

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU**

**ZAKŁAD PATOMORFOLOGII OGÓLNEJ**

**DR N MED. MAREK BALTAZIAK**

# **AUTOREFERAT**

**BIAŁYSTOK 2014**

- I.** Imię i Nazwisko: Marek Baltaziak
- II.** Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:  
W 1984 uzyskałem dyplom lekarza medycyny na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Białymstoku. W roku 1988 uzyskałem specjalizację I stopnia z Patomorfologii a w roku 1998 uzyskałem stopień doktora nauk medycznych za pracę pt.: „*Wpływ alkoholu etylowego na powstawanie i rozwój przerzutów doświadczonego raka wątroby Hepatoma Morris 5123 do płuc*” wykonaną pod kierunkiem Prof. dr hab.n.med. Henryka Nowaka.
- III.** Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.  
1987-2003-Asystent w Zakładzie Patomorfologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Od roku 2003- do chwili obecnej Asystent w Zakładzie Patomorfologii Ogólnej Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.
- IV.** Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.):
- A.** Tytuł osiągnięcia naukowego: „*Badanie wybranych białek związanych z promocją życia i śmierci komórek nowotworowych*”
- B.** Prace stanowiące osiągnięcie naukowe
- 1) Baltaziak M, Koda M, Barwijnuk–Machała M, Musiatowicz B, Duraj E, Kanczuga-Koda L, Musiatowicz M, Reszeć J. The role of Bak expression in apoptosis of the oral squamous cell carcinoma (OSCC) and metastases to lymph nodes (LNMs)”. 2004;49 Suppl 1:14-5. Rocznik Akad Med. Białyst. Punktacja ministerstwa: 5.000  
*Udział własny: koncepcja pracy, analiza wyników badań morfologicznych i immunohistochemicznych, opracowanie wniosków, opracowanie piśmiennictwa, redakcja tekstu pracy. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*
- 2) Baltaziak M, Duraj E, Koda M, Wincewicz A, Musiatowicz M, Kanczuga-Koda L, Szymańska M, Leśniewicz T, Musiatowicz B. Expression of Bcl-xL, Bax and p53 and Bak in primary tumors and lymph node metastases in oral squamous carcinoma”. 2006 Dec;1090:18-25. Ann N Y Acad Sci. Wskaźnik Impact Factor ISI: 1.930. Punktacja Ministerstwa: 24.000.

*Udział własny: stworzenie koncepcji pracy, współudział w badaniach histopatologicznych i immunohistochemicznych, w interpretacji wyników badań, w wykonaniu dokumentacji pracy, współudział w zebraniu piśmiennictwa i sformułowaniu wniosków końcowych oraz redakcji tekstu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

- 3) Baltaziak M, Koda M, Wincewicz A, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Sulkowski S. Relationships of p53 and Bak with EPO i EPOR in human colorectal cancer”. 2009 Oct;29(10):4151-6. Anticancer Res. Wskaźnik Impact Factor ISI: 1.428. Punktacja Ministerstwa: 20.000  
*Udział własny: przygotowanie koncepcji pracy, współudział w ocenie badań histopatologicznych i analiza barwień immunohistochemicznych, opracowanie statystyczne danych, opracowanie wyników i wniosków, udział w redakcji tekstu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuje na 70%.*
- 4) Wincewicz A, Baltaziak M, Koda –Kańczuga L, Koda M, Sulkowska U, Famulski W, Sulkowski S. STAT3 and apoptosis regulators: Bak and Bcl-xL in endometrioid adenocarcinomas of different estrogen receptor-alpha immunoprofile”. 2011; 27,8:536-540. Gynecological Endocrinology. Wskaźnik Impact Factor ISI: 1.581. Punktacja Ministerstwa: 20.000  
*Udział własny: współudział w przygotowaniu koncepcji pracy, gromadzenie i analiza wyników, analiza barwień immunohistochemicznych, opracowanie statystyczne danych, opracowanie wyników i wniosków, udział w redakcji tekstu pracy. Mój udział procentowy szacuje na 45%.*
- 5) Baltaziak M, Wincewicz A, Kańczuga-Koda L, Lotowska J. M, Koda M, Sulkowska U, Baltaziak M, Podbielski M, Sobaniec-Lotowska M.E, Sulkowski S. The relationships between hypoxia dependent markers: HIF-1alpha, EPO and EPOR in colorectal cancer. 2013; 51(4):320-325. Folia Histochemica et Cytobiologica. Wskaźnik Impact Factor ISI: 1.101. Punktacja Ministerstwa 15.000.  
*Udział własny: opracowanie projektu badania i metodyki, współudział w ocenie badaniach histopatologicznych i immunohistochemicznych, opracowanie statystyczne danych, interpretacja wyników i wniosków, przygotowanie pracy do druku. Mój udział procentowy szacuje na 70%.*

### **C. Omówienie celu naukowego/artystycznego wymienionych wyżej prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Apoptoza należy do istotnych procesów warunkujących przeżycie nowotworów. Stanowi odmienną od martwicy formę śmierci komórki. Mimo, że jest badana od wielu lat wciąż pozostają obszary, w których wzajemne oddziaływanie pomiędzy białkami bezpośrednio zaangażowanymi w proces apoptozy, a innymi białkami warunkującymi procesy proliferacji i przeżycia komórek nowotworowych pozostają wciąż nie do końca poznane. Białka antyapoptyczne rezydują głównie w mitochondriach hamując uwalnianie cytochromu c i w ten sposób osłaniając błonę mitochondrialną przed zwiększeniem przepuszczalności. Białka proapoptyczne związane zarówno z zewnętrzną błoną mitochondrialną (Bak) oraz znajdują się w cytozolu komórki (Bax) ułatwiają uwolnienie cytochromu c z błony mitochondrialnej (Levine B i wsp. *Autophagy*. 2008 Jul;4(5):600-6).

Bax jest jednym z głównych przedstawicieli grupy białek proapoptycznych. Badania na zwierzętach pokazują, że obniżony poziom ekspresji Bax powoduje zmniejszenie nasilenia apoptozy. Również badania nad nowotworami u ludzi wskazują na ważną rolę Bax jako supresora w karcynogenezie np: w raku przewodu pokarmowego (Ogura E. i wsp. *Oncol Rep*.1999 Mar-Apr;6(2):365-9 i raku prostaty (Knillova J.2003;147(1):3-10). Należy jednak wspomnieć, iż Bax może pełnić także rolę efektora dla p53 zależnej apoptozy (Knudson CM i wsp. *Cancer Res*. 2001 Jan 15;61(2):659-65). Niemniej ważną rolę w procesie apoptozy przypisuje się genowi TP53. Bodźce takie jak: uszkodzenie DNA, promieniowanie jonizujące i UV, niedotlenienie, wstrząs termiczny oraz onkogeny aktywują gen TP53, który z kolei w odpowiedzi zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G1, aktywuje apoptozę oraz naprawę DNA. Gen ten stymuluje ekspresję białek rodziny Bcl-2: Bax, Bid, Noxa, Puma (Zilfou J.T i wsp. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Nov;1(5):1-12). W wielu nowotworach złośliwych stwierdzono mutację lub obniżoną ekspresję genu TP53 (Jang BG, Kim WH. *Molecular pathology of gastric carcinoma*. *Pathobiology*. 2011;78(6):302-10, Merritt MA. *Cancer Biomark*. 2010;9(1-6):287-305).

Badania ostatnich lat wykazały ważną rolę białka sygnalizacyjnego STAT3 w hamowaniu aktywności genu TP53. STAT3 jest stale aktywne w komórkach nowotworowych i nie wymaga do swojej aktywacji przyłączenia

ligandy do receptora. Wiele badań wskazuje, iż STAT3 jest związany z regulacją ekspresji między innymi białka antyapoptotycznego - Bcl-xL (Zhuang I. *Mod.Pathol.*2007; 20:416-426, Lee SW. *Gut Liver.* 2012 January; 6(1): 45–51). Ponadto STAT3 bezpośrednio oddziałuje z promotorem genu TP53 obniżając jego transkrypcję (Niu G. *Mol Cell Biol.* 2005 Sep; 25(17):7432-40). Zaobserwowano także udział STAT w hamowaniu syntezy czynników takich jak cytokiny i chemokiny, które biorą udział w aktywacji odpowiedzi przeciwnowotworowej układu immunologicznego (*Mol Cell Biol.* 2005 Sep;25(17):7432-40).

Innym czynnikiem wpływającym na proces nowotworowy jest niedotlenienie guza nowotworowego. Szybko dzielące się komórki nowotworowe potrzebują wystarczającej ilości tlenu do wzrostu i penetracji sąsiadujących tkanek. Hipoksja wywołuje zmiany w komórkach nowotworowych powodując między innymi zahamowanie ich wzrostu i apoptozę. W badaniach nad markerami hipoksji wskazano na białko HIF1 jako na jedno z najważniejszych białek biorących udział w odpowiedzi komórki na brak tlenu. Składa się ono z dwóch podjednostek HIF1 $\alpha$  – obecnej w cytoplazmie i HIF1 $\beta$  obecnej w jądrze komórki. W warunkach hipoksji HIF1 $\alpha$  przechodzi z cytoplazmy do jądra komórkowego, łączy się z HIF1 $\beta$  i zapoczątkowuje transkrypcję genów uczestniczących w odpowiedzi na hipoksję a wśród nich między innymi: VEGF, EPO oraz GLUT1, GLUT3 ( Krszyna K, *Postępy Biologii Komórki.* 2005, Vol.32; 4:707-728 ). Erytropoetyna (EPO) i receptor erytropoetyny (EPOR) są białkami, których funkcjonowanie wiąże się z hipoksją, i które współdziałają z HIF1 i GLUT1. Erytropoetyna (EPO) jest czynnikiem wzrostowym pobudzającym dojrzewanie komórek prekursorowych układu czerwonokrwinkowego. Jest ona wydzielana przez komórki śródmiąższowe kory nerki w odpowiedzi na niedotlenienie organizmu, a w stanach znacznej hipoksji również przez komórki wątroby i drogą krwionośną jest przekazywana do innych narządów. W ostatnich latach potwierdzono obecność EPO jak i EPOR również w komórkach: ośrodkowego układu nerwowego, macicy, jajowodach, łożysku i gruczole mlekowym a także wskazano na rolę erytropoetyny w przebiegu procesów apoptozy w nowotworach.

Renzi MJ. i wsp. badając linię komórkową komórek nerwowych PC-12 wykazali wpływ EPO na apoptozę poprzez wzrost ekspresji antyapoptotycznego genu Bcl-xL i zmniejszenie ekspresji proapoptotycznego Bak ( *Brain Res Mol*

Brain Res. 2002 Jul 15;104(1):86-95.). Silva M. i wsp. badając wpływ EPO na linię komórkowej białaczki erytroblastycznej wykazali, iż w przypadku braku EPO dochodzi do spadku ekspresji Bcl-xL i Bcl-2, co powoduje aktywację apoptozy (Blood. 1996 Sep 1;88(5):1576-82), a Batra i wsp. dodając EPO do linii komórkowych nowotworów takich jak: neuroblastoma, mięsak Ewinga czy medulloblastoma zauważyli wzrost ekspresji między innymi Bcl-xL. EPO wpływając na zwiększone stężenie Bcl-xL w mitochondriach zapobiega wydostawaniu się cytochromu c poza mitochondrium i zapobiega aktywacji drogi wewnętrznej apoptozy. ( Lab Invest. 2003 Oct;83(10):1477-87).

## **Cel pracy**

W przedłożonych publikacjach oceniano znaczenie niektórych białek z grupy Bcl-2, białka p53, białka STAT3 oraz EPO i EPOR w wybranych aspektach patogenezy i biologii raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, gruczolakorakach jelita grubego i błony śluzowej trzonu macicy. Jako fragment większej całości, prace te przedstawiają część wyników badań, zawartych także w innych doniesieniach zespołu, w badaniach którego uczestniczyłem.

Szczegółowe cele przedstawionych badań obejmowały:

1. Ocenę znaczenia immunohistochemicznej ekspresji wybranych białek zaangażowanych w proces apoptozy w biologii raka płaskonabłonkowego jamy ustnej ze szczególnym uwzględnieniem tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych.
2. Określenie immunohistochemicznego fenotypu populacji komórek nowotworowych raka płaskonabłonkowego jamy ustnej biorących udział w przerzutowaniu do węzłów chłonnych.
3. Analizę korelacji ekspresji białek zaangażowanych w proces apoptozy takich jak: Bcl-xL, Bax, Bak i p53 w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej w powiązaniu z wybranymi parametrami kliniczno-patologicznymi.
4. Badanie immunohistochemicznej ekspresji białka p53 w prognozowaniu czasu przeżycia chorych na raka jelita grubego.
5. Ocenę binarnej ekspresji białek: p53-EPO, p53-EPOR, p53-Bak, Bak-EPO, Bak-EPOR w powiązaniu z uznanymi patomorfologicznymi czynnikami rokowniczymi raku jelita grubego takimi jak: typ histopatologiczny, stopień złośliwości histologicznej (G), głębokość

- naciekania struktur jelita grubego (pT) oraz obecność lub brak przerzutów do węzłów chłonnych (pN).
6. Analiza przydatności oznaczania wzajemnych korelacji immunohistochemicznych ekspresji wybranych białek pro- i anty-apoptotycznych oraz wewnątrzkomórkowego białka sygnalizacyjnego STAT3 w powiązaniu z parametrami anatomoklinicznymi w raku endometrioidalnym trzonu macicy.
  7. Ocenę binarnej ekspresji białek: STAT3 – Bak oraz STAT3 – Bcl-xL w powiązaniu z obecnością receptorów steroidowych ER $\alpha$  i PR w raku endometrioidalnym trzonu macicy.
  8. Ocenę wzajemnych powiązań pomiędzy ekspresją immunohistochemiczną białek stymulowanych hipoksją: HIF-1 $\alpha$ , EPO i EPOR w gruczolakoraku jelita grubego.
  9. Ocenę binarnej ekspresji białek: HIF-1 $\alpha$  - EPO, HIF-1 $\alpha$  - EPOR w powiązaniu z uznanymi patomorfologicznymi czynnikami rokowniczymi raka jelita grubego takimi jak: typ histopatologiczny, stopień złośliwości histologicznej (G), głębokość naciekania struktur jelita grubego (pT) oraz obecność lub brak przerzutów do węzłów chłonnych (pN).

## **Omówienie wyników badań**

Powstawanie przerzutów nowotworowych stanowi istotę procesu rozwoju nowotworów złośliwych a przerzuty do węzłów chłonnych są ważnym czynnikiem prognostycznym.

W pracach pt: *“The role of Bak expression in apoptosis of the oral squamous cell carcinoma and metastases to lymph node” Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku 2004, Vol 41suppl.1:14-15* oraz *“Expression of Bcl-xL, Bax and p53 in primary tumors and lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma” Annals of the New York Academy of Sciences 2006; Vol.1090:18-25* analizowano ekspresję Bak, Bcl-xL, Bax i p53 w komórkach guza pierwotnego raka płaskonabłonkowego jamy ustnej oraz jego przerzutach do węzłów chłonnych w korelacji z wybranymi parametrami anatomoklinicznymi. Stwierdzono obecność ekspresji Bak w guzie pierwotnym jak i w przerzucie do węzłów chłonnych. Zaobserwowano różnicę w ekspresji Bak, a najwyższa była w grupie o najwyższym stopniu złośliwości histologicznej G3. Badając ekspresję białek Bcl-xL, Bax i p53 oraz ich

wzajemną korelację w guzie pierwotnym i przerzutach do węzłów chłonnych raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, zauważono, iż część guzów pierwotnych, które nie wykazywały ekspresji tych białek dała przerzuty z dodatnią ekspresją Bcl-xL i p53. Wydaje się, że może to dowodzić o selekcji klonów komórek nowotworowych w trakcie ich przerzutowania lub rearanżacji genów warunkujących ekspresję poszczególnych białek. Stwierdzono także statystycznie istotną różnicę w ekspresji białka Bcl-xL pomiędzy guzem pierwotnym a przerzutami do węzłów chłonnych w grupie o stopniu złośliwości histologicznej G1 ( $p < 0.04$ ) oraz pomiędzy ekspresją p53 w guzie pierwotnym a przerzutami do węzłów chłonnych ( $p < 0.02$ ). Przeprowadzone badania wskazują na rolę białek Bcl-xL, Bak i p53 w szerzeniu się procesu nowotworowego i przerzutowaniu do węzłów chłonnych, a immunohistochemiczna ocena ich ekspresji może stanowić cenne uzupełnienie rozpoznania histopatologicznego.

We wcześniejszej pracy zespołu, która zapoczątkowała nasze badania nad białkami apoptotycznymi w karcinogenezie: (*Correlation between Bcl-2 protein expression and some clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma Pol J of Pathol, 2003T.54 nr 1:49-52*) stwierdzono statystycznie znaczącą pozytywną korelację pomiędzy ekspresją białka Bcl-2 w guzie nowotworowym a: wysokim indeksem mitotycznym, wysokim indeksem nieprawidłowych mitoz oraz drobnoogniskowym typem naciekania raka.

Powyższe wyniki świadczą o tym, że nadekspresja białka Bcl-2 jest jedną z cech populacji komórek raka płaskonabłonkowego jamy ustnej a ocena ekspresji odczynu immunohistochemicznego na białko Bcl-2 w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej może stanowić istotne uzupełnienie postawionego rozpoznania histopatologicznego.

Apoptoza jest to proces obumierania komórki charakteryzujący się własną specyfiką morfologiczną i biochemiczną. W procesie tym obok białek grupy Bcl-2 i białka p53 są zaangażowane także inne białka, w tym związane z hipoksją w guzie nowotworowym, zwłaszcza białka HIF-1 $\alpha$ , GLUT1, EPO i EPOR oraz VEGF i IGF-1. W pracy pt.: "*Relationship of p53 and Bak with EPO and EPOR in Human Colorectal Cancer*". *Anticancer Research 2009;10:4151- 4256* badano korelację ekspresji białek proapoptotycznych (p53 i Bak ) oraz ekspresji białek związanych z hipoksją (EPO i EPOR) w różnych podgrupach anatomoklinicznych w gruczolakoraku jelita grubego.



Była to pierwsza praca w dostępnym piśmiennictwie światowym (baza PubMed), w której badano związek ekspresji białka p53 i Bak z ekspresją EPO i EPOR w raku jelita grubego oraz jedna z pierwszych, w których analizowano taki związek w procesie karcinogenezy. Wykazano, że ekspresja Bak wykazywała znaczącą korelację statystyczną z ekspresją EPO i EPOR (EPO  $p < 0.001$ ,  $r = 0.524$  i EPOR  $p < 0.001$ ,  $r = 0.455$ ).

W badaniach tych po raz pierwszy stwierdzono także różnice w ekspresji białka p53 pomiędzy rakami średnio i nisko zróżnicowanymi ( $p = 0.007$ ). Nie stwierdzono natomiast korelacji ekspresji białka p53 z ekspresją białek EPO i EPOR. Wykazano także brak statystycznie istotnej korelacji pomiędzy ekspresją białka p53 i Bak, a w części badanych podgrup anatomoklinicznych współczynnik korelacji był ujemny. Przerwanie kooperacji między tymi białkami w procesie apoptozy prawdopodobnie może być wynikiem mutacji genu TP53, która jest bardzo często obserwowana w raku jelita grubego.

Zaobserwowana silna dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją Bak a EPO i EPOR to związek pomiędzy apoptozą komórki, którą promuje Bak a przetrwaniem komórki, w którym współuczestniczą EPO i EPOR. Wynik ten może sugerować nie tyle ich współdziałanie, co prawdopodobnie ich współzawodnictwo o kierunek regulacji procesów komórkowych zachodzących w komórkach nowotworowych - stymulowanie ich przeżycia lub śmierci. Może także wynikać z faktu mniejszej oligomeryzacji Bak, w której bierze udział „dzikie” białko p53. W konsekwencji mutacji genu TP53, może dochodzić do zaburzenia w procesie oligomeryzacji Bak i wtórnego zwiększenia się jego ilości w komórce w postaci dimeru.

Zagadnieniu wzajemnych korelacji białek związanych bezpośrednio z apoptozą i białek ściśle związanych z procesem niedotlenienia guza nowotworowego były poświęcone także inne prace zespołu, w których uczestniczyłem. Przedstawione wyniki badań w publikacji pt : „*GLUT1 i Bcl-xL in relation to erythropoietin in human colorectal adenocarcinomas*” *Oncology Letters*, 2010; 57:741-745 wskazują na istnienie silnego niedotlenienia w obrębie gruczolaka jelita grubego. Stwierdzono wysoką statystyczną korelację ekspresji między białkami GLUT1 i EPO oraz pomiędzy białkiem Bcl-xL i EPO i EPOR. Otrzymane wyniki wskazują także na przewagę procesów promujących przeżycie komórek rakowych w warunkach deficytu tlenowego panującego na terenie gruczolaka jelita grubego. W pracy : „*P53 correlates positively with VEGF in preoperative sera of colorectal cancer*

*patients*” *Neoplasma* 2006; Vol. 53 ; 1:43-48 wykazano znacząca statystycznie korelację pomiędzy białkami p53 i VEGF oznaczanymi w surowicy przed operacją chorych na gruczolaka jelita grubego w grupie o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej (G3), w grupie z przerzutami do węzłów chłonnych oraz w grupie gruczolakoraków z głębokimi naciekami (pT3,pT4).

Stwierdzono, iż przedoperacyjna ocena białka p53 i VEGF w surowicy jest wartościowym prognostykiem stopnia złośliwości histologicznej (G), głębokości naciekania (pT), obecności lub braku przerzutów do węzłów chłonnych (pN) w gruczolaku jelita grubego. Kolejna publikacja pt *”Hypoxia related growth factors and p53 in preoperative sera from patients with colorectal cancer - evaluation of the prognostic significance of these agents”* *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2009.47;11: 1439-1445 była poświęcona ocenie surowiczych poziomów VEGF, IGF i p53 oraz ich powiązaniu z czasem przeżycia chorych na gruczolaka jelita grubego.

Statystycznie znaczącą pozytywną zależność stwierdzono tylko w przypadku VEGF, co świadczy, iż przedoperacyjna ocena w surowicy krwi poziomu białka VEGF może być wartościowym prognostykiem w ocenie okresu przeżycia chorych na gruczolaka jelita grubego.

Białko STAT3 pełni istotną rolę w onkogenezie, między innymi poprzez udział w regulacji aktywności białka antyapoptotycznego - Bcl-xL oraz genu TP53. Powyższe zależności stały się podstawą do podjęcia badań, które opublikowano w pracy pt.: *”STAT3 and apoptosis regulators : Bak and Bcl-xL in endometrioid adenocarcinomas of different estrogen receptor-alpha immunoprofile ”*. *Gynecological Endocrinology* 2011;27,8:536-540. Skupiały się one na ocenie ekspresji białek bezpośrednio związanych z procesem apoptozy oraz ekspresji białka sygnalizacyjnego STAT3 w różnych podgrupach anatomoklinicznych wraz z uwzględnieniem obecności lub brakiem receptorów ER $\alpha$  i PR w guzie nowotworowym. Nasilenie odczynu immunohistochemicznego na białko STAT3 korelowało zarówno z ekspresją odczynu na Bak jak i Bcl-xL we wszystkich badanych podgrupach gruczolaka endometrioidalnego. Analizując korelację ekspresji Bak i STAT3 w poszczególnych podgrupach statystycznie znamiennej zależności stwierdzono w grupie nowotworów u pacjentów poniżej 60 roku życia, w grupie pacjentów wykazujących najwyższy stopień zaawansowania klinicznego (pT3+pT4), w grupie guzów ER $\alpha$ (+) i PR(+) oraz w guzach o średnim stopniu złośliwości histologicznej (G2). Podobne zależności obserwowano w analizie

korelacji ekspresji Bcl-xL i STAT3 zarówno w odniesieniu do całej grupy nowotworów jak i w poszczególnych podgrupach anatomopatologicznych. Uzyskane wyniki przemawiają za zaangażowaniem białka STAT3 w procesy śmierci i życia komórek. Wskazują także, iż obecność receptorów ER $\alpha$  i PR może być kluczowa dla wzajemnej korelacji pomiędzy białkami bezpośrednio zaangażowanymi w proces apoptozy, a zwłaszcza białkiem Bcl-xL a białkiem STAT3. Na podkreślenie zasługuje także fakt stwierdzony w obecnych badaniach, iż dodatnią reakcję immunohistochemiczną w kierunku STAT3 obserwowano w jądrach komórek rakowych w 54 na 78 przebadanych guzów.

Ta wysoka ekspresja białka STAT3 w gruczolakoraku endometrioidalnym może mieć znaczenie w przypadkach wprowadzenia do terapii onkologicznej leków wpływających na STAT3 takich jak sorafenib. W aspekcie tym uzyskane w obecnej pracy wyniki dotyczące wzajemnych powiązań pomiędzy białkami pro i anty apoptotycznymi sugerują celowość dalszych badań. W innych badaniach zespołu, w których uczestniczyłem, a których wyniki zawarto w pracy: „*ER $\alpha$  and ER $\beta$  expression in correlation with Ki-67, Bcl-2 and Bak in primary tumors and lymph node metastases of breast cancer: The effect of preoperative chemotherapy*”. *Oncol Lett.*2010;nov;1(6):1067-1071 wykazano także pozytywną korelację statystyczną pomiędzy receptorem ER $\alpha$  a białkiem Bcl-2 i oraz ER $\beta$  i białkiem Bak w guzie pierwotnym oraz w przerzutach do węzłów chłonnych.

Wyniki powyższych badań wskazują na możliwość udziału receptorów steroidowych w regulacji procesu apoptozy w kancerogenezie nowotworów hormonalnie zależnych.

Niedotlenienie powoduje w komórce uruchomienie mechanizmów mających uchronić ją przed uszkodzeniem lub śmiercią. HIF-1 $\alpha$  jest silnym stymulatorem transkrypcji genów a między innymi: GLUT-1, TP53, VEGF czy EPO, poprzez które umożliwia komórce przetrwanie niedotlenienia w wyniku stymulacji angiogenezy zapewniając w ten sposób lepsze warunki zaopatrzenia w tlen. Wydaje się, iż podobny mechanizm jest uruchamiany w przypadku progresji guza nowotworowego. Erytropoetyna oprócz działania hematopoetycznego wykazuje także działanie ochronne na komórkę poprzez hamowanie apoptozy, działanie przeciwzapalne, ograniczenia stresu oksydacyjnego oraz poprzez pobudzenie angiogenezy. Działanie EPO odbywa się poprzez wiązanie EPO z receptorem EPOR.

Celem pracy pt: „*The relationships between hypoxia dependent markers: HIF-1 $\alpha$ , EPO and EPOR in colorectal cancer*”. *Folia Histochem Cytobiol* 2013; 51(4):320-325, była ocena korelacji ekspresji pomiędzy HIF-1 $\alpha$  a białkami EPO i EPOR w gruczolakoraku jelita grubego w zakresie wybranych parametrów kliniczno-patologicznych. We wszystkich ocenianych preparatach raka jelita grubego pochodzących od 125 operowanych pacjentów stwierdziliśmy ekspresję badanych białek, co wskazuje na obecność niedotlenienia w raku jelita grubego. Barwienie immunohistochemiczne na HIF-1 $\alpha$  oraz EPO wskazywały głównie na cytoplazmatyczną lokalizację białek. W przypadku EPOR reakcja immunohistochemiczna wskazywała głównie na błonową lokalizację białka chociaż obserwowana była także lokalizacja cytoplazmatyczna. Ekspresja HIF-1 $\alpha$  wykazywała wyraźną statystyczną korelację z ekspresją EPO i EPOR ( $P < 0.001$ ,  $r = 0.549$  i  $P < 0.001$ ,  $r = 0.536$ ) we wszystkich badanych grupach. Współczynnik korelacji statystycznej ( $r$ ) w poszczególnych podgrupach pomiędzy HIF-1 $\alpha$  i EPO zawierała się w przedziale od 0.475 do 0.678 a w przypadku HIF-1 $\alpha$  i EPOR od 0.426 do 0.845. Jednocześnie wysoka istotność statystyczna ( $P < 0.001$ ) dotyczyła wszystkich analizowanych grup. Jedynie w grupach pT1+pT2 oraz gruczolakoraku śluzowym, istotność statystyczna pomiędzy ekspresją HIF-1 $\alpha$  a EPO była odpowiednio na poziomie  $P = 0.015$  i  $P = 0.024$ . W badanych skrawkach raka jelita grubego stwierdziliśmy podobną lokalizację barwienia immunohistochemicznego na HIF-1 $\alpha$  i EPO, co może sugerować, że wzrost ekspresji EPO i HIF-1 $\alpha$  może być związany ze śmiercią komórek w niedotlenionych okolicach wokół ogniska martwiczego raka. Mimo, że nasze obecne ustalenia potwierdzają istnienie silnej korelacji ekspresji HIF-1 $\alpha$  z ekspresją EPO i EPOR wydaje się prawdopodobne, że w znacznej liczbie guzów ekspresja EPO i EPOR nie może być w pełni kontrolowana przez HIF-1 $\alpha$  (wartość współczynnika korelacji  $r$  zawierała się w zakresie od 0.5 do 0.6).

Przedstawione wyniki wydają się wskazywać na złożoną biologię raka jelita grubego i ważną choć nie do końca poznaną rolę niedotlenienia i związanych z nim białek w procesie rozwoju nowotworu. Niewątpliwie pełne wyjaśnienie zewnętrznej lokalizacji HIF-1 $\alpha$  i jego koekspresji z EPO i EPOR w raku jelita grubego wymagają dalszych badań. Uważamy także, iż dalsze badania w tej dziedzinie biologii nowotworów są konieczne również w związku ze stosowaniem egzogennej erytropoetyny (rHuEPO) oraz czynników stymulujących erytropoezę (ESA) w leczeniu choroby nowotworowej. Uważamy, że badania te mogłyby pomóc w wyjaśnieniu pojawiających się w

ostatnich latach rozbieżności co do rzeczywistej roli EPO i EPOR w procesie rozwoju choroby nowotworowej.

## **Wnioski**

1. Białka Bak, Bcl-x1, Bax oraz białko p53 są powiązane z biologią raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, a ocena immunohistochemiczna ich ekspresji może stanowić uzupełnienie postawionego rozpoznania histopatologicznego.
2. W badaniach nad rolą procesu apoptozy w rozwoju raka płaskiego jamy ustnej ocena immunohistochemiczna biorących w niej udział białek powinna dotyczyć zarówno guza pierwotnego jak i ogniska przerzutowego, a brak w guzie pierwotnym immunohistochemicznej ekspresji białek z grupy Bcl-2 zaangażowanych w proces apoptozy nie może być brany pod uwagę jako jedyny wykładnik tego procesu w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej.
3. Białka stymulowane niedotlenieniem guza nowotworowego EPO i EPOR w powiązaniu z proapoptotycznym białkiem Bak są zaangażowane w regulację procesów warunkujących przeżycie i śmierć komórki, a ocena ich binarnych ekspresji przemawia za ich związkiem z uznanymi patomorfologicznymi czynnikami rokowniczymi raka jelita grubego takimi jak: typ histopatologiczny, stopień złośliwości histologicznej (G), głębokość naciekania struktur jelita grubego (pT) oraz obecność lub brak przerzutów do węzłów chłonnych (pN).
4. Nie wykazano przydatności binarnej oceny białek p53 - EPO oraz p53 - EPOR w prognozowaniu patomorfologicznych czynników rokowniczych raka jelita grubego.
5. Porównawcza ekspresja białek proapoptotycznych p53 i Bak w raku jelita grubego wskazuje na brak powiązań pomiędzy tymi białkami.
6. Immunohistochemiczna nadekspresja białka p53 w raku jelita grubego nie wiąże się z czasem przeżycia chorych
7. Białka Bak i Bcl-x1, wewnątrzkomórkowe białko sygnalizacyjne STAT3 oraz receptory steroidowe ER $\alpha$  i PR są zaangażowane w regulację procesu apoptozy w raku endometrioidalnym trzonu macicy.
8. W raku endometrioidalnym trzonu macicy zwłaszcza obecność receptorów ER $\alpha$  jest silnie powiązana z wzajemnymi korelacjami białka STAT3 oraz białek Bak i Bcl-x1.

9. Wysoka ekspresja białka STAT3 stwierdzana w jądrach komórek raka endometrioidalnego trzonu macicy sugeruje możliwość wykorzystania oceny ekspresji tego białka jako biomarkera procesu nowotworowego oraz może służyć do wyodrębnienia grupy nowotworów, w których celowe byłoby zastosowanie farmakologicznego hamowania aktywności STAT3.
10. Nasiloną immunohistochemiczną ekspresją białek HIF-1 $\alpha$ , EPO i EPOR w gruczolakoraku jelita grubego wskazuje na deficyt tlenowy komórek nowotworowych oraz może być wykładnikiem procesów warunkujących przeżycie i śmierć tych komórek.
11. Wyniki oceny korelacji ekspresji białek HIF-1 $\alpha$ , EPO i EPOR wskazują, iż droga aktywacji EPO w gruczolakoraku jelita grubego w części przypadków nie przebiega przy współudziale HIF-1  $\alpha$ .

## V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

1) Moja dotychczasowa działalność naukowa głównie skupiała się na problemach patomorfologii onkologicznej, co znalazło potwierdzenie w wydrukowanych 38 pracach oraz 45 streszczeniach zjazdowych. Badania te przede wszystkim dotyczyły raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, raka sutka, raka jelita grubego i raka endometrium.

- Patomorfologia raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.

Badania nad rakiem jamy ustnej dotyczyły raka płaskonabłonkowego i jego przerzutów do węzłów chłonnych i białek z rodziny Bcl2 biorących udział w procesach apoptozy. W pracy „*Correlation between Bcl-2 protein expression and some clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma*” *Pol J of Pathol*, 2003T.54 nr 1:49-52 ekspresja antyapoptotycznego białka Bcl-2 analizowana w materiale pooperacyjnym raków jamy ustnej, korelowała z wyższym stopniem histologicznej złośliwości, wyższym indeksem mitotycznym oraz wyższym indeksem atypowych mitoz. W badaniach nad onkogenezą raka płaskonabłonkowego jamy ustnej zwróciliśmy także uwagę na ważną rolę receptora EGFR oraz białka TGF- $\alpha$ . W pracy “*May epidermal Growth Factor Receptor(EGFR) be a Biomarker of the Oncogenic Influence of Environmental Carcinogens on Oral Cavity Health Status?*”. *Polish Journal of Enviromental Studies* 2008;17.Part I 481-492, stwierdzono ekspresję EGFR aż w 82 % badanych przypadków raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Statystycznie

wysoką dodatnią korelację wykazano pomiędzy EGFR a stopniem zaawansowania klinicznego T ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,5$ ) i stopniem złośliwości histologicznej G ( $p = 0,004$ ,  $r = 0,4$ ). A ponieważ uważa się, iż EGFR bierze udział między innymi w odbiorze sygnałów inicjujących podziały komórkowe i przekazywaniu ich dalej do jądra komórkowego wyniki te mogą pośrednio świadczyć o wpływie EGFR na promocję raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Z kolei w pracy pt. „*Transforming Growth Factor – Alpha (TGF- $\alpha$ ) as a biomarker of the Disease in Squamous Cell Oral Carcinoma*”. *Polish Journal of Enviromental Studies* 2008;17.Part I 493-501 wykazano również ekspresję białka TGF- $\alpha$  w 92% badanych przypadków raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, a statystycznie dodatnią korelację zaobserwowano pomiędzy ekspresją TGF- $\alpha$  a stopniem złośliwości histologicznej G, co pozwoliło wysunąć konkluzje, iż TGF- $\alpha$  jest powiązany z progresją raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.

- Patomorfologia raka sutka.

Badania nad czynnikami sprzyjającymi powstawaniu i szerzeniu się nowotworów były również tematem badań nad karcinogenezą raka gruczołu piersiowego i jego przerzutami do węzłów chłonnych. Badania te dotyczyły roli koneksyn 26 i 43, niektórych białek biorących udział w apoptozie ( Bcl-2, Bak, Bcl-xl), insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF-I i IGF-II oraz receptorów estrogenowych  $\alpha$  i  $\beta$ .

W ostatnich latach w doniesieniach naukowych zwrócono uwagę na możliwość udziału koneksyn uczestniczących w komunikacji międzykomórkowej w szerzeniu się procesu nowotworowego. W pracy pt: “*Expression of connexin 43 in breast cancer in comparison with mammary dysplasia and the normal mammary gland* “. *Folia Morphologica* 2003; Vol. 62 No. 4, 439-442 porównaliśmy ekspresję koneksyny 43( Cx43) w tkance sutka, w tkance prawidłowej, dysplastycznej oraz w raku sutka. Nasze wyniki wskazują, iż ekspresja Cx43 w dysplazji i raku piersi uległa zmianie i jest inna niż w tkance prawidłowej. W tkance prawidłowej obserwowaliśmy ekspresję międzykomórkową, punktową. W tkance dysplastycznej obserwowaliśmy ekspresję Cx 43 mieszaną (śródplazmatyczną i międzykomórkową) natomiast w tkance rakowej obserwowaliśmy ekspresję Cx43 głównie w cytoplazmie - typu rozlanego lub ziarnistego. Zmiana w ekspresji koneksyny może świadczyć o zaburzeniu komunikacji międzykomórkowej w tkance dysplastycznej a zwłaszcza pomiędzy komórkami raka piersi. Z kolei w kolejnej pracy

“*Connexins 26 and 43 correlate with Bak, but not with Bcl-2 protein in breast cancer*” *Oncol Rep.* 2005 Aug;14(2):325-9. wykazaliśmy dodatnią korelację pomiędzy ekspresją Cx26 i białka proapoptotycznego Bak, brak korelacji między białkiem antyapoptotycznym Bcl-2 oraz dodatnią korelację pomiędzy ekspresją koneksyny Cx43 i Bak i brak korelacji z Bcl-2. Stwierdziliśmy także śródplazmatyczną lokalizację badanych koneksyn, co może potwierdzać koncepcję zmian w ekspresji koneksyn w komórkach raka piersi. Natomiast dodatnia korelacja pomiędzy Cx 26 a białkiem Bak może sugerować, że koneksyny zlokalizowane w cytoplazmie mogą uczestniczyć w sygnalizacji szlaków apoptotycznych – pełniąc rolę supresora karcinogenezy w raku piersi. W piśmiennictwie naukowym ostatnich lat dotyczącym karcinogenezy pojawiły się doniesienia, iż koneksyny, które uczestniczą w sygnalizacji międzykomórkowej, mogą być również zaangażowane w proces powstawania przerzutów w chorobach nowotworowych. Skłoniły one do podjęcia kolejnych badań mających na celu ocenę ekspresji koneksyn Cx26 i Cx43 w pierwotnych rakach sutka oraz w ich przerzutach do węzłów chłonnych, których wyniki zawarte zostały w pracy pt: „*Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer*” *J Clin Pathol.* 2006 Apr;59(4):429-33. Podobnie jak w poprzednich pracach w pierwotnym raku sutka obserwowana była cytoplazmatyczna lokalizacja ocenianych koneksyn. W przerzutach do węzłów chłonnych zaobserwowane zostało istotnie statystycznie zwiększenie ekspresji Cx26 i Cx43 w porównaniu z guzami pierwotnymi a w komórkach rakowych pojawiał się w błonowy odczyn immunohistochemiczny. Ponadto z guzów ocenianych jako ujemne pod względem ekspresji badanych białek rozwijały się przerzuty Cx26 i Cx43-dodatnie. Przedstawione wyniki badań wskazują na możliwy udział koneksyn w powstawaniu przerzutów raka sutka do węzłów chłonnych.

W powstawaniu i rozwoju nowotworów ważną rolę odgrywają procesy apoptozy. Celem kolejnych badań była ocena ekspresji białka proapoptotycznego Bak i antyapoptotycznego Bcl-2 w prawidłowym gruczole piersiowym i zmianach dysplastycznych leżących w otoczeniu raka sutka oraz w guzie nowotworowym. Ekspresja Bcl-2 obecna była w 77.8% przypadków prawidłowego nabłonka gruczołu piersiowego, w 93% przypadków zmian dysplastycznych bez rozrostów śródprzewodowych oraz w 94% przypadków rozrostów śródprzewodowych. Natomiast ekspresja Bak obserwowana była w 39% prawidłowego nabłonka gruczołu piersiowego, w 45% przypadków zmian dysplastycznych bez rozrostów śródprzewodowych i w 67% przypadków



rozrostów śródprzewodowych badanych przypadków. W raku sutka ekspresję Bcl-2 stwierdzono w 83% a Bak stwierdzona została w 70% przypadków analizowanych guzów. Ekspresja Bcl-2 w guzie pierwotnym korelowała z korzystnymi czynnikami prognostycznymi takimi jak niższe zaawansowanie choroby (pT1), lepsze różnicowanie histologiczne nowotworu (G2) oraz brak przerzutów do węzłów chłonnych. Natomiast nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją proapoptotycznego białka Bak a analizowanymi parametrami anatomoklinicznymi raka sutka.

Na proces karcinogenezy w raku sutka mają wpływ także inne czynniki, a wśród nich między innymi: estrogeny oraz czynniki wzrostowe, takie jak: insulinopodobny czynnik wzrostu typu: I i II (IGF-I i IGF-II). Ich wpływ na komórki raka sutka zależy od obecności i aktywności właściwych im receptorów. Na przykład wyniki badań przedstawione w pracy pt: „*Expression of the insulin Receptor Substrate1 in primary tumors and lymph node metastases in breast cancer: correlation with Bcl-xL and Bax proteins*”. *Neoplasma* 2005; Vol. 52 nr 5, 361-363 potwierdzają możliwy udział białka IRS-1, które uważa się za jedno ważniejszych białek adaptorowych receptora IGF-IR w progresji raka sutka. Stwierdzono w nich, że ekspresja białka IRS-1 wykazuje pozytywną korelację z ekspresją antyapoptotycznego białka Bcl-xL oraz proapoptotycznego Bax w guzach pierwotnych, jak i w przerzutach do węzłów chłonnych. Sądzymy, iż IRS-1 poprzez aktywację mitozy i udział w regulacji równowagi między ścieżkami anty-i proapoptotycznymi może wpłynąć na odnowę komórek guza i progresję raka piersi. W ostatniej pracy poświęconej powstawaniu i rozwojowi raka sutka pt: „*ER $\alpha$  and ER $\beta$  expression in correlation with Ki-67, Bcl-2 and Bak in primary tumors and lymph node metastases of breast cancer: The effect of pre-operative chemotherapy*” *Oncology Letters* .2010; 1,. 1067-1071 analizowano wpływ chemioterapii przedoperacyjnej na zależności pomiędzy ekspresją receptorów estrogenowych  $\alpha$  i  $\beta$  oraz markerów proliferacji (Ki-67) i apoptozy Bcl-2 i Bak w ogniskach pierwotnych oraz w przerzutowych raka sutka. Zarówno w guzach pierwotnych jak i w przerzutach do węzłów chłonnych stwierdzono ujemną korelację pomiędzy ER $\alpha$  a Ki-67 oraz dodatnią pomiędzy ER $\alpha$  a Bcl-2 i ER $\beta$  a Bak. Wykazano, że chemioterapia przedoperacyjna nie miała istotnego wpływu na zależności pomiędzy ER  $\alpha$  i  $\beta$  z Ki-67, Bcl-2 i Bak. Jednakże pozytywna korelacja pomiędzy badanymi receptorami estrogenowymi a Bcl-2 i Bak potwierdza zaangażowanie tych receptorów w proces regulacji apoptozy w raku sutka.

- Patomorfologia raka endometrium

Ponieważ w kancerogenezie obserwuje się zaburzenia homeostazy, a komunikacja międzykomórkowa pełni w homeostazie ważną rolę, w badaniach nad morfologią raka endometrium ocenialiśmy ekspresję biorących w niej udział koneksyn Cx26 i Cx43. W pracy „*Comparative evaluation of estrogen and progesterone receptor expression with connexins 26 and 43 in endometrial cancer*” w *Int J Gynecol Cancer* 2009,19,1253-1257. obserwowaliśmy brak lub obniżenie ekspresji koneksyn w większości badanych raków endometrium w porównaniu do prawidłowego nabłonka endometrialnego. W przypadkach z odczynem dodatnim na koneksyny zauważalna była przewaga cytoplazmatycznej lokalizacji reakcji immunohistochemicznej i jedynie nielicznej grupie raków występował odczyn błonowy lub błonowo-cytoplazmatyczny. W przypadku koneksyny Cx26 w raku endometrium zwróciliśmy uwagę na wyraźną zmianę w jej lokalizacji. W prawidłowej błonie śluzowej obserwowano międzykomórkowy odczyn immunohistochemiczny natomiast w raku endometrium aż w 85% przypadków dodatnich odczynów immunohistochemicznych na przeciwciała anty Cx26 obserwowaliśmy cytoplazmatyczną lokalizację koneksyny Cx26. Analiza statystyczna wykazała także związek pomiędzy ekspresją koneksyny Cx26 a miejscowym zaawansowaniem guza nowotworowego (pT). Powyższe wyniki mogą wskazywać na możliwość produkcji koneksyny Cx26 w komórkach nowotworowych, która jednak prawdopodobnie nie tworzy funkcjonalnych połączeń międzykomórkowych typu gap a może natomiast pełnić inną rolę w komórkach raka. W cytoplazmie komórek rakowych stwierdziliśmy także dodatni odczyn na białko Cx43, którego ekspresja jest obserwowana wyłącznie w komórkach zrębu prawidłowej błony śluzowej. Obecność w komórkach raka nietypowej koneksyny dla komórek nabłonkowych błony śluzowej może świadczyć o tym, że komórki rakowe nabywają zdolność do produkcji białek nieobecnych w prawidłowym endometrium, co może mieć potencjalne znaczenie w tworzeniu przerzutów przez guz nowotworowy. W dalszych badaniach nad rakiem endometrium jako jedni z pierwszych podjęliśmy badania nad relacją koneksyn i białek adhezyjnych w raku endometrium u kobiet.

W pracy „*Aberrant distributions and relationships among E-cadherin,  $\beta$ -catenin and Connexin 26 and 43 in endometrioid adenocarcinomas*” *Int J Gynecol Pathol.* 2010 Jul;29(4):358-65 podjęliśmy się oceny ekspresji, lokalizacji i wzajemnych korelacji białek adhezyjnych (E-kadheryny i  $\beta$ -kateniny) oraz koneksyn 26 i 43 w raku endometrium.

Były to pierwsze tego typu badania opublikowane w PubMed. Kadheryny i kateniny odgrywają ważną rolę w formowaniu i utrzymywaniu się połączeń typu gap. E kadheryna jest opisywana jako jedno z głównych białek adhezyjnych.  $\beta$ -kateniny należą do rodziny katenin. Wykazano dwie odmienne funkcje tego białka. Większa część  $\beta$ -katenin znajdujących w komórce zlokalizowana jest przy błonie komórkowej, gdzie wchodzi w skład połączeń tworzonych przez białko transbłonowe E-kadherynę. Kompleksy w postaci kadheryna – katenina są kluczowe dla zdolności przylegania do siebie komórek. Uważa się, że E-kadheryna wzmacnia połączenia międzykomórkowe poprzez przytrzymywanie zbliżonych do siebie komórek. Podczas kancerogenezy obserwuje się zaburzenie międzykomórkowej kohezji komórek rakowych ze zmienioną ekspresją E-kadheryny i  $\beta$ -kateniny. Na podstawie prac doświadczalnych zaobserwowano, iż obniżona ekspresja czy nieprawidłowa lokalizacja E-kadheryny skutkuje zwiększoną zdolnością do tworzenia przerzutów przez komórki nowotworu. W naszej pracy zaobserwowaliśmy wyraźne zwiększenie ekspresji  $\beta$ -kateniny w rakach o zaawansowaniu (FIGO IA) niż w rakach głębiej naciekających (FIGO IB+II). Wykazaliśmy wyraźną dodatnią korelację pomiędzy E-kadheryną oraz koneksynami Cx26 i Cx43, co może tłumaczyć zaburzoną łączność międzykomórkową przy obniżonej ekspresji E-kadheryny, natomiast nie obserwowaliśmy takiego związku w przypadku  $\beta$ -kateniny.

Bardzo istotną obserwacją, wynikającą z naszej pracy było stwierdzenie zmiany lokalizacji E-kadheryny i  $\beta$ -kateniny z błonowej w przypadku prawidłowego endometrium na cytoplazmatyczną w większości raków, co może oznaczać zmianę ich dotychczasowej roli i możliwość osłabienia lub utraty prawidłowych więzi międzykomórkowych w raku endometrium. W przeciwieństwie do braku powiązań pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniną i koneksynami w raku endometrium, E-kadheryna wydaje się być ściśle powiązana z nieprawidłową - cytoplazmatyczną ekspresją koneksyn Cx26 i Cx43 w raku endometrium.

Wyniki naszej pracy wskazujące na związek ekspresji Cx26, Cx43 i E-kadheryny w raku endometrium u kobiet są pierwszymi doniesieniami na ten temat w dostępnej literaturze rejestrowanej w PubMed.

- 2) Oddzielną grupę badań naukowych stanowiły prace doświadczalne na zwierzętach, w których badano: wpływ etanolu na regenerację komórek zwojowych u szczurów, wpływ alkoholu etylowego na rozwój przerzutów nowotworowych oraz wpływ zielonej herbaty na wątrobę szczurów.

- Badania nad wpływem alkoholu etylowego na rozwój przerzutów nowotworowych oraz na regenerację komórek zwojowych u szczurów

W pracy pt: „*Morphometric and ultrastructural studies of the spinal sensory ganglia in the course of sciatic nerve regeneration in rats intoxicated with ethanol*” *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku*, 1997; 42(2):124-133. Badaliśmy zmiany w morfologii do jakich dochodzi w rdzeniowych zwojach grzbietowych u szczurów przewlekłe pojęnych alkoholem. Metodami morfometrycznymi przy użyciu komputerowego systemu analizy obrazu oraz w badaniach ultrastrukturalnych stwierdziliśmy, że podawanie szczurom przez okres 3 miesięcy alkoholu etylowego do picia wywołuje niewielkie zmiany morfologiczne w czuciowych komórkach nerwowych rdzeniowych zwojów kręgowych po stronie nieoperowanej natomiast podawany alkohol etylowy lub jego metabolity uszkadzają regenerujące komórki nerwowe rdzeniowych zwojów kręgowych przeciętego a następnie zszytego nerwu kulszowego.

Inny charakter miały prace doświadczalne przeprowadzone na szczurach rasy Wistar, w których obserwowaliśmy wpływ alkoholu etylowego na rozwój przerzutów do płuc doświadczalnego wątrobiaka Morrisa 5123, których wyniki opisaliśmy w pracy pt: „*Wpływ etanolu na rozwój przerzutów doświadczalnego raka wątroby (hepatoma Morris 5123) - w płucach szczurów*” *The influence of ethanol on the development of metastases in lung of experimental hepatoma Morris 5123. Onkologia weterynaryjna. Postępy w diagnostyce i terapii. I Konferencja Naukowa, Olsztyn, 4- 5. 09.1997 r. / Pod red. Tadeusza Rotkiewicza, Wojciecha Brzeskiego.1997; 183 – 187. Z przeprowadzonych badań wynika, że alkohol etylowy wpływa promująco na powstawanie i rozwój przerzutów w płucach szczurów. Świadczyła o tym zwiększona ilość ognisk przerzutowych, wzrost ich średniej objętości oraz wzrost ciężaru płuc u zwierząt otrzymujących etanol. W badaniach histopatologicznych obserwowaliśmy liczne ogniska przerzutowe w płucach a także w naczyniach, z dużą ilością nieprawidłowych figur podziału oraz licznymi ogniskami martwicy koagulacyjnej w ogniskach nowotworowych z wyraźnym nasileniem tych zmian w grupie z etanolem.*

Również w badaniach ultrastukturalnych w grupie szczurów pojęnych etanolem mogliśmy zauważyć wzrost aktywności komórek nowotworowych, opuchnięte komórki śródbłonka naczyń, poprzerwaną błoną podstawną oraz światła pęcherzyków wypełnione uszkodzonymi komórkami, erytrocytami i włóknikiem. Uważamy, że te zmiany w nabłonku płucnym i naczyniowym

mogły ułatwiać przyczepianie się komórek nowotworowych do błony podstawnej, ich przechodzenie poza ścianę naczynia a w konsekwencji dalsze szerzenie się nowotworu.

- 3) W ramach współpracy z Zakładem Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku podjęliśmy badania nad protekcyjnym działaniem zielonej herbaty na wątrobę szczurów, której wyniki opublikowaliśmy w pracy pt.: ” Green tea as an antioxidant which protects against alcohol induced injury in rats-a histological examination”

Nasze badania miały na celu sprawdzenie hipotezy o protekcyjnym wpływie zielonej herbaty na wątrobę szczurów przewlekle pojęnych 45% alkoholem etylowym. Badania przeprowadzono na samcach rasy Wistar podzielonych na 4 grup badawcze: I - otrzymała dietę kontrolną Libera-De Carli (L-DC), II - otrzymała (L-DC) i zieloną herbatę, III - otrzymała (L-DC) i etanol i IV - otrzymała (L-DC), zieloną herbatę i etanol. Porównując grupy I i II zaobserwowaliśmy mniej intensywne stłuszczenie wątroby w grupie II niż w grupie I, co pozwala nam sądzić, iż zielona herbata może mieć wpływ na akumulację tłuszczu w hepatocytach i ochraniać je przed stłuszczeniem. W grupie III po podaniu etanolu stłuszczenie wątroby szczurów wyraźnie wzrosło. W grupie IV u szczurów przewlekle spożywających etanol po dodaniu zielonej herbaty stłuszczenie wątroby nie zmniejszyło się jak to było w grupie II, lecz bardziej się nasiliło w porównaniu do pozostałych grup. Na podstawie tych badań stwierdziliśmy, iż zielona herbata pełni ważną rolę w regulacji gospodarki tłuszczowej w wątrobie. W przypadku diety wysoko tłuszczowej możemy potwierdzić jej rolę protekcyjną na komórki wątroby, natomiast w przypadku połączenia diety wysoko tłuszczowej i przewlekłego spożywania etanolu wykazaliśmy destrukcyjny wpływ zielonej herbaty na komórki wątroby.

- 4) Jako kierownik uczestniczyłem w realizacji następujących projektów naukowych w ramach prac statutowych Uczelni:

- Nr 123447 w roku 1997 Badania morfologiczne aktywności proliferacyjnej złośliwych guzów tkanek miękkich typu włókniakomięsaków histiocytarnych (malignant fibrous histiocytoma) .
- Nr 3-12887 w roku 2002 „Badanie cytoprotekcyjnego wpływu zielonej herbaty na komórki wątroby na podstawie modelu doświadczalnego na zwierzętach. Badania morfologiczne i ultrastrukturalne” .

- Nr 3-93667 w roku 2004 „Ocena ekspresji onkoprotein Bak, Bax w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej i jego przerzutach do węzłów chłonnych”
- Nr 3-93517 w roku 2005 „Ocena ekspresji onkoprotein Bax i Bcl-xL biorących udział w regulacji apoptozy w raku jamy ustnej i jego przerzutach do węzłów chłonnych”.
- Nr 3-93551 w roku 2006 „Badania ekspresji koneksyn 26,32 i 43 w raku endometrium”
- Nr 3-93551 w roku 2006 „Badania ekspresji koneksyn 26,32 i 43 w raku endometrium w powiązaniu z ekspresją receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz wybranych białek adhezyjnych”
- Nr 3-14603P w roku 2008 „Badania ekspresji koneksyn 26,32 i 43 w raku endometrium w powiązaniu z ekspresją receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz wybranych białek adhezyjnych”

5) Jako współwykonawca uczestniczyłem w następujących projektach naukowych:

- Nr 3-34488 w roku 2004 „Czynnik wzrostowy alfa (TGF- $\alpha$ ) u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym błony śluzowej jamy ustnej”
- Nr 3-14754 w roku 2007 „Porównanie przedoperacyjnych poziomów surowiczych VEGF, VE-cadherin i EPO w ludzkim raku jelita grubego w powiązaniu z oceną surowiczych poziomów wybranych metaloproteinaz”.
- Nr 3-14757 w roku 2007 „Ekspresja EPO i EPOR w raku jelita grubego”
- Nr 3-14759 w roku 2007 „Badanie ekspresji koneksyny 32 w przerzutach raka sutka do regionalnych węzłów chłonnych w korelacji z ekspresją tego białka w guzie pierwotnym”.
- Nr 3-14760 w roku 2007 „Ocena ekspresji leptyny i jej receptora w powiązaniu z apoptozą w raku sutka u kobiet”.
- Nr 3-14541 w roku 2009 „Ocena zależności pomiędzy ekspresją leptyny a receptorem insulino-podobnego czynnika wzrostu typu I (IGF-IR) oraz substratem receptora insulinowego typu 1 (IRS-1) w pierwotnym raku gruczołu piersiowego”.

- Nr 3-14543 w roku 2009 „Badania związanych z niedotlenieniem czynników wzrostu i przeżycia komórek w raku jelita grubego – ocena korelacji surowiczych poziomów EPO i IGF-1 z immunоекспресją wybranych białek w guzie pierwotnym”.
  - Nr 3-14540 w roku 2009 „Zdolność konwersji limfocytów krwi obwodowej w komórki T regulatorowe w schorzeniach o podłożu zapalnym i nowotworach”.
  - Nr 3-14538 w roku 2009 „Analiza powiązań ekspresji beta-kateniny z TGF-beta1, HIF-1 alfa oraz aktywnością proliferacyjną w raku jelita grubego”.
  - Nr 4-14836P w roku 2010 „STAT3 a markery apoptozy i proliferacji w gruczolakoraku endometrioidalnym”
  - Nr 4-14837 w roku 2010 „Badania związanych z niedotlenieniem czynników wzrostu i przeżycia komórek w raku jelita grubego-ocena korelacji immunоекспресji wybranych białek”
  - Nr 113-94559LM w roku 2011 „Analiza powiązań ekspresji białek warunkujących komunikację międzykomórkową z udziałem połączeń gap oraz procesy proliferacji i różnicowania w raku jelita grubego”.
  - Nr 113-94906LM w roku 2011 „Analiza związku ekspresji E-kadheryny i leptyny w raku jelita grubego”
  - Nr 123-14604P w roku 2012 „Badania związanych z niedotlenieniem czynników wzrostu i przeżycia komórek raka jelita grubego-ocena korelacji immunоекспресji wybranych białek”
  - Nr 123-14603P w roku 2012 „Badanie ekspresji białek adhezyjnych – E-kadheryny i  $\beta$ -kateniny oraz koneksyn 26, 32 i 43 w powiązaniu z wybranymi cechami anatomoklinicznymi raka jelita grubego”.
  - Nr 133-14658P w roku 2013 „Badania związanych z niedotlenieniem czynników wzrostu i przeżycia komórek raka jelita grubego oraz białek związanych z adhezją i komunikacją międzykomórkową”.
  - Nr 133-14659P w roku 2013 „Komunikacja międzykomórkowa w procesie karcinogenezy w jelicie grubym”
- 6) Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych 2014 rok - 1 manuskrypt dla czasopisma „Planta Medica”
- 7) Mój dorobek naukowy obejmuje 119 publikacji w tym 60 prac i 59 doniesień zjazdowych.

Wskaźnik **I F- 26,336**, punkty **MNiSW 558, IC 235,99**

**8)** Wskaźnik Impact Factor prac będących rozprawą habilitacyjną **IF- 6,04** i **84 MNiSW**.

Suma cytowań publikacji według bazy *Web of Science* – **250**. Indeks h = **8**.

**9)** Za osiągnięcia naukowe uzyskałem nagrody JM Rektora:

- 1997- nagroda zespołowa I stopnia
- 1998- 2x nagroda zespołowa I stopnia i 1x II stopnia
- 2004- nagroda zespołowa I stopnia
- 2005- 2x nagroda zespołowa I stopnia i 1x III
- 2006- nagroda zespołowa I stopnia
- 2008- 2x nagroda zespołowa I stopnia i 1x III stopnia
- 2009- nagroda zespołowa III stopnia
- 2010- nagroda zespołowa I stopnia
- 2011- nagroda zespołowa I stopnia
- 2012- nagroda zespołowa II stopnia

## **10) Działalność dydaktyczno-wychowawcza**

Od początku mojej pracy prowadziłem ćwiczenia, seminaria i wykłady z zakresu patomorfologii dla studentów.

- W latach 1987-2003: III i IV roku Wydziału Lekarskiego, studentów III roku oddziału Stomatologii i III roku Analityki Medycznej, III roku Oddziału Stomatologii, III roku oddziału Analityki Medycznej.
- Od 2003 roku: III roku Wydziału Lekarskiego, II roku Oddziału Fizjoterapii, II roku Logopedii z Fonoaudiologią, II roku Pielęgniarstwa, II roku Położnictwa, III roku Oddziału Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego.
- Uczestniczyłem także w przygotowywaniu programu nauczania z zakresu patomorfologii dla studentów Fonoaudiologii. Uczestniczę w redakcji pytań i przygotowaniu końcowego egzaminu testowego z patomorfologii dla studentów IV roku Wydziału Lekarskiego oraz dla studentów Logopedii z Fonoaudiologią, Analityki Medycznej i Fizjoterapii.



## 11) Działalność organizacyjna

- Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Patologów.
- Byłem członkiem komitetu organizacyjnego sesji naukowo-Szkoleniowej PTP Oddziału w Białymstoku i Sekcji Cytologii Klinicznej – Postępy w diagnostyce patomorfologicznej nowotworów płuc i tkanek miękkich (Białystok-Białowieża, 1994).
- Byłem członkiem komitetu organizacyjnego sesji naukowo-Szkoleniowej PTP w XXII Sympozjum Sekcji Cytologii Klinicznej (Białystok, 1999).
- Byłem członkiem komitetu organizacyjnego sesji naukowo-Szkoleniowej sympozjum naukowego: NATO Advanced Research Workshop. Endocrine Disrupters and Carcinogenic Risk Assessment. (Białystok, 2001).
- Byłem członkiem komitetu organizacyjnego XIX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Patologów (Białystok 2013).

