicz-Wróblewska B, Gałązka K, Reszeć J, Borg K, Prochorec-Sobieszek M. Comprehensive histopathological diagnostics of aggressive B-cell lymphomas based on the updated criteria of the World Health Organisation's 2017 classification. Pol J Pathol. 2018;69(1):1-19. (IF-0,865; MNiSW-15);*

a także współautorem wytycznych diagnostyki histopatologicznej nowotworów układu chłonnego i krwiotwórczego Polskiego Towarzystwa Patologów:

4. *Prochorec-Sobieszek M,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Rymkiewicz G. Nowotwory układu chłonnego i krwiotwórczego. Pol J Pathol 2015; (suplement 1).*

Jestem także współautorem 10 prac kazuistycznych dotyczących nowotworów limfoproliferacyjnych. Praca *„Szumera-Ciećkiewicz A, Gałązka K, Szpor J, Rymkiewicz G,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Gruchała A, Ziarkiewicz-Wróblewska B, Poniatowska-Broniek G, Demczuk S, Prochorec-Sobieszek M. Distribution of lymphomas in Poland according to World Health Organization classification: analysis of 11718 cases from National Histopathological Lymphoma Register project - the Polish Lymphoma Research Group study. Int J Clin Exp Pathol. 2014;157(6):3280-3286. (IF- 1,891 ; MNiSW-25)"* dotyczyła wdrożenia Narodowego Rejestru Histopatologicznego Chłoniaków (*ang.* NHLR, *National Histopathological Lymphoma Register project*) zgodnie z klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) z 2008 roku nowotworów krwiotwórczych i limfoidalnych, przez hematopatologów z Polskiej Grupy Badania Chłoniaków (*Polish Lymphoma Research Group)* i powstała w ramach realizacji zadania „Program wykrywania i rozpoznawania chłoniaków złośliwych w Polsce" w ramach „Narodowego programu zwalczania chorób nowotworowych" Ministerstwa Zdrowia. Obejmowała

rejestrację 11718 pacjentów z 24 Zakładów Patologii w latach 2007-2012 z chłoniakami, które zostały zreklasyfikowane według obowiązującej klasyfikacji WHO 2008. Celem badania było przedstawienie danych z projektu i porównanie dystrybucji chłoniaków w Polsce i na świecie w celu poprawy standardów diagnostycznych chłoniaków w naszym kraju. Główne różnice między NHLR a europejskimi i amerykańskimi danymi w podtypach chłoniaków nie-Hodgkina (*ang.* NHL, non-Hodgkin's Lymphoma) obejmowały: większą częstość występowania agresywnych chłoniaków z limfocytów B, w tym chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (*ang.* DLBCL, Diffuse large B cell lymphoma), mniejszą częstość występowania chłoniaka grudkowego (*ang.* FL, Follicular lymphoma) i chłoniaka towarzyszącego błonom śluzowym (*ang.* MALT, Mucosa associated lymphocytic tissue). Odsetek niesklasyfikowanych chłoniaków w badaniu był minimalny z powodu udziału hematopatologów w diagnostyce.

5.2.1. Ostra białaczka szpikowa (*ang.* AML, acute myeloid leukemia).

W pracy *„Gołos A*, **Jesionek-Kupnicka D***, Gil L, Braun M, Komarnicki M, Robak T, Wierzbowska A. The Expression of the SLIT-ROBO Family in Adult Patient with Acute Myeloid Leukemia. Arch Immunol Ther Exp (2019); 67:000–000 (IF-2,991; MSNiW- 25) DOI: 10.1007/s00005-019-00535-8 (* równy udział w pracy) (IF-2,991; MSNiW-25)"* oceniliśmy immunohistochemicznie ekspresję całej rodziny białek SLIT-ROBO zarówno ligandów: SLIT1, SLIT2, SLIT3 jak i receptorów ROBO1, ROBO2, ROBO3 i ROBO4 w biopsji szpiku kostnego pacjentów z AML (n=79) i grupie kontrolnej (n=23). Wykonaliśmy również analizę *in-silico* z wykorzystaniem repozytorium danych Atlasu Genomu Raka (The Cancer Genome Atlas) dla oceny poziomu RNA genów z rodziny *SLIT-ROBO*. W naszych badaniach wykazywaliśmy wysoką ekspresję ROBO1 i ROBO2 na komórkach białaczki pacjentów z AML w porównaniu do szpików kontrolnych (odpowiednio $p < 0.001$, $p < 0.001$) oraz niską ekspresję SLIT1, SLIT2 i SLIT3 w porównaniu do szpików kontrolnych (odpowiednio, $p < 0.001$, $p = 0.003$, i $p = 0.001$). Ekspresja ROBO4 korelowała z gęstością mikronaczyń (*ang.* MVD, microvessel density). Analiza *in-silico* wykazała złą wartość prognostyczną wysokich poziomów RNA *ROBO3* i niskiego poziomu *SLIT2* (odpowiednio $p < 0.001$ i $p < 0.001$), ponadto wysokie poziomy RNA *ROBO3* i *ROBO4* korelowały z grupami pacjentów gorszego ryzyka cytogenetycznego (odpowiednio $p < 0.001$ i $p < 0.001$). Dane te wskazują, że białka rodziny SLIT-ROBO odgrywają rolę w biologii i patogenezie AML a także na ich wartość prognostyczną.

5.2.2. Chłoniak rozlany z dużych komórek B (*ang.* DLBCL, Diffuse large B-cell lymphoma)

W badaniu *„Jabłońska J, **Jesionek-Kupnicka D**, Potemski P, Kowalik A, Sygut J, Kordek R. Comparison of two different immunohistochemical algorithms identifying prognostic subgroups of DLBCL. Pol J Pathol. 2010;61(3):124-32. (IF-0,456; MNiSW-9)"* na grupie 66 pacjentów w oparciu o analizę histo-kliniczną wykazaliśmy wartość prognostyczną podziału immunohistochemicznego wg. Hansa *i wsp.* 2004 z użyciem panelu przeciwciał MUM1, CD10 and bcl-6 ze względu na pochodzenie komórek (*ang.* COO, Cell of Origin) na dwa typy: pochodzące z ośrodków rozmnażania (*ang.* GCB, germinal centre B-cell) i spoza ośrodków rozmnażania (*ang.* non-GCB), który jest oparty na badaniu profilu ekspresji genów

Alizadeh *i wsp.*, 2000. Badania IHC były wykonywane metodą mikromacierzy tkankowych (*ang.* TMA, tissue microarray), we współpracy z Zakładem Patologii Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach. Pacjenci z chłoniakiem GCB mieli znacznie mniejsze ryzyko śmierci (p = 0.008) w porównaniu z grupą non- GCB. Pięcioletnie całkowite przeżycie (*ang.* OS, overall survival) dla grupy GCB wyniosło 85% i tylko 30% dla grupy non-GCB (p = 0.003). Ponadto podział na grupę GCB i non- GCB korelował z międzynarodowym wskaźnikiem prognostycznym (*ang.* IPI, international prognostic index) (p = 0.030). Chorzy z GCB z niskim wskaźnikiem IPI mieli znacznie lepsze całkowite przeżycie (OS), niż ci z grupy non-GCB (93% vs. 45%) (p = 0.020). Za pomocą tego algorytmu immunohistochemicznego możemy dokonać subklasyfikacji DLBCL na prognostycznie odrębne podgrupy i udoskonalić rokowanie w oparciu o IPI. Aktualna klasyfikacja WHO 2017 chłoniaków DLBCL uwzględnia pochodzenie komórek (COO) według algorytmu Hansa, jako ważny czynnik rokowniczy i predykcyjny i wymagane jest ono w rutynowej ocenie subklasyfikacyjnej tych chłoniaków.

Jako kontynuacja badań na chłoniakiem DLBCL we współpracy z wymienionymi na wstępie podrozdziału jednostkami i instytucjami, została oceniona ekspresja HLA-G i HLA klasy II oraz polimorfizmy genu *HLA-G* (projekt NCN N N402685940) oraz genu *IKZF1* (projekt NCN 2013/09/N/NZ5/00822) w korelacji z rokowaniem u pacjentów z DLBCL.

W pracy *„**Jesionek-Kupnicka D,** Bojo M, Prochorec-Sobieszek M, Szumera-Ciećkiewicz A, Jabłońska J, Kalinka-Warzocha E, Kordek R, Młynarski W, Robak T, Warzocha K, Lech-Maranda E. HLA-G and MHC Class II Protein Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2016; 64(3): 225-40. (IF-2,464; MSNiW-25"* badania nad DLBCL zostały rozszerzone o analizę ekspresji immunohistochemicznej ludzkiego antygenu leukocytu-G (HLA-G) i białka HLA klasy II w korelacji z przebiegiem klinicznym choroby w dobrze scharakteryzowanej klinicznie grupie 148 pacjentów z DLBCL. Zgodnie z naszą wiedzą, po raz pierwszy wykazaliśmy związek pomiędzy ekspresją białka HLA-G a przebiegiem klinicznym pacjentów z DLBCL. Ponadto wykazaliśmy związek między utratą ekspresji białka HLA-G i HLA klasy II i gorszym przeżyciem pacjentów leczonych immunochemioterapią. Pacjenci z ujemną ekspresją HLA-G w komórkach chłoniaka wykazywali mniejsze prawdopodobieństwo osiągnięcia całkowitej remisji (p = 0.040) oraz tendencje w kierunku niższego 3-letniego całkowitego przeżycia (OS) w porównaniu z pacjentami z dodatnią ekspresja HLA-G (p = 0.080). Szacowany 3-letni odsetek OS pacjentów leczonych dodatkowo immunoterapią (Rytuksymab) był również niższy u pacjentów HLA-G negatywnych, niż u pacjentów HLA-G pozytywnych (47% vs. 73%) (p = 0.030). U pacjentów z negatywną ekspresją HLA klasy II, 3-letni okres przeżycia OS był niższy w porównaniu do pacjentów z pozytywną ekspresją (p = 0.040). Utrata ekspresji HLA klasy II (p = 0.050) i przynależność do grupy pośredniego/wysokiego i wysokiego ryzyka wg. IPI (*ang.* intermediate high/high-risk IPI) (p = 0.001) były niezależnymi czynnikami zwiększającymi ryzyko zgonu pacjentów. Ekspresja HLA klasy II zachowała również swoją wartość prognostyczną u pacjentów otrzymujących Rytuksymab

(immunoterapia): 3-letnie OS wynosiło 30% u pacjentów z ujemnym wynikiem ekspresji HLA klasy II versus 65% u pacjentów z dodatnią ekspresją HLA klasy II (p = 0.040).

Praca *„Bielska M, Bojo M, Klimkiewicz-Wojciechowska G,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Borowiec M, Kalinka-Warzocha E, Prochorec-Sobieszek M, Robak T, Warzocha K, Młynarski W, Lech-Maranda E. Human leukocyte antigen-G polymorphisms influence the clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. Genes Chromosomes Cancer. 2015;54(3):185-93. (IF- 3,960; MNiSW-30)"* dotyczyła badania istotnych funkcjonalnie polimorfizmów genów *HLA-G*, został wykazany istotny wpływ polimorfizmów *HLA-G*-725C/G/T i *HLA-G* 14-bp na występowanie i przebiegu klinicznym DLBCL w populacji polskiej w grupie 207 pacjentów z DLBCL i w 150-osobowej grupie kontrolnej. Stwierdzono istotną różnicę w rozkładzie genotypów polimorficznych *HLA-G* pomiędzy pacjentami i kontrolami. Częstotliwości genotypu *HLA-G*-725GG lub *HLA-G*-725GC były niższe, a genotypu insuliny *HLA-G* ins/ins był wyższy u pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną. Różnice rokownicze dotyczące całkowitego przeżycia (OS) pozwoliły na wyodrębnienie pacjentów grupy niskiego ryzyka (*ang.* LR, low risk) z genotypem *HLA-G*-725CC i del *HLA-G*/ins lub *HLA-G* genotyp ins/ins oraz grupa wysokiego ryzyka (*ang.* HR, high risk) z innym polimorfizmem *HLA-G*. Pacjenci z grupy genotypowej HR mieli krótszy OS niż pacjenci z grupy LR (p=0.001). Ponadto u pacjentów, którzy wykazywali homozygotyczny *HLA-G* del / del było niższe prawdopodobieństwo OS niż u tych z delecją/insercją HLA-*G* (del/ins) lub genotypem *HLA-G* ins/ins (p=0.009). W analizie wieloczynnikowej dostosowanej do międzynarodowego indeksu prognostycznego (IPI), zarówno pośrednia wysoka/wysoka grupa ryzyka IPI (p <0.001), jak i grupa genotypowa *HLA-G* HR (p=0.004) wykazują niezależnie zwiększone ryzyko śmierci. Jest to pierwsze badanie wskazujące na istotną rolę polimorfizmów *HLA-G* w przebiegu klinicznym DLBCL. Potencjalny wpływ polimorfizmów *HLA-G* na podatność na DLBCL zasługuje więc na dalsze badania.

Badanie *„Bielska M, Borowiec M,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Braun M, Bojo M, Pastorczak A, Kalinka-Warzocha A, Prochorec-Sobieszek M, Robak T, Warzocha K, Młynarski W, Lech-Marańda E. Polymorphism in IKZF1 gene affects clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. Int. J. Hematol. 2017;106(6): 794-800. (IF- 1,942; MNiSW-20)"* dotyczyło oceny, czy dany wariant genu *IKZF1* może mieć wpływ na ryzyko i przebieg kliniczny DLBCL. Grupa badana składała się z 218 pacjentów z DLBCL i 715-osobowej grupy kontrolnej z zastosowaniem testu dyskryminacji allelicznej TaqMan. *IKZF1* koduje czynnik transkrypcji zaangażowany w dojrzewanie i różnicowanie komórek B. Pomimo, że nie obserwowano statystycznej różnicy w dystrybucji genotypu polimorfizmu *IKZF1* rs4132601 między pacjentami z DLBCL a grupą kontrolną, to jednak pacjenci z genotypem *IKZF1* TT wykazywali niższy 2-letni czas przeżycia wolnego od progresji (*ang.* PFS, Progression-Free Survival) w porównaniu do tych z genotypem *IKZF1* G + (54% vs. 69%). Gdy analiza była ograniczona do pacjentów z wzorcem typu GCB, pacjenci z genotypem *IKZF1* TT osiągnęli niższe 5-letnie całkowite przeżycie (OS) niż pacjenci z

genotypami IKZF1 G + (20% vs. 56%). Badanie to stanowi pierwszy dowód na związek wariantów *IKZF1* z rokowaniem w DLBCL.

5.2.3. Przewlekła białaczka limfocytowa/chłoniak z małych limfocytów (CLL/SLL, chronic lymphocytic leukemia/small cell lymphoma).

Badania polimorfizmu genów dotyczyły również przewlekłej białaczki limfocytowej:

*„Jamroziak K, Szemraj Z, Grzybowska-Izydorczyk O, Szemraj J, Bieniasz M, Cebula B, Giannopoulos K, Balcerczak E, **Jesionek-Kupnicka D**, Kowal M, Kostyra A, Całbecka M, Wawrzyniak E, Mirowski M, Kordek R, Robak T. CD38 gene polymorphism contribute to genetic susceptibility to B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence from two case-control studies in Polish Caucasians. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2009; 18(3):945-953. (IF-4,310; MNiSW 32".* Genotypowanie polimorfizmu genów za pomocą testów opartych na PCR u 460 polskich pacjentów rasy białej z B-CLL i 503-osobowej grupie kontrolnej dobranej pod względem płci i wieku wykazało, że SNPs CD38 rs6449182 i rs1800561 wpływa na ekspresję CD38 w komórkach B-CLL i przyczynia się do predyspozycji do B-CLL.

Następne prace dotyczyły badań związanych z neoangiogenezą:

*Praca „Szmigielska-Kapłon A, **Jesionek-Kupnicka D**, Góra-Tybor J, Błoński JZ, Lech-Marańda E, Kordek R, Kasznicki M, Robak T. Influence of cladribine alone and in combinaton with cyclophosphamide or cyclophosphamide and mitoxantrone on bone marrow angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia. Leuk. Lymphoma 2007: Vol. 48, nr 5, s. 1042-1044. (IF-1,512; MNiSW-15)"* , której celem była ocena wpływu kladrybiny, analogu nukleozydu, na angiogenezę szpiku kostnego u pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową (CLL). W badaniu wzięło udział 14 pacjentów z wcześniej nieleczonymi CLL. Zaobserwowaliśmy, że średnia gęstość mikronaczyń szpiku kostnego (MVD) była istotnie zmniejszona u pacjentów z CLL reagujących na kladrybinę. Nasze wyniki sugerują możliwy antyangiogenny wpływ kladrybiny. I następnie w pracy *„Szmigielska-Kapłon A, Lech-Maranda E, **Jesionek-Kupnicka D**, Góra-Tybor J, Błoński JZ, Kasznicki M, Kordek R, Robak T. Prognostic value of the bone marrow microvessel density in progressive B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma. 2010;51(7):1351-1353. (IF-2,492; MNiSW-20"* celem była ocena znaczenia rokowniczego MVD w szpiku kostnym u pacjentów z CLL w grupie 75 przypadków. Wzrost MVD był wyższy w chorobie zaawansowanej w porównaniu z kontrolą, jednak nie wydawał się wpływać na odpowiedź na analogi puryn lub na przeżycia pacjentów. W kolejnej pracy *„Góra-Tybor J, Jamroziak K, Szmigielska-Kapłon A, Krawczyńska A, Lech-Marańda E, Wierzbowska A, **Jesionek-Kupnicka D**, Błoński J, Robak T. Evaluation of circulating endothelial cells as noninvasive marker of angiogenesis in patients with chronic lymphocytic leukemia. Leuk. Lymphoma.2009; (1):62-67. (IF-2,397; MNiSW- 20)"* celem była ocena liczby krążących komórek śródbłonka (CECs, *circulating endothelial cells*) oraz ich subpopulacji (*resting* (rCECs), *activated* (aCECs), *apoptotic* (apoCECs) and *circulating precursor endothelial cells* (CPECs) we krwi obwodowej metodą cytometrii przepływowej u 104 pacjentów z CLL i 29 zdrowych dawców, stwierdziliśmy istotnie wyższą

liczbę wszystkich subpopulacji u pacjentów z CLL niż u zdrowych osób z grupy kontrolnej (p <0.001) w korelacji z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego. Pomimo tego, że średnia gęstość mikronaczyń (MVD) była znamiennie wyższa w szpiku kostnym pacjentów z CLL w porównaniu z grupą kontrolną nie znaleźliśmy korelacji między MVD i różnymi populacjami CEC. Liczba CEC jest zwiększona w CLL i koreluje z etapem choroby, ale nie wydaje się bezpośrednio odzwierciedlać intensywności neowaskularyzacji w szpiku kostnym.

Natomiast w pracy *„Jamroziak K, Grzybowska-Izydorczyk O, **Jesionek-Kupnicka D**, Góra-Tybor J, Robak T. Poor prognosis of Hodgkin variant of Richter transformation in chronic lymphocytic leukemia treated with cladribine. Br. J. Haematol. 2012;158(2): 286-288. (IF- 4,942; MNiSW-35)"* dotyczącej analizy zespołu Richtera w przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL/SLL) wykazaliśmy, że progresja w postaci chłoniaka Hodgkina charakteryzuje się gorszym rokowaniem u pacjentów leczonych kladrybiną, analogiem nukleozydów purynowych (ang. PNAs, purine nucleoside analogs).

5.2.4. Chłoniak Hodgkina (*ang.* CHL, Classical Hodgkin lymphoma)

Wczesne badania (przed doktoratem) dotyczyły chłoniaka Hodgkina, proliferacji komórek Reed-Sternberga i Hodgkina (RS-H) oraz koekpsresji LMP1 i białka proapoptotycznego BCL2 w pracach:

*„Kordek R, Biernat W, Niewiadomska H, **Kupnicka D**, Woźniak L, Domagała W, Osborn M. Percentage of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive Reed-Sternberg cells in nodular sclerosis Hodgkin's disease. Patol Pol. 1993;44(3):129-31(IF-0; MNiSW- 5)"* oraz

*„Kordek R, Biernat W, **Kupnicka D**, Woźniak L. Expression of bcl-2 protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein in Hodgkin's disease. Pol J Pathol. 1994;45(4):279-81. (IF-0; MNiSW- 5)"*

W dalszej części jako kontynuacja mojej pracy doktorskiej, w artykule ***„Jesionek-Kupnicka D**, Berger F, Jubin B, Bryon PA, Woźniak L. Detection of EBV mRNA in nodular sclerosis type of Hodgkin's disease using in situ hybridization with EBER 1 and EBER 2 probes with regard to the immunophenotype of Reed-Sternberg cells. Pol J Pathol. 1995;46(2):71-5. (IF-0; MNiSW- 5)"* opisaliśmy ekspresję mRNA EBV wirusa, przy użyciu nowatorskiej w tamtych czasach metody hybrydyzacji *in situ* (ISH, *in situ hybridization*) na tkankach nowotworu, z użyciem komplementarnej sondy RNA EBER 1 i EBER2 (*ang.* EBV-encoded RNA) wirusa w korelacji z białkami LMP1 oraz EBNA2. Praca została wykonana na Uniwersytecie Edouard Herriot w Lyonie, we Francji. Nasze badanie oprócz zaaplikowania nowatorskiej metody ISH wykazało, że typowy dla CHL fenotyp utajonej infekcji wirusem EBV na komórkach Read-Sternberga (RSC) ma wzorzec LMP1(+)/EBNA2(-), ekspresja EBER dotyczyła 32 % przypadków najczęstszego podtypu stwardnienia guzkowego (*ang.* NS, nodular sclerosis) cHL, immunohistochemiczna ekspresja LMP1 silnie koreluje z EBV RNA w komórkach RSC. Obecnie to przeciwciało jest szeroko wykorzystywane w panelu przeciwciał do diagnozy chłoniaków Hodgkina (*ang.* cHL, classical Hodgkin lymphoma) i non-Hodgkin (*ang.* NHL, Non-Hodgkin lymphoma). Metoda hybrydyzacji *in situ* EBER jest aktualnie stosowana z użyciem komercyjnych sond tkankowych,

koniecznych w identyfikacji limfoproliferacji EBV- zależnych takich jak: pozawęzłowy chłoniak typu nosowego z komórek T (*ang.* ENTCL, Extranodal nasal-type T-cell lymphoma), chłoniak rozlany z dużych komórek B związany z wirusem EBV (*ang.* EBV-related DLBCL), ziarnianikowatość limfoidalna (*ang.* LG, lymphogranulomatous granulomatosis), choroby limfoproliferacyjne po przeszczepach (*ang.* PTLD, post-transplanant lymphoproliferative disorders).

W dalszej pracy *„Kordek R, **Jesionek-Kupnicka D,** Biernat W, Woźniak L. Expression of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. Age and subtype distribution in Polish patients. Acta Haematol Pol. 1996;27(1):15-20. (IF-0; MNiSW-4)"* skupiliśmy się na ocenie nadekspresji białka LMP1 (*Latent membrane Protein 1*) związanego z infekcją utajoną wirusa EBV, która bierze udział w etiopatogenezie chłoniaka Hodgkina i innych chłoniaków non-Hodgkin (*ang.* NHL, non-Hodgkin lymphoma), ze względu na dystrybucje w zależności od podtypu i wieku pacjentów. Na 135 przypadkach chłoniaka Hodgkina (poprzednia nazwa to *ang.* HD, Hodgkin's disease) ekspresja LMP1 wynosiła 33%, największa dotyczyła podtypu mieszanokomórkowego (*ang.* MC, mixed cellularity) (62%) oraz u młodszych pacjentów. Różnice między immunopozytywnością LMP w podtypach MC i NS były statystycznie istotne u dzieci i młodych dorosłych ($p < 0.01$).

5.3. Rak żołądka i jelita grubego

Cykl prac dotyczących raka żołądka, we współpracy z Kliniką Chirurgii Onkologicznej Katedry Onkologii w Łodzi i następnie z Zakładem Biochemii Farmaceutycznej, UMED w Łodzi dotyczył próby wyodrębnienia czynników biologicznych, które mogą wpływać na rokowanie. Początkowo celem naszych badań było określenie zależności między indeksem apoptotycznym (*ang.* AI, apoptotic index) a innymi cechami kliniczno-patologicznymi takimi jak indeks proliferacyjny Ki-67 (*ang.* Ki-67 LI, labeling index), gęstość naczyń w obrębie guza (*ang.* MVD, microvessel density) oceniana przy pomocy barwienia immunohistochemicznego anty-CD34, ekspresja p53, stopień złośliwości (*ang.* G, Grade), typ histologiczny oraz cechami związanymi ze stopniem zaawansowania jak: głębokość inwazji nowotworu i status węzłów chłonnych.

W pracy *„Tenderenda M, Rutkowski P, **Jesionek-Kupnicka D,** Kubiak R. Expression of CD34 in gastric cancer and its correlation with histology, stage, proliferation activity, p53 expression and apoptotic index. Pathol Oncol Res. 2001;7(2):129-34. (IF-0; MNiSW-0)"* u 58 pacjentów z gruczolakorakiem żołądka wykazaliśmy istotnie statystyczną korelację między MVD i dwoma głównymi parametrami histologicznymi: stopniem złośliwości (G) ($p < 0.001$) i typem histologicznym nowotworu według klasyfikacja Laurena ($p < 0.050$). Natomiast nie udało się nam znaleźć istotnej korelacji między MVD i innymi badanymi cechami takimi jak indeks proliferacyjny (Ki-67 LI) oraz indeks apoptotyczny (AI).

W kolejnej *pracy „**Jesionek-Kupnicka D,** Tenderenda M, Rutkowski P. Extent of spontaneous apoptosis in gastric cancer in relation to proliferative index, p53 expression, CD34 expression and histopathological features. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2002;21(3): 371-375. (IF- 0.703, MNiSW-8)" w*

grupie 49 przypadków gruczolakoraka żołądka: 30 typu jelitowego i 19 typu rozlanego, znaleźliśmy istotną zależność pomiędzy indeksem apoptotycznym (AI), i proliferacyjnym Ki-67 (Ki-67 LI) a stopniem złośliwości (G). Istotnie wyższy AI zaobserwowaliśmy w guzach G1-G2 w porównaniu do G3 ($p < 0.050$) oraz w guzach o wysokim potencjale proliferacyjnym. Nie wykazaliśmy natomiast widocznej korelacji pomiędzy AI, histopatologicznym typem raka żołądka, stanem węzłów chłonnych i immunoreaktywnością p53 i CD34.

Następnie we współpracy z Prof. Markiem Mirowskim i Dr Ewą Balcerczak z Zakładu Biochemii Farmaceutycznej UMED w Łodzi badania rozszerzyliśmy o zaburzenia molekularne w raku żołądka o ocenę ekspresji genu *P65* oraz polimorfizmu genu *ABCB1* w korelacji ze stopniem złośliwości (G), typem histologicznym oraz cechami związanymi ze stopniem zaawansowania jak: głębokość inwazji nowotworu i status węzłów chłonnych.

W pracy *„Balcerczak E, Jankowski T, Becht A, Balcerczak M, Janiuk J,* ***Jesionek-Kupnicka D****, Sztompka J, Mirowski M. Expression of the P65 gene in gastric cancer and in tissues with or without Helicobacter pylori infection. Neoplasma 2005;52(6): 464-468. (IF- 0,731; MNiSW- 10)"*, w której stwierdziliśmy, że w grupie raków żołądka ekspresja genu *P65* (oceniana metodą RT-PCR) wiązała się ze złymi cechami kliniczno-patologicznymi, takimi jak T3, przerzuty do węzłów chłonnych i odległe przerzuty. Nie było zależności między ekspresją genu *P65* a zakażeniem bakterią *Helicobacter pylori.* Nasze badania wykazały, że ekspresja genu *P65* wiązała się z większym zaawansowaniem klinicznym u pacjentów z rakiem żołądka niezależnie od infekcji *H. pylori.*

Następna praca *„Żebrowska M, Salagacka A, Jelen A,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Mirowski M, Balcerczak E. Is the ABCB1 gene associated with the increased risk of gastric cancer development? --preliminary research. Pathol Res Pract.2014;210(12):872-878. (IF- 1,397; MNiSW-20)"* dotyczyła wstępnych badań polimorfizmu genu *ABCB1* w 19 próbkach tkankowych raka żołądka, kodującego białko transbłonowe glikoproteinę P (P-gp), które może być związane z predyspozycją do rozwoju raka. W przypadku SNP na pozycjach 1236, 2677 i 3435 nie zostały znalezione statystycznie istotne różnice w częstości genotypów między pacjentami z rakiem żołądka a osobami zdrowymi. Jednak genotyp TT dla wszystkich badanych polimorfizmów występował częściej w grupie pacjentów z rakiem żołądka niż w grupie osób zdrowych. Zmutowana homozygota TT dla SNP w pozycjach 1236, 2677 i 3435 występowała częściej w podgrupie pacjentów z rakiem *in situ* (Tis) lub grupą stagingową I wg. TNM (SNP 1236 $p = 0.076$, SNP 2677 $p = 0.081$, SNP 3435 $p = 0.076$) niż w podgrupie pacjentów w grupie stagingowej II lub III. Również poziomy ekspresji były najniższe (mediana 0.740) w grupie pacjentów z mniej zaawansowanym stadium klinicznym raka (Tis lub grupa stagingowa I). Wstępne badania wykazały, że polimorfizmy genu *ABCB1* w pozycjach 1236, 2677 i 3435 nie były związane ze zwiększoną podatnością na rozwój raka żołądka. Mogą one jednak być związane z hamowaniem progresji raka żołądka.

Najnowsza praca *„Wojas-Krawczyk K, Kalinka-Warzocha E, Reszka K, Nicoś M, Szumiło J, Mańdziuk S, Szczepaniak K,* ***Kupnicka D,*** *Lewandowski R, Milanowski J, Krawczyk P. Analysis of KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA mutations could predict metastases in colorectal cancer: A preliminary study. Adv Clin Exp Med. 2018 Aug 7. doi: 10.17219/acem/76162. (IF- 1,262; MNiSW-15)"* dotyczyła analizy mutacji „napędzających" (*ang.* driver mutations) w genach *KRAS, NRAS, BRAF* i *PIK3CA* u 102 pacjentów z rakiem jelita grubego (*ang.* CRC, colorectal Cancer) w różnym stadium zaawansowania klinicznego. Grupa badana pochodziła z naszego ośrodka łódzkiego oraz z Lublina. Czterdziestu sześciu pacjentów wykazało obecność badanych mutacji (45.1%). Mutacje występowały istotnie częściej w przerzutach niż w guzach pierwotnych (p = 0.039) z powodu dużej częstości występowania mutacji genu *KRAS* w przerzutach. Mutacje *BRAF* i *PIK3CA* znaleziono tylko w pierwotnych guzach. Częstość występowania mutacji *PIK3CA* była istotnie wyższa (11.77%) we wczesnym okresie zaawansowania choroby (1.96%, p = 0.05). Mutacje *NRAS* znaleziono tylko w raku z przerzutami (7.85%, p = 0.041). W raku odbytnicy wykryto tylko jedną mutację *PIK3CA* i brak mutacji *NRAS*. Wyniki wskazują na nieczęste występowanie mutacji napędzających u polskich pacjentów z CRC, obejmujących również mutacje w rzadko badanych genach. Szerszy zakres panelu mutacji mógłby przyczynić się do stworzenia lepszej metody kwalifikacji pacjentów do terapii celowanych molekularnie i uzyskania lepszego wyniku dla tych strategii terapeutycznych.

5.4.Poszukiwanie pierwotnej lokalizacji nowotworów przerzutowych w wątrobie i podstawowy algorytm diagnostyczny.

Badanie we współpracy z Zakładem Diagnostyki Obrazowej Ośrodka Onkologicznego, Szpitala im. Kopernika w Łodzi dotyczyło opracowania algorytmu diagnostycznego w poszukiwaniu ogniska pierwotnego nowotworów przerzutowych w wątrobie, na podstawie biopsji wątroby, z użyciem panelu barwień immunohistochemicznych, tę problematykę opisaliśmy w pracy poglądowej *„Sztajer S,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Kordek R. Nowotwory w wątrobie - poszukiwanie pierwotnej lokalizacji i podstawowy algorytm diagnostyczny. Onkol. Pol. 2003;6(4):173-182. (IF-0; MNiSW-1)".*

Wyniki pracy opublikowaliśmy w artykule *„**Kupnicka DJ**, Sztajer S, Kordek R, Piekarski J. Comparison of core and fine needle aspiration biopsies for diagnosis of liver masses. Hepato-Gastroenterology 2008; 55(86/87):1710-1715. (IF-0,680; MNiSW-15)."* Badanie dotyczyło 116 pacjentów z guzem wątroby, u których w celach diagnostycznych pod kontrolą USG została wykonana biopsja cienkoigłowa celowana (*ang.* FNAB, *Fine needle aspiration biopsy*) oraz biopsja gruboigłowa (*ang.* CB, *core biopsy*). Rozpoznania histopatologiczne raków potwierdzono panelem immunohistochemicznym (IHC) (CK7, CK19, CK20 i Hepatocyte). W 83 na 116 przypadków (71%) oba rozpoznania cytologiczne i histopatologiczne były jednoznaczne. W 15 przypadkach rozpoznanie ustalono wyłącznie na podstawie jednego badania. W 13 przypadkach rozpoznanie histopatologiczne było przeciwne (zmiana złośliwa vs. łagodna) do rozpoznania cytologicznego. W 27 przypadkach badanie histopatologiczne z IHC

umożliwiło nam uzyskanie bardziej precyzyjnego rozpoznania niż badanie cytologiczne. W jednym przypadku ustalenie rozpoznania nie było możliwe z powodu "nie-diagnostycznego" materiału z obu biopsji. Pomimo jednoczesnego stosowania obu metod udało nam się ustalić rozpoznanie jednoznaczne tylko w 29% przypadków złośliwych. Chociaż CB dostarczyła więcej informacji i dokładniejszych informacji niż FNAB, najbardziej kompletne wyniki uzyskano przy użyciu obu metod łącznie. Praca ta przyczyniła się do szerokiego zastosowania biopsji gruboigłowej do oceny histopatologicznej zmian w wątrobie w naszym Ośrodku Onkologicznym, Szpitala im. Kopernika w Łodzi, wraz z panelem immunohistochemicznym, który jest stale poszerzany w praktycznej diagnostyce.

5.5. Dermatopatologia.

We współpracy z doktor Heleną Rotsztejn z Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi (aktualnie z Wydziału Kosmetologii UMED w Łodzi) powstał cykl prac z zakresu dermatopatologii, oceniających liczbę komórek dendrytycznych Langerhansa i Ki-67 w łuszczycy przed i po fototerapii oraz komórek dendrytycznych w raku podstawnokomórkowym, liszaju twardzinowym i raku płaskonabłonkowym sromu. Wcześniejsza praca dotyczyła apoptozy w liszaju twardzinowym sromu.

W pracy *„Rotsztejn H, **Jesionek-Kupnicka D,** Zalewska A, Łukaszek S. Apoptoza w liszaju twardzinowym sromu u kobiet w okresie menopauzy. Prz. Menopauz. 2005;4(3): 25-28. (MNiSW- 4)"* stosując metodę TUNEL wykazaliśmy nasilenie indeksu apoptotycznego komórek nabłonka we wczesnej fazie zmian w liszaju twardzinowym sromu (LS, *lichen sclerosus*) w porównaniu z fazą zmian późnych u 17 kobiet, co przemawia za tym, że apoptoza leży u podstaw patomechanizmu ścieńczenia nabłonka w LS.

Następnie w pracach *„Rotsztejn H, Trznadel-Budźko E, **Jesionek-Kupnicka D.** Langerhans cells in vulvar lichen sclerosus and vulvar squamous cell carcinoma. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2006; 54(5): 363-366. (IF- 1,635; MNiSW- 10)"* oraz *„Rotsztejn H, Trznadel-Budźko E, **Jesionek-Kupnicka D.** Do Langerhans cells play a role in vulvar epithelium resistance to squamous cell carcinoma? Arch. Immunol. Ther. Exp. 2007;55 (2): 127-130. (IF -1,635; MNiSW-10)"* wykazaliśmy obniżenie liczby komórek dendrytycznych Langerhansa (*ang.* LC, Langerhans cells) CD1a pozytywnych w badaniu IHC w 22 przypadkach liszaja twardzinowego sromu oraz u 13 kobiet z rakiem płaskonabłonkowym (*ang.* SCC, squamous cell carcinoma) sromu w porównaniu ze skórą niezmienioną sromu kobiet w grupie kontrolnej. Ponadto wykazaliśmy obniżenie liczby komórek LC w raku podstawnokomórkowym (*ang.* BCC, Basal cell carcinoma) skóry w porównaniu z tkanką otaczającą [*Rotsztejn H, **Jesionek-Kupnicka D,** Trznadel-Budźko E. Decreased number of Langerhans cells in basal cell carcinoma. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2008; Jul: 1-2. (IF-2,276; MNiSW- 20)*]. Celem badania *„Rotsztejn H, Chomiczewska D, Trznadel-Grodzka E, **Jesionek-Kupnicka D.** Density of Langerhans cells in chronic plaque psoriatic lesions before and after phototherapy. Cent. Eur. J. Immunol.2012;38 (3):1644-4124. (IF- 0,378 ; MNiSW-15)"* była ocena gęstości LC (przeciwciało anty-CD1a) w zmianach skórnych u pacjentów z

łuszczycą zwykłą, przed i po fototerapii (szerokopasmowa UVB, wąskopasmowa terapia UVB lub PUVA) u 25 pacjentów. Liczba LC w badanej grupie była mniejsza w skórze zmienionej w porównaniu ze skórą poza zmianami. Po fototerapii zaobserwowaliśmy wzrost liczby LC w zmianach skórnych, natomiast spadek liczby LC w skórze poza zmianami po leczeniu PUVA. Nasze badanie wykazało niewielką liczbę LC w zmianach łuszczycowych, natomiast zwiększoną w skórze poza zmianami. Największy wzrost liczby LC zaobserwowano w skórze łuszczycowej po leczeniu BB-UVB i PUVA, niewielki wzrost - po terapii NB-UVB. Badania te wykazały, że rozregulowanie układu odpornościowego skóry (*ang.* SIS, skin immune system) może prowadzić do supresji LC w nabłonku i może być jedną z przyczyn wyższej tendencji do powstawania nowotworów w skórze sromu, również na podłożu liszaja twardzinowego.

W kolejnym badaniu *„**Jesionek-Kupnicka D**, Chomiczewska-Skóra D, Rotsztejn H. Influence of phototherapy in psoriaris on Ki-67 antigen expression: a preliminary study. Pol. J. Pathol. 2013; 2: 96-103. (IF- 0,832; MNiSW -15)"* opisaliśmy znamienne obniżenie indeksu proliferacyjnego Ki-67 ($p < 0.010$) w skórze u 10 pacjentów z łuszczycą plackowatą przed- i po zastosowaniu jednej z trzech metod fototerapii: szerokopasmowej UVB, wąskopasmowej UVB lub PUVA. Największy spadek zaobserwowaliśmy po zastosowaniu terapii PUVA ($p < 0.050$). W skórze w okolicy zmian łuszczycowych nie zaobserwowaliśmy znaczących różnic w odniesieniu do ekspresji antygenu Ki-67 przed lub po fototerapii. Badanie wskazuje, że indeks proliferacyjny, obok wskaźnika PASI *(ang.* Psoriasis Area and Severity Index*)* może być dobrym miernikiem efektywności leczenia zmian skórnych w łuszczycy.

5.6. Rak piersi i inne nowotwory ginekologiczne

W badaniach nad rakiem piersi, najczęstszym nowotworem u kobiet, zajmowaliśmy się zespołowo określaniem różnych potencjalnych markerów rokowniczych w korelacji z TNM i czynnikami biologicznymi (ER, PR, HER2, Ki67). Na początku powstały dwa artykuły- pierwszy z nurtu badań nad angiogenezą, gęstością mikronaczyń w guzie (MVD), które również później oceniałam w raku żołądka i w przewlekłej białaczce limfocytowej oraz praca dotycząca oceny transkryptu genu *P65* (ocenianego przez nas również w raku żołądka) i *C-ERBB2 metodą RT-PCR.*

W badaniu *„Kubiak R, Miszczak-Zaborska E, **Jesionek-Kupnicka D**, Greger J. The activity of thymidine phosphorylase correlates with tumor size and lymph nodes status in breast carcinoma. Z Naturforsch C. 1999;54(12):1096-102. (IF- 0,748; MNiSW-8)"* oceniliśmy spektrofotometrycznie aktywność fosforylazy tymidynowej (dThdPase) w 43 przypadkach raka piersi i w 19 przypadkach nienowotworowych tkanek piersi. Fosforylaza tymidynowa jest enzymem zaangażowanym w metabolizm nukleozydów pirymidynowych, homologiem płytkowego czynnika wzrostu komórek śródbłonka (*ang.* PD-ECGF, platelet-derived endothelial cell growth factor), jest jednym z ważnych potencjalnych czynników angiogennych. Wykazaliśmy 6-krotnie wyższą statystycznie aktywność dThdPasy w raku piersi niż w tkance nienowotworowej, korelowała ona ze statusem węzłów chłonnych

(N) oraz wielkością guza (T). Natomiast nie wykazaliśmy korelacji aktywności enzymu ze średnią gęstością mikronaczyń w guzie (MVD) oszacowanej za pomocą immunohistochemii anty-CD31.

W pracy *„Balcerczak E, Mirowski M, **Jesionek-Kupnicka D,** Bartkowiak J, Kubiak R, Wierzbicki R. P65 and c-erbB2 genes expression in breast tumors -comparison with some histological typing, grading and clinical staging. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2003; 22 (2):421-427. (IF- 0,574; MNiSW-8)"* została oceniona wartość prognostyczna genu *P65 i C-ERBB2*, który jest członkiem rodziny receptorów ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER/EGFR/ERBB). W grupie 47 pacjentek z naciekającym rakiem piersi G3 ekspresja RT-PCR P*65* korelowała z małym zaawansowaniem klinicznym, bez przerzutów do węzłów chłonnych, przeciwnie, ekspresja *C-ERBB2* korelowała a wyższym stadium zaawansowania i z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych. Pomiędzy oboma genami (*P65 i C-ERBB2*) znaleziono przeciwną zależność. Poziomy ekspresji mRNA obu genów nie wykazywały korelacji ze statusem receptora estrogenowego (*ang.* ER, estrogen receptor) i progesteronowego (*ang.* PR, progesteron receptor). Co więcej ekspresja *C-ERBB2* była wyższa w chorobie proliferacyjnej tkanki gruczołowej piersi. Odwrotnie w późniejszym badania w raku żołądka, ekspresja genu *P65* była związana z większym zaawansowaniem klinicznym niezależnie od infekcji H. pylori (podrozdział 5.3. Rak żołądka i jelita grubego).

Analiza ekspresji genów w technologii mikromacierzy cDNA pozwoliła zidentyfikować odrębne grupy raków piersi. Guzy bez ekspresji ER można podzielić na trzy podgrupy: podtyp "*basal-like*", podtyp HER2-dodatni i "*normal breast-like*". Podtyp "*basal-like*" charakteryzował się wysoką ekspresją keratyn 5 i 17, lamininy i białka 7 wiążącego kwasy tłuszczowe. Dlatego też w badaniu *„Kusińska R, Potemski P, **Jesionek-Kupnicka D,** Kordek R. Immunohistochemical identification of basal-type cytokeratins in invasive ductal breast carcinoma--relation with grade, stage, estrogen receptor and HER2. Pol J Path; 2005: 56(3):107-110. (IF-0; MNiSW-5)"* przeanalizowaliśmy przydatność immunohistochemii do wydzielenia podtypów raków przewodowych piersi i dostarczyliśmy dalej charakterystyki "podtypu basal-like". W 195 operacyjnych inwazyjnych rakach piersi wykonaliśmy barwienia immunohistochemiczne: HER2, ER/PGR, CK5/6 i CK17. Nasze badanie wykazało, że immunohistochemia jest przydatna do podziału raków piersi na odrębne podgrupy, ale należy przeprowadzić dalsze analizy w celu lepszej charakterystyki przypadków prezentujących dwa lub trzy markery.

Następnie we współpracy z dr Piotrem Potemskim z Kliniki Chemioterapii UMED w Łodzi oraz Prof. Andrzejem Bednarkiem z Zakładu Kancerogenezy Molekularnej UMED w Łodzi, powstał cykl 3 prac, w których byłam współautorem, dotyczących porównania ekspresji immunohistochemicznej (IHC) oraz RT-PCR ważnych markerów takich jak: Ki-67, receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (*ang.* HER2, Human epidermal growth factor receptor 2), cykliny E oraz oceny ich znaczenia

prognostycznego dla raka piersi w korelacji z uznanymi czynnikami prognostycznymi takimi jak obecność przerzutów w węzłach chłonnych, poziom ER oraz status nadekspresji IHC/amplifikacji HER2. W pierwszej z tego cyklu pracy *„Potemski P, Płuciennik E, Bednarek AK, Kusińska R, Kubiak R,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Watała C, Kordek R. Ki-67 expression in operable breast cancer a comparative study of immunostaining and a real-time RT-PCR assay. Pathol. Res. Pract. 2006;202(7): 491-495. (IF- 0,892; MNiSW-10) "* wykazaliśmy istotną, lecz słabo pozytywną korelację między ekspresją IHC Ki-67 a ekspresją mRNA (RT-PCR) (p = 0.005) w raku naciekającym piersi u 131 kobiet. Według naszej wiedzy, była to pierwsza praca porównująca ekspresję IHC i mRNA *Ki-67* w raku piersi. Wyższa ekspresja Ki-67 zarówno IHC jak i RT-PCR korelowała z wyższym stopniem złośliwości raka G3 (odpowiednio p <0.001 i p = 0.026), natomiast nie stwierdzono istotnego związku z wiekiem, stadium choroby, statusem węzłów chłonnych, receptora estrogenowego lub statusem HER2 ani z przeżyciem. W pracy nie została wykazana istotna wartość prognostyczna ekspresji Ki-67 ocenianej immunohistochemicznie (IHC) ani metodą RT-PCR.

Celem następnej pracy *„Potemski P, Płuciennik E, Bednarek AK, Kusińska R, Pasz-Walczak G,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Cezary Watała, Kordek R. A comparative assessment of HER2 status in operable breast cancer by real-time RT-PCR and by immunohistochemistry. Med. Sci. Monit. 2006;12(12): MT57-MT61. (IF- 1,* 595*; MNiSW- 10)"* była ocena ekspresji *HER2* za pomocą RT-PCR w porównaniu z ekspresją IHC u 131 kobiet z rakiem piersi. Występowała bardzo istotna różnica w średniej ekspresji względnej genu u pacjentek z immunohistochemicznie ocenianym statusem HER2-dodatnim i HER2-ujemnym (p <0.001). Przeżycia pacjentek z *HER2*-dodatnim wynikiem RT-PCR było gorsze we wszystkich przypadkach i w grupie z dodatnim węzłem. W analizie wieloczynnikowej status *HER2* był niezależnym czynnikiem prognostycznym u wszystkich pacjentek. RT-PCR w czasie rzeczywistym jest cenną metodą określania statusu *HER2*, ale kluczowy jest wybór punktu odcięcia względnej ekspresji genu, różnicującego guzy HER2-ujemne i dodatnie.

Badanie *„Potemski P, Płuciennik E, Bednarek A, Kusińska R,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Pasz-Walczak G, Watała C., Kordek R. Cyclin E expression in operable breast cancer quantified using real-time RT-PCR a comparative study with immunostaining. Jpn. J. Clin. Oncol. 2006; 36(3): 142-149. (IF- 1,376; MNiSW-10)"* wykazało znaczenie ekspresji IHC cykliny E w grupie 124 pacjentek z rakiem inwazyjnym piersi jako niezależny negatywny czynnik prognostyczny w grupie z dodatnim węzłem (p = 0.045) oraz z brakiem receptorów steroidowych i młodszym wiekiem pacjentek. Wykazaliśmy brak zgodności między RT-PCR i IHC w ocenie ekspresji cykliny E w raku piersi. Barwienie immunohistochemiczne wydaje się być bardziej wiarygodną metodą oceny cykliny E w komórkach raka piersi.

Nowsze badanie w raku piersi *„Kolacinska A, Cebula-Obrzut B, Pakula L, Chalubinska-Fendler J, Morawiec-Sztandera A, Pawlowska Z, Zawlik I, Morawiec Z,* ***Jesionek-Kupnicka D,*** *Smolewski P. Immune checkpoints: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and programmed cell death protein 1 in breast*

cancer surgery. Oncol Lett. 2015;10(2):1079-1086 (IF- 1.482; MNiSW-15)" dotyczyło oceny dwóch głównych punktów kontroli immunologicznej: cytotoksycznego antygenu limfocytów T 4 (*ang.* CTLA-4, the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) i zaprogramowanego białka 1 śmierci komórek (*ang.* PD-1, programmed cell death protein 1) w surowicy 35 pacjentek w stadium I i II raka piersi przy użyciu cytometrii przepływowej w porównaniu z próbkami kontrolnymi od 25 zdrowych, dopasowanych do wieku kobiet. Stężenia CTLA-4 i PD-1 w surowicy mierzono w trzech punktach czasowych: przedoperacyjnie, podczas znieczulenia po wycięciu węzłów wartowniczych (*ang.* SN, sentinel node) oraz 24 godziny po zabiegu. PD-1 wykazywało wyższą ekspresję u pacjentek z rakiem piersi przed operacją niż w grupie kontrolnej ($p < 0.001$) oraz w guzach T2 w porównaniu z guzami T1 przed operacją i śródoperacyjnie; różnice nie były jednak statystycznie istotne. Ponadto obserwowaliśmy zmniejszenie poziomów PD-1 po wycięciu SN z przerzutami, ale nie u pacjentek z SN-ujemnym ($p = 0.050$). Ujemną korelację obserwowano również między ekspresją PD-1 a stanem receptora progesteronu (PR) po operacji ($p = 0.024$). Wyniki te stanowiły podstawę do dalszych badań immunologicznych punktów kontrolnych w raku piersi.

Praca ta łączy się z moimi wcześniejszymi zainteresowaniami dotyczącymi oceny immunofenotypowej limfocytów naciekających tkankę guza (*ang.* TIL, tumor infiltrating lymphocyte) w różnych nowotworach litych, za pomocą cytometrii przepływowej. We wcześniejszej pracy *„**Jesionek-Kupnicka D**, Kulczycka D, Najder M, Olborski B, Kordek R. Analiza cytofotometryczna fenotypu limfocytów naciekających tkankę nowotworową w raku piersiowego, raku jelita grubego oraz raku żołądka w porównaniu z tkanką otaczającą i wybranymi cechami kliniczno-histopatologicznymi. Onkol. Pol.2002; 5(3/4):129-134. (IF- 0, MNiSW-2)" wykazaliśmy* różnice w zakresie subpopulacji limfocytów T helper (CD3/CD4), T cytotoxic (CD3/CD8) oraz NK (*ang.* natural killer) (CD56/16) naciekających tkankę nowotworową, w zależności od typu nowotworu w porównaniu z tkanką poza guzem. W raku piersi (31 przypadków) wykazaliśmy ujemną korelację między odsetkiem limfocytów a wielkością T guza, natomiast odsetek limfocytów CD3/CD4 korelował dodatnio z maksymalnym wymiarem guza (T). W raku jelita grubego (19 przypadków) wykazaliśmy ujemną korelacje między odsetkiem subpopulacji limfocytów pγδ (PGD) i stopniem złośliwości (G) oraz dodatnią korelację z wielkością guza (T). W raku żołądka (5 przypadków) nie wykazaliśmy istotnych statystycznie różnic w nacieku TIL.

W najnowszym badaniu *„Pluta P, **Jesionek-Kupnicka D**, Kubicka-Wołkowska J, Pluta A, Brzozowski K, Potemski P, Piekarski J, Kordek R, Jeziorski A. SMAC protein expression as a potent favorable prognostic factor in locally advanced breast cancer. Pol J Pathol. 2018;69(1):33-41(IF- 0.865; MNiSW15)"*, które dotyczyło oceny roli białka proapoptotycznego- drugiego aktywatora apoptozy pochodzącego z mitochondriów (*ang.* SMAC, second mitochondria-derived activator of apoptosis) w miejscowo zaawansowanym raku piersi (*ang.* LABC, local advanced breast carcinoma) u pacjentek leczonych neoadjuwantową chemioterapią (*ang.* NCT, neoadjuwant chemotherapy), potwierdziliśmy

potencjalną rolę ekspresji SMAC w LABC jako nowego korzystnego czynnika prognostycznego dla patologicznej całkowitej remisji (*ang.* pCR, pathological complete remission) i przeżycia wolnego od choroby (*ang.* DFS, disease free survival) u 56 pacjentek z zaawansowanym rakiem piersi bez przerzutów odległych (stopień IIB-pozytywne węzły chłonne i III), które otrzymały NCT, a następnie leczenie chirurgiczne i leczenie uzupełniające. Ekspresję IHC białka SMAC oceniliśmy w oligobiopsjach rutynowo pobranych z piersi pacjentek przed NCT i w próbkach chirurgicznych pobranych po zakończeniu NCT. Ekspresja SMAC była znacząco wyższa w próbkach raka piersi po NCT ($p < 0.010$). Wysoka ekspresja SMAC w oligobiopsji przed NCT korelowała z patologiczną całkowitą remisją (pCR, $p < 0.010$). Pacjentki z wysokim poziomem ekspresji SMAC w próbkach chirurgicznych po NCT miały dłuższy DFS.

W tej grupie pacjentek kontynuujemy badania w celu oceny ekspresji IHC innych białek związanych ze szklakiem apoptotycznym XIAP i Survivin w raku piersi.

Dwie prace dotyczyły nowotworów ginekologicznych, z czego pierwsza praca dotycztyła reklasyfikacji zaawansowania raków endometrium zgodnie z uaktualnionym systemem oceny zaawansowania wg. FIGO 2009 i druga oceny poziomów wybranych czynników proangiogennych u pacjentek leczonych operacyjnie z powodu różnych nowotworów ginekologicznych poddanych antybiotykoterapii okołoopercyjnej.

W badaniu *„Korczyński J, **Jesionek-Kupnicka D,** Gottwald L, Piekarski J. Comparison of FIGO 1989 and 2009 recommendations on staging of endometrial carcinoma: pathologic analysis and cervical status in 123 consecutive cases. Int J Gynecol Pathol. 2011;30(4):328-34. (IF-1,453; MNiSW- 30)"* dokonaliśmy reoceny wycinków z materiału pooperacyjnego u kolejnych 123 pacjentek z rakiem endometrium (*ang.* EC, endometrioid carcinoma) według nowego systemu oceny zaawansowania wg. Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa (*ang.* FIGO, Federation of Gynecology and Obstetrics) z 2009 roku w porównaniu z klasyfikacja poprzednią FIGO 1989 r. Najczęstszym typem EC jest rak endometrioidalny, występujący u 88% pacjentek. Analiza obejmowała rozkład EC w kategoriach wieku, stopnia złośliwości histologicznej (G) i zaawansowania chirurgicznego zgodnie z wytycznymi FIGO 1989 i 2009 wraz z analizą statystyczną i wykazała, że znaczna liczba pacjentek została przeniesiona do grupy stagingowej I: 78% vs. 57% ($p = 0.044$). Zmieniła się również liczba pacjentek w stadium II: 10% vs. 31% ($p = 0.001$). Pacjentki w stopniu II miały nowotwory G1 w 21 % według starej wobec 8% według nowej klasyfikacji ($p = 0.001$). Zauważyliśmy znaczący związek między stopniem złośliwości guza (G) i naciekaniem podścieliska szyjki macicy. Nowy system klasyfikacji dla EC wydaje się być ulepszonym instrumentem klasyfikacyjnym.

Celem badania *„Palatyńska-Ulatowska A, Michalska M, Łazarenkow A, Nawrot-Modrank J, Mirowski M, Palatyński A, **Jesionek-Kupnicka D.** Fibrinogen, bFGF and VEGF levels during antibiotic therapy in gynecologic cancer: a preliminary report. Indian J Biochem Biophys. 2014;51(3):230-236. (IF- 0,871;*

MNiSW-15" była ocena poziomów wybranych czynników proangiogennych, takich jak fibrynogen, czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) i zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) w surowicy pacjentek z nowotworami ginekologicznym w pierwszym, trzecim i szóstym dniu antybiotykoterapii, rutynowo podawanej jako leczenie okołooperacyjne. Ponadto zbadaliśmy stężenie w surowicy dimerów γ-γ i α-polimerów usieciowanej struktury fibryny oraz stopień wiązania bFGF z siecią fibrynową. Zaobserwowaliśmy wyższe poziomy bFGF, VEGF, a także fibrynogenu u pacjentów z nowotworami ginekologicznymi, w porównaniu do zdrowych kobiet. U pacjentów z nowotworem wzrosło stężenie α-polimerów i dimerów γ-γ sieci fibrynowej. Ponadto stwierdzono, że tylko frakcja dimerów γ-γ fibryny wiąże się z bFGF. Analiza immunohistochemiczna wykazała obecność bFGF w wyciętej tkance nowotworowej. Podsumowując, spadek proangiogennego poziomu bFGF i fibrynogenu w badaniu klinicznym pacjentów ginekologicznych może potwierdzić antyangiogenne właściwości wybranej antybiotykoterapii.

5.7. Podsumowanie dorobku naukowego

Dane bibliometryczne (stan na dzień 06 marca 2019 r.):

Suma punktów MNiSW oraz impact factor (IF) za publikacje naukowe w czasopismach (bez suplementów) wynosi **MNiSW -1246** oraz **IF-101,853** (z roku publikacji atykułu) w tym:

- **63** prac oryginalnych o łącznej wartości **MNiSW - 909** pkt, w tym **186** pkt jako pierwszy autor; **IF - 90,173**, w tym **14,525** jako pierwszy autor
- opisy przypadków -**7** prac z **MNiSW-127; IF -10,815**; oraz z **25** prac bez IF o łącznej wartości **MNSiW -172**
- prace poglądowe- **1** praca z **MNiSW- 15; IF- 0,865**; oraz **7** prac bez IF o łącznej wartości **MNiSW-23.**

W tym **4** publikacje oryginalne umieszczone w dysertacji o wartości **MNiSW - 85** punktów oraz współczynniku **IF - 6,768** punktów.

Dodatkowo:

- jestem autorem i współautorem **25** rozdziałów, **w tym 1 zagranicznego.**
- **34** streszczeń ze zjazdów międzynarodowych i **29** z krajowych.

Łącznie **488** cytowań, indeks Hirscha wynosi **12.** (Źródło: ISI Web of Science Core Collection).

Łącznie **651** cytowań, indeks Hirscha wynosi **13.** (Źródło: Scopus).

Szczegółowa lista publikacji i analiza bibliometryczna przygotowana przez Bibliotekę Główną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi przedstawiona jest w odrębnym dokumencie (załącznik nr 8).

5.8. Udział w projektach badawczych

1. **Tytuł badania:** Badanie apoptozy w chorobach neurodegeneracyjnych i nowotworach OUN" -1997 - 1999 -Praca własna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr- 502-11-396 -kierownik

2. **Tytuł badania:** Znaczenie rokownicze analizy cytometrycznej limfocytów naciekających tkankę nowotoworów złośliwych-2000 -2001- Praca własna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 502-11-625- kierownik
3. **Tytuł badania:** Badania nad mechanizmami molekularnymi i nowymi czynnikami prognostycznymi w glejaku wielopostaciowym w oparciu o ekspresje PTEN, LOH10, PDGFR i białek cyklu komórkowego (P27, P21, Rb, p53, mdm2) -2004-2006-Praca własna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 502-11-127 - kierownik
4. **Tytuł badania:** Badania LOH1p i 19q w glejaku wielopostaciowym w powiązaniu z ekspresją immunohistochemiczną MGMT i przebiegiem klinicznym choroby -2006-2008-Praca własna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 502-11-443 – kierownik
5. **Tytuł badania:** Poszukiwanie mechanizmów odpowiedzialnych za eliminację transkryptu TP53 w komórkach nowotworowych-2008-2011 – projekt badawczy KBN N N401 020635 -wykonawca
6. **Tytuł badania:** Patogenetyczne i rokownicze znaczenie polimorfizmów genetycznych głównego układu zgodności tkankowej człowieka (HLA) w nowotworach układu chłonnego 2011-2014- Projekt ministerialny 6859/B/P01/2011/40; N N402 685940. -wykonawca
7. **Tytuł badania:** Profil metylacyjny i ekspresja microRNA w różnych typach nowotworów-2011-2016- Grant NCN 2011/01/B/NZ4/03345 - wykonawca

5.9. Nagrody i wyróżnienia

1. 2007- Nagroda naukowa zespołowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
2. 2009- Nagroda naukowa zespołowa II stopnia Rektora Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
3. 2010- Nagroda naukowa zespołowa II stopnia Rektora Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za cykl prac poświęconych analizie heterogenności zaburzeń molekularnych genu TP53 w chorobach nowotworowych, opartej na wykorzystaniu kompleksowych metod analitycznych poprawiających możliwości diagnostyczne obecności zmiany i ocenę jej klinicznego znaczenia
4. 2012- Nagroda naukowa zespołowa III stopnia Rektora Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi stopnia za publikację Limited importance of the dominant - negative effect of TP53 missense mutations. BMC Cancer. IF = 3,011
5. 2013- Nagroda naukowa zespołowa II stopnia Rektora Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
6. 2017- Nagroda zespołowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za cykl prac pt.: Badanie wpływu czynników genetycznych i klinicznych na przebieg chorób nowotworowych. IF = 7,24.

5.10. Działaność dydaktyczna

Zajmuję się koordynacją zajęć prowadzonych przez Katedrę Onkologii i Zakład Patologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi dla pięciu Wydziałów : Wydział Lekarski, Wydział Wojskowo-Lekarski, Wydział

Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego (Biotechnologia Medyczna i Elektroradiologia), Wydział Farmaceutyczny (Kosmetologia), Wydział Nauk o Zdrowiu (Dietetyka, Zdrowie Publiczne, Ratownictwo Medyczne) oraz Wydział Farmaceutyczny (Kosmetologia) z przedmiotów Onkologia, Propedeutyka Onkologii, Chirurgia z Onkologią, Onkologia skóry.

Poprzednio jako adiunkt dydaktyczny, obecnie koordynator organizuję pracę dydaktyczną oraz uczestniczę w przygotowaniu i przeprowadzaniu zaliczeń i egzaminów dla wszystkich wymienionych kierunków oraz dbam o wysoki poziom nauczania studentów.

Od początku pracy dydaktycznej prowadzę zajęcia głównie seminaryjne, początkowo z przedmiotu Onkologia dla studentów VI roku Wydziału Lekarskiego i IV roku Wydziału Lekarsko-Dentystycznego, a także przez kilka lat dla studentów anglojęzycznych Wydziału Lekarskiego English Division.

Aktualnie prowadzę zajęcia z przedmiotu:

1. Propedeutyka Onkologii dla studentów II roku Wydziału Wojskowo Lekarskiego i III Wydziału Lekarskiego;
2. Onkologia- dla III roku Biotechnologii I stopień, III roku Dietetyki I stopień, III roku Oddziału Zdrowia Publicznego I stopień i III roku Ratownictwa Medycznego I stopień;
3. Onkologia skóry –dla II roku Kosmetologii II stopień;
4. Chirurgia z onkologia (część onkologiczna) dla III roku Wydziału Lekarsko-Dentystycznego.

Zakres seminariów obejmuje: podstawy patologii onkologicznej, epidemiologię nowotworów w Polsce i na świecie, etiopatogenezę i kancerogenezę nowotworów, objawy i algorytmy diagnostyczne nowotworów, profilaktykę pierwotną i wtórną (skrining) nowotworów.

Ponadto byłam opiekunem:

- 3 prac licencjackich na kierunkach Biotechnologia, Dietetyka, Zdrowie Publiczne UMED w Łodzi;
- 3 prac magisterskich na kierunku Kosmetologia UMED w Łodzi;
- byłam recenzentem 1 pracy licencackiej na kierunku Biotechnologia;
- sprawowałam opiekę nad dwoma studentami z indywidualnym tokiem studiów oraz nad studentami ze Studenckiego Koła Patomorfologicznego;
- uczestniczyłam jako juror w sesjach STN „Juvenes pro Medicina";
- byłam kierownikiem specjalizacji z Patomorfologii 3 lekarzy.

Dr n.med Dorota Jesionek-Kupnicka

Dorota Jesionek-Kupnicka