

UNIWERSYTECKI SZPITAL KLINICZNY
W BIAŁYMSTOKU
UNIWERSYTECKIE CENTRUM ONKOLOGII
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A, 15-276 Białystok
tel. 85 831-80-23
NIP 542-25-34-985, REGON 000288610
Kod 000000018587-01-019-4450

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Łukasza Cwonda pt.: "Analiza ekspresji genów z rodziny TLR w odniesieniu do aktywacji szlaku VEGFR w procesie angiogenezy nowotworów endometrium."

Rak endometrium należy do najczęstszych nowotworów złośliwych rozwijających się w trzonie macicy. Nowotwór ten występuje w około 80% w okresie pomenopauzalnym, a tylko 5% zachorowań notuje się przed 40. rokiem życia. Pamiętając jednak o roli wielogenowej mutacji w patogenezie nowotworzenia, nie można wykluczyć żadnego przedziału wiekowego w okresie prokreacyjnym i postprokreacyjnym, który wykluczałby pojawienie się tego schorzenia. Rocznie na całym świecie odnotowuje się ok. 150 tys. nowych zachorowań. W Polsce, w 2017 roku zarejestrowano prawie 6 tys. nowych przypadków (wsp. stand. - 15,7/100tys.), oraz ponad 1700 zgonów z powodu tego nowotworu u kobiet. Prowadząc rozważania nad nowotworami endometrium, nie można zapomnieć o jego genetycznej zależności związanej z licznymi mutacjami genetycznymi w grupach: polimerazy DNA (*POLE-mutant*), niestabilności mikrosatelitarnej (*MSI*), stabilności mikrosatelitarnej o niskim indeksie mutacji (*NSMP*), oraz grupa wysokiej liczbie kopii (*p53-abberant*).

Sugerowany, prawdopodobny dualistyczny model rozwoju nowotworów narządu rodno wyznaczył molekularno-histopatologiczny podział na 2 klasy. Obie z nich są charakteryzowane przez zaburzenia mutacyjne w genach, które implikują zaburzeniami sygnałów transdukcyjnych w komórce, a także w układach międzykomórkowych. Wspomniane zaburzenia, związane z przekazywaniem informacji komórkowej stanowią jedno z podstawowych źródeł modulujących replikację błędów genetycznych, które w konsekwencji skutkują powstaniem aneuploidalnych czy poliploidalnych linii komórkowych. Ciągłe poznawanie biologii nowotworów jednoznacznie wykazało, że wzrost i różnicowanie komórek organizmu, również komórkowych linii nowotworowych, zależą także od sygnałów pozakomórkowych pochodzących od mediatorów znajdujących się w macierzy pozakomórkowej. Ten wieloetapowy proces wykorzystujący szereg różnych biochemicznie ligandów, prowadzi w konsekwencji do powstania i przeniesienia czynników

transkrypcyjnych (właściwego sygnału chemicznego) do jądra komórkowego. Wiązanie wspomnianych czynników transkrypcyjnych z odpowiednimi sekwencjami DNA prowadzi do aktywacji bądź dezaktywacji lub osłabienia transkrypcji odpowiednich genów. Zmianą bezpośrednio poprzedzającą rozwój raka błony śluzowej macicy jest rozrost gruczolowy z nasiloną atypią. Analiza klonalności zmienionego endometrium wykazała, że zakres histologicznych zmian o charakterze monoklonalnym, będący przypuszczalnie zmianami przedrakowymi, jest większy. Analiza klonalności wykorzystuje fakt inaktywacji w tkankach żeńskich jednego z chromosomów X pochodzącego od ojca lub matki. W populacji komórek zdrowych inaktywacja ta wykazuje przypadkowość. W rozrostach nowotworowych, które wywodzą się z jednej komórki (niejako jednego klonu), obraz inaktywacji jest identyczny. Poza nielicznymi wyjątkami tkanki somatyczne są poliklonalne, a monoklonalność uważana jest za cechę rozrostu nowotworowego. Powyższe implikują stałym narażeniem organizmu na działanie licznych czynników patogennych, skutkujących aktywacją odporności nieswoistej, a także nabytej (swoistej). Jedną z ważniejszych funkcji układu odpornościowego w indukowaniu odpowiedzi wrodzonej jest odróżnienie obcych molekuł mikroorganizmów od własnych. Funkcje tę pełnią receptory rozpoznające wzorce – PRR (*Pattern Recognition Receptors*) rozpoznające dwa rodzaje cząsteczek: PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) – molekularne wzorce związane z patogenami; oraz DAMP (*Damage/Danger-Associated Molecular Patterns*) – struktury molekularne związane z uszkodzeniem/zagrożeniem. Jedną z klas PRR są receptory TLR (*Toll-like Receptors*), które oprócz rozpoznawania cząstek PAMP i DAMP, stanowią ogniwo łączące odporność nieswoistą z odpornością swoistą.

Niezmierni istotnym czynnikiem indukującym proces karcinogenezy, oraz inwazyjny wzrost nowotworowy jest pojawienie się w guzie naczyń krwionośnych. Kluczową rolę wśród czynników stymulujących proces angiogenezy odgrywa naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF (A-E) działający poprzez należące do grup kinaz tyrozynowych receptory VEGFR (1-3). VEGFR jest więc kluczowym receptorem procesu angiogenezy, niezbędnym w procesie proliferacji guza. VEGF jest jednym z ogniw łączących układ odpornościowy z procesem karcinogenezy, gdyż komórki układu immunologicznego pobudzone przez receptory TLR zwiększają m.in. jego syntezę.



Podjęte przez doktoranta badania należy uznać zatem za bardzo aktualne i użyteczne klinicznie. Kierunek badań, do których włączył się doktorant, w szczególności poznanie nowych mechanizmów indukujących nowotworzenie raka endometrium, próba oceny spójności ekspresji genów z rodziny TLR w odniesieniu do aktywacji szlaku VGFE wydaje się więc szczególnie uzasadnione.

Doktorant w przeprowadzonej rozprawie doktorskiej podjął się próby znalezienia zależności między ekspresją genów z rodziny TLR, oraz genu VEGFR w nowotworowo zmienionej tkance błony śluzowej macicy w korelacji z cechami kliniczno-patologicznymi nowotworu. Korelacji poddał: wielkość guza, stopień złośliwości histologicznej, zajęcie węzłów chłonnych, oraz stopień zaawansowania klinicznego choroby.

Przedstawiona mi do recenzji praca ma typowy układ rozpraw doktorskich. Opracowanie liczy 109 stron, zawiera również: wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, załączoną zgodę komisji bioetycznej na prowadzenie badań, spis tabel (26), spis rycin (5), spis rysunków (24), oraz cytuje 157 pozycji piśmiennictwa. We wstępie doktorant przedstawia epidemiologię i etiopatogenezę nowotworów endometrium charakteryzując ten nowotwór przede wszystkim w kontekście ich klasyfikacji molekularnej, oraz możliwości terapeutyczne tej choroby. W opinii recenzenta w tej części pracy zabrakło podziału raka endometrium na grupy: „low-risk”, „intermediate-risk”, oraz „high-risk”, na które doktorant powołuje się w rycinie nr 1. Jest to dość istotny podział w I-wszym stopniu zaawansowania klinicznego choroby wg klasyfikacji FIGO, w sposób szczególny determinujący zastosowane postępowanie chirurgiczne. W kontekście omawianej przez doktoranta terapii (podrozdział 2.1.8), a także prezentowanej ryciny 1. jest to dość istotny element. W sposób szczególny kładzie nacisk na przedstawienie i wyjaśnienie zasad związanych z funkcją receptorów TLR oraz ich potencjalny udział w procesie karcinogenezy. Dość szeroko omawia proces angiogenezy w nowotworzeniu tkankowym poprzez zdefiniowanie roli zarówno VEGF jak i VEGFR, a także ich możliwą korelację z receptorami TLR w tym procesie.

Ostatecznie, grupę badaną stanowiły 123 pacjentki z potwierdzonym nowotworem endometrium, natomiast grupę kontrolną – 51 kobiet, u których materiał do badań uzyskano w trakcie innych zabiegów wykonanych z powodów nieonkologicznych. W opinii recenzenta, na tym etapie dysertacji, bezwzględnie konieczne jest bardziej wnikliwe zdefiniowanie grupy kontrolnej w aspekcie statystycznie znamiennej porównywalności obu grup (np. duża różnica

liczebna obu badanych grup). Podanie jedynie wartości liczbowej grupy kontrolnej, bez charakterystyki jej profilu jest niewystarczające. Istotny również jest bardziej szczegółowy opis zabezpieczenia materiału biologicznego, w kontekście bardzo dużej niestabilności tkankowego RNA. Dodatkowo opis testów statystycznych nie stanowi składowej rozdziału „Materiał” i winien być przeniesiony do rozdziału „Metody”.

W metodyce badań doktorant dokonał charakterystyki metod izolacji RNA, spektrofotometrycznej analizy częstości i stężenia RNA w tkance nowotworowej endometrium, oraz analizy ekspresji genów TLR 1-4, VEGFR w tożsamej tkance za pomocą specyficznych sond w reakcji RT-PCR.

W wyniku przeprowadzonych badań doktorant wykazał, że w analizowanej grupie pacjentek z potwierdzonym histologicznie rakiem endometrium istotnie znamienne ekspresja jest obserwowana w zakresie genów TLR 1-3. Stwierdził, że istnieje silna odwrotnie proporcjonalna zależność między ekspresją genu TLR1 i TLR2, a stopniem klinicznej złośliwości. Doktorant stwierdził także, że poziom ekspresji genów TLR3 jest niższy w tkankach nowotworowych błony śluzowej macicy, natomiast ekspresja genów VEGFR jest znamienne statystycznie wyższa. W przeprowadzonym badaniu nie wykazano zależności między cechami kliniczno-patologicznymi guza, a ekspresją wyżej wymienionych genów (TLR3 i VEGFR). Doktorant wykazał także istnienie silnej dodatniej korelacji ekspresji genów TLR2 i VEGFR w badanej grupie pacjentek z rakiem endometrium.

W dyskusji autor wnikliwie i krytycznie analizuje uzyskane wyniki i zestawia z dotychczasową wiedzą na ten temat z literatury. Cenną stroną tej części rozprawy doktorskiej są rozważania związane z teorią nadzoru immunologicznego poprzez oddziaływanie cząsteczek PAMP i DAMP przez układ receptorowy PRR, gdzie istotną rolę odgrywają receptory *Toll-podobne* (TLR). W przedstawionej dysertacji autor jednoznacznie wykazał rolę podklas TLR 1-3. Ciekawą wartością poznawczą pracy było także stwierdzenie braku istotnej roli TLR4 w patogenezie raka błony śluzowej macicy w odniesieniu do wszystkich analizowanych danych kliniczno-patologicznych. Istotnym elementem dyskutowanym w niniejszej dysertacji doktorskiej, są również rozbieżności uzyskanych przez doktoranta wyników badań w kontekście analizy stopnia histologicznego zaawansowania nowotworu oraz ekspresją TLR4, w stosunku do innych badań dostępnych w literaturze naukowej. Krytyczna, dokonana przez doktoranta ocena, świadczy o dobrym przygotowaniu



warsztatowym i zrozumieniu naukowym, oraz stwarza przesłanki do dalszej kontynuacji tego tematu. Z racji obowiązku recenzenta, pozwalam sobie wyrazić pewien niedosyt dyskusji uzyskanych tak interesujących wyników końcowych szczególnie w aspekcie rozważań nad ekspresją genu VEGFR w badanej grupie pacjentek z rakiem endometrium. Fakt ten wydaje się być dość ważny w kontekście zamiaru publikacji uzyskanych wyników.

Pracę kończą cztery wnioski wynikające z przeprowadzonych badań.

Pozwolę sobie wyrazić jeszcze raz nadzieję, że podjęte przez doktoranta badania, ciekawe i oryginalne, będą kontynuowane. Ważnym elementem, przemawiającym za prowadzeniem podjętych badań jest konieczność zwiększenia grupy kontrolnej i ewentualna ponowna ocena na większej populacji wyselekcjonowanych chorych z rakiem endometrium. Istotnym wydaje się również wykonanie profilu biofizycznego i biochemicznego badanych pacjentek, a także dokonanie stosownych oszacowań statystycznych. Recenzent zdaje sobie sprawę, że wymaga to wieloletnich badań, ale trud może zaowocować cennymi, pożytecznymi klinicznie dokonaniem naukowymi i wartościowymi publikacjami. Wartości niniejszej dysertacji naukowej absolutnie nie umniejszają błędy edytorskie, które winny zostać poprawione przed oddaniem pracy do publikacji.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Łukasza Cwonda pt.: "Analiza ekspresji genów z rodziny TLR w odniesieniu do aktywacji szlaku VEGFR w procesie angiogenezy nowotworów endometrium" spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. Łukasza Cwondy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



5

Białystok, 10.01.2021r.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Pawel K...' with a large flourish at the end.