

Znak: KHC-2

Uniwersytet Medyczny
we WrocławiuRPW/12967/2023 P
Data:2023-07-26Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO RADY DISCYPLINY
NAUKI MEDYCZNEwpl.
dnia 26-07-2023

L. dz. RN-BM/ 1344

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Anety Popiel-KopaczykKatedra Histologii i Embriologii
Wydział Nauk Medycznych w
Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny w
Katowicach

40-752 Katowice, ul. Medyków 18

KIEROWNIK KATEDRY

Prof. dr hab. Piotr Czekaj

pcz@sum.edu.pl

tel.: (+48 32) 2088374

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32)2088644

fax: (+48 32)2088656

katedrahistologii@sum.edu.pl

Podstawą do napisania rozprawy doktorskiej lek. Anety Popiel-Kopaczyk pt.: „Ekspresja testyny oraz markerów przejścia epitelialno-mezenchymalnego w rakach szyjki macicy oraz zmianach przedinwazyjnych” były cztery publikacje o łącznym IF=16,767 (300 punktów MNiSW), stanowiące cykl tematyczny. We wszystkich publikacjach Doktoratka jest pierwszym autorem. Były to:

1. A. Popiel, C. Kobierzycki, P. Dzięgiel: The role of Testin in Human Cancers. *Pathology Oncology Research*. 2019; 25(4):1279-1284. IF:2,826; Pkt. MNiSW: 70
2. A. Popiel, A. Piotrowska, P. Sputa-Grzegorzówka, B. Smolarz, H. Romanowicz, P. Dzięgiel, M. Podhorska-Okołów, C. Kobierzycki: Preliminary Study on the Expression of Testin, p16 and Ki-67 in the Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Biomedicines*. 2021 Aug 13; 9(8):1010. IF: 4,757; Pkt. MNiSW: 20
3. A. Popiel-Kopaczyk, J. Grzegorzówka, A. Piotrowska, M. Olbromski, B. Smolarz, H. Romanowicz, A. Rusak, M. Mrozowska, P. Dzięgiel, M. Podhorska-Okołów, C. Kobierzycki: The Expression of Testin, Ki-67 and p16 in Cervical Cancer Diagnostics. *Current Issues in Molecular Biology*. 2023; 45(1):490-500. IF: 2,976; Pkt. MNiSW: 70
4. A. Popiel-Kopaczyk, A. Piotrowska, P. Sputa-Grzegorzówka, B. Smolarz, H. Romanowicz, P. Dzięgiel, M. Podhorska-Okołów, C. Kobierzycki: The Immunohistochemical Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition Markers in Precancerous Lesions and Cervical Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, 24, (9): 8063. IF: 6,208; Pkt. MNiSW: 140

W pracy poglądowej Doktoratka poddała analizie aktualny stan wiedzy na temat roli testyny w chorobach nowotworowych. Prace eksperymentalne miały na celu określenie lokalizacji i ekspresji testyny oraz markerów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego w rakach szyjki macicy oraz zmianach przedinwazyjnych.

Prace powstały w wyniku realizacji grantu naukowego PRELUDIUM o numerze 2018/29/N/NZ5/01911 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki oraz projektu badawczego finansowanego ze środków Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Powyższe zestawienie wskazuje, że zebrany przez lek. Anetę Popiel-Kopaczyk materiał badawczy jest wartościowy i został prawidłowo opracowany, a dorobek ten, jak i uzyskane wnioski znalazły uznanie w oczach niezależnych recenzentów czasopism o wysokim wskaźniku IF oraz ekspertów oceniających aplikacje grantowe. Badania zostały przeprowadzone i opublikowane w krótkim czasie, co wskazuje na przygotowanie merytoryczne, umiejętności organizacyjne, ambitne podejście i pracowitość Doktorantki.

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej była analiza ekspresji białka testyny oraz markerów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego w odniesieniu do danych kliniczno-patologicznych dotyczących zmian przedinwazyjnych oraz raka szyjki macicy.

Testyna występuje w cytoplazmie i błonie komórkowej prawidłowych komórek, wchodzi w interakcje z innymi białkami cytoszkieletu pełniąc rolę regulatora mobilności komórek. Obniżona ekspresja testyny zmniejsza kontakt pomiędzy komórkami zwiększając ich ruchliwość, m.in. w nowotworach męskich i żeńskich narządów rozrodczych, narządów układu pokarmowego, czy płuc. W tym kontekście brakuje jednak badań znaczenia testyny w zmianach przednowotworowych i nowotworowych szyjki macicy. Wielu autorów wskazuje, że wyższa ekspresja testyny indukuje apoptozę, hamuje proliferację komórek nowotworowych oraz zatrzymuje komórki w fazie G1 cyklu komórkowego. Potencjalnie pełni też funkcję supresorową dzięki powinowactwu do białka MENA, które wypiera z typowych lokalizacji subkomórkowych (m.in. ognisk przylegania). Białko MENA jest często nadekspresjonowane w komórkach nowotworowych i może być odpowiedzialne za mobilność (przerzutowanie) komórek nowotworowych. Z drugiej strony ekspresja testyny często jest nieobecna w komórkach nowotworowych. Niska ekspresja testyny koreluje z wyższym stopniem złośliwości histologicznej oraz jest niekorzystnym markerem prognostycznym.

Potencjalny związek testyny z ekspresją markerów nowotworowych w zmianach przedinwazyjnych i w raku szyjki macicy stanowi więc interesujący obszar badań naukowych. Pomimo poprawy sytuacji w zakresie diagnostyki oraz możliwości terapeutycznych rak szyjki macicy stanowi nadal istotny problem kliniczny, społeczny, a także ekonomiczny. Wciąż występują trudności diagnostyczne oraz znaczny procent niezadowolających wyników leczenia pacjentek z wyżej wymienionymi nowotworami. Niekorzystne dane epidemiologiczne (wg Krajowego Rejestru Nowotworów Polska jeden z najniższych w Europie wskaźników 5-letnich przeżyć w raku szyjki macicy wynoszący 48,3% przy średniej europejskiej 62,1%) oraz brak dostatecznej wiedzy na temat biologii tego nowotworu wskazują na potrzebę poszukiwania nowych, czułych oraz specyficznych markerów prognostycznych oraz predykcyjnych raka szyjki macicy. Wiadomo też, że przerzuty rozwijają się u 15% do 61% kobiet z rakiem szyjki macicy, zwykle w ciągu pierwszych dwóch lat od zakończenia leczenia.

Ważną rolę na etapie progresji nowotworu, znacząco pogarszając rokowanie odgrywa wieloetapowy proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). Wcześniejsze badania opisywały ekspresję markerów EMT w raku szyjki macicy, jednak nie prowadzono badań dotyczących ich ekspresji w zmianach przedinwazyjnych.

Celem pracy poglądowej pt. *The role of Testin in Human Cancers* było zebranie najnowszych danych literaturowych na temat roli testyny w chorobach nowotworowych. Doktorantka opisała rolę testyny w nowotworach człowieka wskazując, że białko to wykazuje obniżoną ekspresję w wielu nowotworach, gen *TES* może jednocześnie pełnić rolę genu supresorowego, co może być przydatne w zindywidualizowanej terapii nowotworów, a sama testyna mogłaby być markerem prognostycznym.

W kolejnych dwóch pracach Autorka oceniła ekspresję testyny oraz p16 i Ki-67 w przypadkach neoplazji śródnabłonkowej (CIN1, CIN2, CIN3) oraz w grupie kontrolnej, którą stanowiła prawidłowa tkanka pobrana z szyjki macicy pacjentek, a także w przypadkach raka szyjki macicy, głównie raka płaskonabłonkowego.

W pracy pt. *Preliminary Study on the Expression of Testin, p16 and Ki-67 in the Cervical Intraepithelial Neoplasia*, zastosowała metodę immunohistochemiczną (IHC - mikromacierze tkankowe) do zbadania dużej grupy 229 przypadków neoplazji śródnabłonkowej (CIN1 - 31 przypadków; CIN2 - 75; CIN3 - 123), wykazując istotnie podwyższoną ekspresję testyny w neoplazji śródnabłonkowej w porównaniu do kontroli oraz w grupie HSIL względem LSIL. Cytoplazmatyczna ekspresja testyny pozytywnie korelowała z ekspresją markera proliferacji komórkowej Ki-67 oraz ekspresją białka p16, kluczowego dla regulacji prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego. Autorka sugeruje, że użycie w diagnostyce zmian przedinwazyjnych tych trzech markerów mogłoby poprawić czułość i swoistość badania.

W pracy pt. *The Expression of Testin, Ki-67 and p16 in Cervical Cancer Diagnostics* Doktorantka wykorzystała metodę IHC (mikromacierze tkankowe) do zbadania ekspresji testyny w 91 przypadkach raka szyjki macicy oraz metodę Western Blot (WB) do badań w trzech liniach komórkowych raka szyjki macicy: HeLa, SiHa (HPV pozytywna), C-33A (HPV negatywna). Wykazała, że ekspresja testyny jest niższa w komórkach nowotworowych w porównaniu do prawidłowej tkanki szyjki macicy, natomiast ekspresja Ki-67 oraz p16 wyższa w grupie raków szyjki macicy. Ekspresja testyny negatywnie korelowała z Ki-67 oraz p16. Analiza ekspresji testyny metodą WB we wszystkich liniach komórkowych raka szyjki macicy potwierdziła obserwacje IHC, co – jak sugeruje Doktorantka – może być związane z supresorowymi właściwościami testyny.

W trzeciej pracy doświadczalnej, pt. *The Immunohistochemical Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition Markers in Precancerous Lesions and Cervical Cancer*, Autorka zastosowała

metodę IHC do zbadania lokalizacji i ekspresji, a w końcu korelacji markerów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (TWIST, SNAIL i SLUG) w 229 przypadkach śródnabłonkowej neoplazji oraz 124 przypadkach raka szyjki macicy. Wykazała silniejszą ekspresję czynników transkrypcyjnych TWIST, SNAIL oraz SLUG w zmianach przedinwazyjnych oraz w rakach szyjki macicy niż w prawidłowej tkance szyjki macicy. Zaobserwowała także istotne statystycznie różnice w ekspresji TWIST, SNAIL i SLUG w rakach szyjki macicy w odniesieniu do stopnia zaawansowania histologicznego, gdzie ekspresja markerów była znacząco niższa w G1 vs. G2 i G3. Wykazała, że wyższa ekspresja markerów EMT koreluje dodatnio ze stopniem złośliwości histologicznej zarówno w śródnabłonkowej neoplazji, jak i raku szyjki macicy.

Należy podkreślić, że analizy opisane w publikacjach wchodzących w skład cyklu prac zostały wykonane przez Doktorantkę na stosunkowo dużych grupach badanych, co dało podstawę do wykonania odpowiednich testów statystycznych. Badania dotyczące testyny wskazują na stopniowy wzrost jej ekspresji w śródnabłonkowej neoplazji oraz obniżenie w raku szyjki macicy. Wykazano korelację pomiędzy ekspresją testyny a stosowanymi w diagnostyce markerami Ki-67 oraz p16. Badanie markerów EMT pozwoliło wskazać na udział tego procesu w kancerogenezie raka szyjki macicy.

Na podstawie przeprowadzonych badań, Doktorantka wysunęła trzy wnioski:

- 1) Wzrost nasilenia ekspresji testyny w zmianach przednowotworowych może wskazywać na udział tego białka w procesie transformacji nowotworowej.
- 2) Negatywna korelacja ekspresji testyny z białkami zaangażowanymi w proliferację komórkową w rakach szyjki macicy może świadczyć o supresorowej roli tego białka w kancerogenezie.
- 3) Wyższa ekspresja markerów przejścia epitelialno-mezenchymalnego (TWIST, SNAIL, SLUG) w zmianach przedinwazyjnych oraz rakach szyjki macicy w porównaniu do prawidłowej tkanki szyjki macicy może świadczyć o udziale badanych białek w procesie nowotworzenia szyjki macicy.

W odniesieniu do zawartych we wnioskach stwierdzeń sugerowałbym bardziej zdecydowane ich formułowanie, bez powtarzającego się „może” oraz zastąpienie w tekście polskim określenia „epitelialno-mezenchymalnego” zwrotem „nabłonkowo-mezenchymalnego”.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca doktorska lek. Anety Popiel-Kopaczyk stanowi spójną całość i może być rozpatrywana jako cykl publikacji. Stanowiące ją publikacje z pierwszym autorstwem Doktorantki, zostały zamieszczone w czasopiśmie o bardzo dobrym wskaźniku IF. Praca ma charakter nowatorski, a jej wyniki, jeśli zostaną potwierdzone, mogą mieć

znaczenie praktyczne, pozwolą na rozwój nowych narzędzi diagnostyczno-terapeutycznych, a w przyszłości mogą mieć wpływ na tworzenie terapii personalizowanych.

Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z roku 2017, poz. 1789), tj. stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego będącego przedmiotem badań, a Autorka pracy wykazała się ogólną wiedzą teoretyczną z zakresu nauk medycznych oraz umiejętnością samodzielnego planowania i prowadzenia pracy naukowej. Dlatego też, wnoszę o dopuszczenie lek. Anety Popiel-Kopaczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę jakość przedstawionej do recenzji rozprawy, a także oceniając proporcję zaangażowania Autorki do uzyskanego efektu naukowego wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pt.: „Ekspresja testyny oraz markerów przejścia epitelialno-mezenchymalnego w rakach szyjki macicy oraz zmianach przedinwazyjnych”.

KIEROWNIK
Katedry Histologii i Embriologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr-hab. n. med. Piotr Czekał