



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KATEDRA GINEKOLOGII, POŁOŻNICTWA I ONKOLOGII GINEKOLOGICZNEJ
KLINIKA ONKOLOGII GINEKOLOGICZNEJ

KIEROWNIK KLINIKI: PROF. DR. HAB. N. MED. EWA NOWAK-MARKWITZ

ul. Polna 33
60-535 Poznań

tel. 061 841 93 30, 841 93 07
fax: 061 841 96 90, 841 94 65
e-mail: onko@ump.edu.pl

Dziękuję MWB UG i GUMed

Poznań 27.11.2014

Wpłynęło dnia 8.12.2014
L.dz. nr 22/2014

Ocena rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

mgr Anny Supernat

pt.: „Znaczenie kliniczne wybranych markerów molekularnych w raku trzonu macicy”

Rak endometrium jest w Polsce najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym kobiecych narządów płciowych. Rocznie rozpoznaje się prawie 5 i pół tysiąca raków błony śluzowej trzonu macicy, z czego dwie trzecie przypada na kobiety ponad 60-letnie. Do niedawna zbyt mało uwagi poświęcano tej chorobie ze względu na dobre wyniki leczenia, co bezpośrednio przekłada się na dużą liczbę 5-letnich przeżyć. Jednak wraz ze wzrostem wielkości populacji chorej, co obserwuje się na całym świecie, oraz z postępem w dziedzinie biologii molekularnej zmienia się nasze spojrzenie na patogenezę i już także na sposób leczenia tego nowotworu. Bezpośrednio z tym związane jest różnicowanie chorych w zależności od swoistego „odcisku palca”, czyli molekularnego wzoru raka, który przekłada się na decyzje kliniczne dotyczące leczenia oraz ma szczególne znaczenie w prognozowaniu przebiegu choroby.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr ANNY SUPERNAT jest w całości poświęcona poszukiwaniu molekularnych markerów raka endometrium, które mogą odpowiadać za jego heterogenność molekularną oraz odmienność kliniczną. Rozprawa składa się z cyklu czterech opublikowanych artykułów naukowych, w których przedstawiono wyniki badań nad heterogennością raka endometrium powiązanego z ich potencjalnymi molekularnymi markerami o znaczeniu prognostycznym, diagnostycznym i predykcyjnym. Zróżnicowanie patogenetyczne raka endometrium jest obecnie przedmiotem licznych badań, mających na celu optymalizację i indywidualizację leczenia chorych z poszczególnymi typami raka endometrium. Podjęcie tego tematu przez Doktorantkę uważam za bardzo aktualne i wpisujące się w światowe tendencje w tym zakresie.

Rozprawa doktorska składa się z 77 stron maszynopisu, wśród których zamieszczone zostały cztery artykuły naukowe, opublikowane w indeksowanych czasopismach w latach 2012-2014. Rozprawę doktorską rozpoczyna streszczenie w języku polskim i angielskim, które jest zarazem

wprowadzeniem do tematu rozprawy doktorskiej. Autorka krótko opisuje przeprowadzone eksperymenty, przedstawia materiał i metody, które wykorzystwała w analizach oraz przedstawia wnioski wynikające z badań. Łącznie zostało zbadanych 30 markerów o potencjalnej wartości w patogenezie i diagnostyce raka endometrium.

W kolejnym rozdziale przedstawiono opis publikacji, gdzie mgr Anna Supernat nakreśla przede wszystkim problem jakim jest heterogenność raka endometrium oraz aktualny brak możliwości precyzyjnej diagnostyki. Autorka postuluje utworzenie nowej klasyfikacji raka endometrium opartej o molekularne i histopatologiczne cechy nowotworu, podobnie jak to uczyniono niedawno w klasyfikacji raka jajnika. W zwartej formie przybliżyła temat swoich poszczególnych badań i ich wyniki. Łącznie badania te przeprowadzone zostały na bardzo dużej grupie 452 pacjentek z rakiem endometrium z użyciem tkanek świeżo mrożonych oraz parafinowych bloczków tkankowych materiału histologicznego po leczeniu operacyjnym. Chore zostały poddane analizie pod względem różnorodnych parametrów takich jak: status menopauzalny, stopień otyłości, obecność nadciśnienia, cukrzyca, które to czynniki są znane jako sprzyjające klasycznej formie raka endometrium. Oceniono również typ histologiczny nowotworu oraz stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO. Czas obserwacji chorych wyniósł od 0 do 158 miesięcy w latach od 2010 do 2013. W rozdziale tym Autorka wyciąga wstępne wnioski dla każdej z prac, lecz aby dokładnie je przeanalizować, trzeba sięgnąć po pełne wersje publikacji.

Kolejny rozdział precyzyjnie określa wkład pracy Doktorantki w przeprowadzone badania i przygotowanie publikacji. Warty podkreślenia jest fakt, że we wszystkich publikacjach mgr Anna Supernat jest pierwszym autorem.

Rozdział piąty stanowi podsumowanie wyników badań opublikowanych w artykułach, które wyraźnie wskazują na ich spójny charakter. Niezwykle ciekawe wyniki uzyskane przez Doktorantkę w pracy pt. „*A multimarker qPCR platform for the characterisation of endometrial cancer*” wskazują na zależność zmian liczby kopii genów z bardziej agresywnym przebiegiem choroby i niekorzystnym rokowaniem. Autorka postuluje możliwość zastosowania tej metody badawczej w praktyce klinicznej, w celu wyselekcjonowania grupy pacjentek z chorobą o bardziej gwałtownym przebiegu, gorzej reagujących na standardowe leczenie. Równie ciekawe wyniki uzyskano analizując heterogenność guzów na poziomie białek w pracy pt. „*Tumor heterogeneity at protein level as an independent prognostic factor in endometrial cancer*”, gdzie wykazano, że stopień zróżnicowania proteomicznego może wskazywać na bardziej agresywny przebieg choroby. Jest to jednak w opinii recenzenta metoda obciążona zbyt dużym kosztem, z uwagi na ilość oznaczanych białek, aby znalazła zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej. Kolejnym istotnym słabym punktem jest problem uzyskiwania próbek do tych oznaczeń, gdyż profil białek może różnić się zarówno w obrębie samego guza jak i ognisk przerzutowych. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią istotny głos w dyskusji

dotyczącej patogenezy raka endometrium i wskazują na konieczność podjęcia dalszych badań w tej dziedzinie. Szkoda, że w podsumowaniu Autorka nie sformułowała kilku wniosków wspólnych wynikających z badań – wnioski są w każdym z artykułów oddzielnie, ale w opinii recenzenta jest to raczej wynik braku doświadczenia w redagowaniu nowej, od niedawna, formy rozprawy doktorskiej i w niczym nie umniejsza wartości wyników przedstawionych przez Doktorantkę.

Dalszą część rozprawy doktorskiej stanowią opublikowane artykuły, które pozwolę sobie krótko przeanalizować.

W artykule opublikowanym w 2014 roku w *Oncology Reports* „*A multimarker qPCR platform for the characterisation of endometrial cancer*”, jak już wspomniałam, Doktorantka podjęła bardzo ciekawą i istotną z punktu widzenia klinicysty analizę zmian liczby kopii 10 genów (między innymi: *ERBB1*, *ERBB3*, *PI3K*, *MYC*, *TP53*) w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego, typu histologicznego nowotworu oraz stopnia jego zróżnicowania. Zostały one oznaczone na świeżo mrożonych preparatach tkankowych uzyskanych od 157 chorych z rakiem endometrium oraz 5 pacjentek zdrowych. Badania zostały wykonane metodą ilościową qPCR. Autorka zwróciła uwagę na zależność zmiany liczby kopii poszczególnych genów z bardziej agresywnym przebiegiem choroby, stopniem zaawansowania klinicznego, typem histologicznym i obecnością przerzutów. Co ciekawe wśród badanych genów znalazła się również mammaglobina (*MGB1*), użyteczna w diagnostyce rozlanego raka piersi. Autorka uzyskała niezwykle interesujące wyniki stwierdzając, że w raku endometrium niski poziom ekspresji *MGB1* prezentują guzy nisko-zróżnicowane, natomiast wysoka ekspresja jest stwierdzana w typie I (endometrialnym) raka, który jak wiadomo rokuję lepiej. Nie udało jej się jednak wykazać wartości prognostycznej ekspresji genu tego białka. Być może wymaga to przeprowadzenia badań na większej liczbie chorych.

W roku 2012 została opublikowana w *Oncology Letters* praca pt. „*Deregulation of RAD21 and RUNX1 expression in endometrial cancer*”. Doktorantka w grupie 144 pacjentek, od których uzyskano świeżo mrożone fragmenty tkankowe, przeanalizowała ekspresję kohezyn (*RAD21*) oraz genów regulujących ich ekspresję (*RUNX1*), które są potencjalnymi markerami wielu nowotworów. Biorą one udział w podziałach komórkowych i zaobserwowano ich podwyższony poziom w nowotworach o bardziej agresywnym przebiegu. Badania zostały przeprowadzone za pomocą RT-qPCR. Autorka stwierdziła, że wysoka ekspresja *RAD21* koreluje z ekspresją *RUNX1*, oraz wysoka ekspresja *RAD21* wykazuje korelację z naciekaniem szyjki macicy. Nie stwierdzono jednak ich statystycznej wartości prognostycznej.

Kolejny zamieszczony w rozprawie doktorskiej artykuł, opublikowany został w *Anticancer Research* pt. „*Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in endometrial cancer*”. We wstępie Autorka szczegółowo omówiła mechanizm tranzycji epitelialno-mezenchymalnej (EMT) oraz

jej związek z inwazją nowotworu i formowaniem się przerzutów. Jest to zagadnienie niezwykle ciekawe i rzadko poruszane w piśmiennictwie. Badania zostały przeprowadzone w grupie 157 pacjentek, od których uzyskano świeżo mrożone preparaty tkankowe podczas leczenia operacyjnego raka endometrium. Analizy dokonano stosując metodę RT-aPCR. Doktorantka przeanalizowała ekspresję genów związanych z procesem EMT: *SNAIL*, *SLUG*, które są czynnikami transkrypcyjnymi oraz ekspresję markera komórek macierzystych nowotworu(CSC) - *CD 133*. Stwierdzono korelację między ekspresją *SNAIL* i *SLUG* oraz wykazano zależność między obniżoną ekspresją *SLUG* a krótszym czasem przeżycia chorych. Autorka w swojej pracy zajęła się również analizą zależności CSC i tranzycji epitelialno-mezenchymalnej w raku endometrium. Mimo , że w wielu nowotworach wpływ EMT na wzrost aktywności CSC została potwierdzona, w przypadku raka endometrium badania Doktorantki dotyczące tych markerów nie wykazały istotnych zależności. Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy ekspresją *SNAIL* i *SLUG* z ekspresją CSC. Co więcej, Doktorantka wskazuje na problem dużego zróżnicowania poziomu ekspresji badanych genów również w tkankach od osób zdrowych.

Ostatnią załączoną pracą jest artykuł „*Tumor heterogeneity at protein level as an independent prognostic factor in endometrial cancer*” opublikowany w 2014 roku w *Translational Oncology*. W pracy tej autorka ponownie podejmuje temat heterogenności raka endometrium, w którym białka ulegają zróżnicowanej ekspresji i pełnią różne funkcje w zależności od podtypu raka. Badanie zostało wykonane na dużej liczbie 364 pacjentek operowanych z powodu raka błony śluzowej trzonu macicy, od których pobrano po 4 bloczki tkankowe, aby ocenić różnice w ekspresji białek w obrębie guza pierwotnego. Z wykorzystaniem immunohistochemicznych mikromacierzy przeanalizowano ekspresję 14 białek, wśród których znalazły się znane czynniki prognostyczne wpływające na dynamikę rozwoju nowotworu takie jak: receptor estrogenowy 1, receptor progesteronowy, receptor nabłonkowego czynnika wzrostu oraz inne białka o znaczeniu potencjalnie predykcyjnym. Autorka postawiła hipotezę, że heterogenność raka endometrium na poziomie białek może determinować przebieg choroby i wpływać na przeżywalność chorych. Doktorantka na podstawie badań stwierdziła, że spośród 14 badanych białek 9 wykazuje mikroheterogenność, która koreluje z agresywnym przebiegiem choroby (w tym receptor estrogenowy 1), lecz tylko w kilku przypadkach przekłada się to na krótsze przeżycie chorych. Skumulowana heterogenność kilku białek wykazała wyższą korelację z obecnością przerzutów, wyższym stopniem zaawansowania nowotworu i jego gradingiem niż heterogenność pojedynczego białka. Istotnym ograniczeniem metody w opinii recenzenta jest konieczność pobierania fragmentów tkankowych z kilku miejsc guza pierwotnego, co z pewnością ograniczy wprowadzenie tej metody do praktyki klinicznej. Również zbyt duża liczba białek koniecznych do przeanalizowania istotnie zwiększa koszty diagnostyki. Choć z drugiej strony, możliwe jest, że w przyszłości metodyka ulegnie udoskonaleniu i koszty będą akceptowalne.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa doktorska stanowi spójny cykl prac naukowych, opublikowanych w krótkim czasie w renomowanych czasopismach, co stanowi o ich wysokiej wartości merytorycznej. Doktorantka wykazała się umiejętnością zastosowania nowoczesnych technik badawczych. Podjęte przez Nią tematy i przeprowadzone badania wskazują na dużą wiedzę w tej dziedzinie i umiejętność jej wykorzystania do planowania i wykonywania eksperymentów naukowych na wysokim poziomie. Mam nadzieję, że mgr Anna Supernat będzie dalej kontynuowała swe badania i odkryje dalsze korelacje pomiędzy ekspresją genów i białek a przebiegiem klinicznym raka endometrium.

Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa odpowiada w pełni warunkom Ustawy z dn. 18 marca 2011r. o stopniach i tytułach naukowych a dorobek kandydata uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

Składam jednocześnie wniosek o wyróżnienie powyższej rozprawy: 4 prace zostały opublikowane w czasopismach o wysokim IF, we wszystkich mgr Anna Supernat jest pierwszym autorem, podjęty temat badań jest bardzo aktualny, zastosowane metody są nowoczesne na światowym poziomie.



Prof. dr hab. med. Ewa Nowak-Markwitz