Dr hab. n. med. Janusz Wójcik
Lekarz Kierujący Kliniką
Chirurgii Klatki Piersiowej i Transplantacji PUM
w Szczecinie

Szczecin 26.04.2021

Samodzielny Publiczny
Wojewódzki Szpital Zespolony w Szczecinie
71-455 Szczecin, REGON 000290274
Szpital Wojewódzki w Szczecinie Zdunowie
70-891 Szczecin, ul. Alfreda Sokołowskiego 11
KLINIKA CHIRURGII KLATKI PIERSIOWEJ I TRANSPLANTACJI - VII
resortowe kody ident.: cz. I: 17656; cz. V: 09; cz. VII: 208; cz. VIII: 4520
tel. 91 442 72 72, fax 91 442 74 97

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Mgr Pawła Golca pt. **„Ocena ekspresji ligandów szlaków niekanonicznych WNT/β-kateniny w niedrobnokomórkowym raku płuca"**.

Wiedza n/t powstawania i rozwoju nowotworów wiąże się z poznaniem mechanizmu kontroli programowanej śmierci komórek, dróg utraty immunologicznego nadzoru nad tym procesem i niekontrolowanej proliferacji komórkowej, ujawnienia mutacji w obrębie genów odpowiedzialnych za rozwój patologicznych linii komórkowych i wpływu zewnętrznych czynników mutagennych na powstanie mutacji. Każda praca przybliżająca świat medyczny do tej wiedzy jest szczególnie ważna, a zarazem niezmiernie nowoczesna z dalszym, możliwym zastosowaniem klinicznym. Rozprawa doktoranta odpowiada tym kryteriom, co oceniam niezwykle wysoko.

Przedstawiona praca napisana pod kierunkiem naukowym Pana dr. hab. n. med. Mirosława Dariusza Kozłowskiego i dr hab. n. med. Joanny Pancewicz jako promotora pomocniczego liczy 89 stron, składa się z 13 rozdziałów, zawiera 16 tabel, 24 ryciny i 178 pozycji piśmiennictwa. Dla ułatwienia lektury rozprawy poszczególne rozdziały zostały podzielone na podrozdziały. Praca ma typowy dla rozpraw doktorskich układ redakcyjny.

We wstępie opisano historyczne początki walki z rakiem płuca oraz bieżące zalecenia dotyczące standardów jego diagnostyki i leczenia, mechanizmy biologii molekularnej i genetyki dotyczące raka płuca, technikę procesów badawczych materiału DNA i RNA, rolę kinaz tyrozynowych w procesie proliferacji nowotworowej oraz znaczenie mutacji w zidentyfikowanych genach i receptorach związanych z kontrolą proliferacji i przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego (EGFR, ALK, ROS1, BRAF, RAS, PDL, PDL-1 i innych) w odniesieniu do nowoczesnych schematów leczenia.

W swojej pracy doktorant skupił się na analizie szlaku przekaźnikowego WNT/β-kateniny, którego nieprawidłowa aktywność została zidentyfikowana jako jeden z mechanizmów proliferacji nowotworów, nawrotów, odnowy komórek macierzystych raka i nabywania oporności w stosunku do terapii przeciwnowotworowej, choć co napisano wiedza z tym związana jest wciąż jeszcze niepełna.

Opisano dwie różnorodne drogi aktywacji w/w szlaku w zależności od udziału β-kateniny: kanoniczną - udziałem β-kateniny i niekanoniczną - bez jej udziału. Droga kanoniczna doprowadza w punkcie docelowym z wykorzystaniem procesu fosforylacji do aktywacji w dużym uproszczeniu genów docelowych. Szlaki niekanoniczne WNT różnią się typem glikoprotein i możliwej aktywacji genów docelowych bez procesów fosforylacji. Wg znanego schematu, co opisał doktorant, istotą drogi sygnałowej WNT/β-kateniny jest grupa 19 wydzielniczych glikoprotein, które aktywują błonowe receptory komórkowe. Ligandy szlaku WNT/β-kateniny ponumerowano od WNT-1 – WNT-16, przy czym ligandy WNT-4,5A,7A,11,16 dotyczą szlaków niekanonicznych i stanowią punkt docelowy niniejszego opracowania.

Dużą pomocą w aranżacji bieżącego badania była znajomość obecności ekspresji ligandów WNT-4, WNT-5A, WNT-7A, WNT-11 w tkance płucnej, nadekspresji β-kateniny w raku płuca, przypuszczalnej roli WNT-7A jako genu supresorowego w raku płuca o korzystnym, przywracającym fenotyp komórki niezmienionej nowotworowo działaniu.

Dotychczasowa wiedza wskazuje, że nadekspresja β-kateniny, ale także zmiany aktywności szlaku WNT biorą udział w mechanizmie wytwarzania przerzutów w raku płuca. Prace badawcze dotyczące aktywności szlaku WNT wykazały zaangażowanie w jego regulacji cząsteczek mikroRNA - m/innym miRNA-29, miRNA-148a,miRNA-191-5p, co wpływało na proliferację i angiogenezę w raku płuca, wytwarzanie oporności raka płuca na radioterapię lub nawet hamowanie proliferacji i migracji komórek raka płuca.

Doktorant za cel pracy postawił sobie zbadanie oceny ekspresji na poziomie mRNA genów kodujących ligandy aktywujące szlaki niekanoniczne WNT/β-kateniny – WNT-4, WNT-5A, WNT-7A, WNT-11 i WNT-16 zarówno w modelowych, ustalonych liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca (stanowiących swoisty punkt odniesienia), jak i w resekowanych guzach chorych we wczesnych, operacyjnych stopniach zaawansowania niedrobnokomórkowego raka płuca. Celem dodatkowym była ocena zależności ekspresji badanych ligandów od cech kliniczno-patologicznych operowanych chorych.

Przedmiotem analizy był materiał od 80 pacjentów (54 mężczyzn i 26 kobiet) w wieku śr. 63,5 lat z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, którzy byli leczeni operacyjnie w Klinice Chirurgii

Klatki Piersiowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (UMB) w latach 2015-2017. W grupie badanej było 39 przypadków raka płaskonabłonkowego, 29 przypadków gruczolakoraka i 12 przypadków raka wielkokomórkowego. Materiał tkankowy z guza i niezmienionej tkanki płucnej był zabezpieczony w temp. (– 80°C). Do badań były kwalifikowane próbki guza zawierające ponad 50% komórek nowotworowych oraz próbki tkanki płucnej poza guzem, bez komórek nowotworowych, a samo badanie odbywało się w Zakładzie Klinicznej Biologii Molekularnej UMB. Punktem końcowym pierwszego etapu analizy laboratoryjnej była izolacja mRNA z hodowli linii komórkowych poszczególnych typów raka płuca, weryfikowanego metodą mikroelektroforetyczną i spektrofotometryczną. W kolejnym etapie uzyskane RNA podlegało transkrypcji do komplementarnej jednoniciowej cząsteczki DNA, stanowiącej strukturę zestawu badanych genów, których ekspresję oceniano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) z zastosowaniem „sond" TaqMan dla monitorowania stopnia amplifikacji ocenianych genów poprzez analizę fluorescencji. Listę w/w ocenianych genów WNT (WNT-4, WNT-5A, WNT-7A, WNT-11, WNT-16) szlaku niekanonicznego uzupełniało oznaczenie genu 18S rRNA jako kontroli endogennej.

Ujawniono, iż geny kodujące ligandy szlaków niekanonicznych WNT-4, WNT-5A, WNT-7A i WNT-11 są aktywne, z wyjątkiem liganda WNT-16, zarówno w liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca, jak i w guzach operowanych chorych. Zaobserwowano różnice w ekspresji na poziomie mRNA ligandów aktywujących szlaki niekanoniczne WNT/β-kateniny pomiędzy poszczególnymi liniami komórkowymi niedrobnokomórkowego raka płuca, a także dużą heterogenność ekspresji ligandów WNT-4, WNT-5A, WNT-7A i WNT-11 u chorych we wczesnych stopniach zaawansowania niedrobnokomórkowego raka płuca. Jednocześnie nie stwierdzono zależności ekspresji ligandów aktywujących szlaki niekanoniczne WNT/β-kateniny od wieku, płci, palenia tytoniu, rozpoznania histopatologicznego, patologicznego stopnia zaawansowania i przerzutów do węzłów chłonnych w tym porównaniu.

W kontekście postawionych celów doktorant udowodnił, że ekspresja genów, na poziomie mRNA, kodujących ligandy aktywujące szlaki niekanoniczne WNT/β-kateniny jest zaburzona zarówno w nowotworowych liniach komórkowych, jak i w resekowanych guzach we wczesnych stopniach zaawansowania niedrobnokomórkowego raka płuca.

Uzyskane wyniki wskazują zatem na złożoną rolę ligandów aktywujących szlaki niekanoniczne WNT/β-kateniny w rozwoju niedrobnokomórkowego raka płuca, i co więcej, z uwagi na przenikanie się szlaków biorących udział w procesie nowotworowym związana z tym efektywność terapii skierowanych przeciwko pojedynczym zmutowanym receptorom bywa niewystarczająca. Stąd w wielu przypadkach muszą być one rozszerzane w stosunku do innych czynników bądź modyfikowane.

Przykładem może być wytworzenie oporności na erlotynib z potwierdzeniem mutacji T790M i potrzebą zastąpienia erlotynibu inhibitorem kolejnej generacji ozymertynibem lub potrzeba zastąpienia kryzotynibu innymi inhibitorami ALK - alektynibem, cerytynibem i brygatynibem. Stąd też bierze się poszukiwanie nowych punktów docelowych terapii uwarunkowanych molekularnie lub też uniwersalnych systemów enzymatycznych np. przekaźnikowych o dużym potencjale spowolnienia nowotworu. Układ szlaku przekaźnikowego WNT/β-kateniny być może spełni takie nadzieje. Świadczy o tym jego wielokierunkowość np. nadekspresja β-kateniny w raku płuca jak i zmiany jej aktywności w procesach niezwiązanych z chorobą nowotworową takich, jak: zaburzeniach regulacji uwalniania insuliny przy rozwoju cukrzycy, poprzez interakcje z genem TCF7L2 lub z genem TCFLEF w regulacji metabolizmu tkanki kostnej przy rozwoju osteroporozy. Jednak sytuacja ta wymaga dalszych badań.

Osobnego komentarza wymaga sam temat i idea rozprawy. Zastosowana technologia jak i koncepcja badania jest niezwykle nowoczesna. Dodatkowe wykorzystanie modelowych, ustalonych linii komórkowych pozwala oceniać jednoczasowo procesy in vitro na poziomie molekularnym w tkance nowotworowej jak i in vivo w badanym guzie, co w znakomitym stopniu rozszerza możliwości badawcze i poznawcze. Stawia to Uniwersytet Medyczny w Białymstoku w pierwszej linii postępu, jaki dokonuje się w tym kierunku na świecie. A ponieważ za każdym sukcesem stoją ludzie, warto w tym miejscu podkreślić wizjonerstwo Pana Prof. dr hab. n. med. Jacka Niklińskiego.

Postęp ten jest niezbędny, bowiem tylko w samej Polsce liczba zgonów z powodu raka płuca w ciągu roku osiągnęła poziom 22,5 tys. przypadków, co oznacza, że wszyscy mieszkańcy hipotetycznego, średniej wielkości miasta powiatowego w naszym kraju zachorują na ten rodzaj nowotworu ze 100% śmiertelnością! W wymiarze ogólnoświatowym liczby te są jeszcze gorsze, bo jak przytoczono, liczba zgonów z tego powodu wzrośnie z ok. 2 mln w 2018 do ponad 3 mln w 2035 roku. Prawdopodobny wzrost liczby zgonów będzie jeszcze większy z powodu pandemii Covid-19, o czym pewnie niedługo się przekonamy.

Jednakże rzeczywistość każe skoncentrować się na wykrywaniu postaci wczesnych raka płuca i leczeniu operacyjnym z czasem przeżycia nieosiągalnym dla późnych stadiów zaawansowania. Dodatkowo wczesny stopień zaawansowania umożliwia zastosowanie techniki małoinwazyjnej, która zrewolucjonizowała operacje raka płuca. Występuje ona w wersji jedno-, dwu- oraz trójdostępowej, schemat której przedstawiono. Osobiście preferuję wariant jednodostępowy, i co należy podkreślić, opisany przez doktoranta.

Samą pracę oceniam bardzo wysoko. Praca została przygotowana starannie i z dobrą stylistyką. Piśmiennictwo zostało dobrane z uwzględnieniem najnowszych osiągnięć onkologii, co wskazuje na znajomość doktoranta w zakresie poruszanego tematu. Treść i wyniki rozprawy świadczą

o wchodzeniu genetyki i biologii molekularnej do codziennej praktyki klinicznej, także w chirurgii. Stąd chciałem poznać stanowisko doktoranta n/t wprowadzenia do diagnostyki oznaczania krążącego w krwi DNA guza (tzw. biopsji płynnej, ang. *liquid biopsy*) i czy można ją połączyć z wybranymi aspektami bieżącej rozprawy.

W podsumowaniu stwierdzam, iż doktorant wykazał się znajomością przedmiotu rozprawy i umiejętnością pracy naukowej. Praca spełnia wymogi rozprawy doktorskiej i wnoszę do Senatu UM w Białymstoku o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony.

LEKARZ KIERUJACY
Kliniką Chirurgii Klatki Piersiowej i Transplantacji
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Dr hab. n. med. Janusz Wójcik