

WdW
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNEJ
m. Podhorska-Okołów
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	18-08-2023
L. dz. RN-BM/	1057

05.08.2023 r. Warszawa

dr hab. n. med. Roman Sosnowski
Kierownik Kliniki Urologii i Onkologii Urologicznej

Warmińsko - Mazurskie Centrum Onkologii, Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej
MSWiA w Olsztynie

Recenzja pracy doktorskiej Pana Łukasza Nowaka „Ocena biomarkerów nowej generacji w prognozowaniu przebiegu klinicznego raka pęcherza moczowego wysokiego ryzyka” przedstawionej mi do oceny przez Wysoką Radę Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Rak pęcherza moczowego stanowi istotny problem we współczesnej uro-onkologii. Według ostatnich danych epidemiologicznych jest dziesiątym pod względem zachorowań i trzynastym pod względem śmiertelności nowotworem na świecie. W 2019 roku zdiagnozowano na świecie ponad pół miliona przypadków i zarejestrowano około 200 tys. zgonów. Wciąż wyniki leczenia nie są zadowalające pomimo rozwoju metod diagnostycznych czy operacyjnych oraz wdrażania nowoczesnego leczenia systemowego. Należy także zwrócić uwagę na istotny negatywny wpływ postępowania terapeutycznego na jakość życia chorego i to niezależnie jak okaleczające takie leczenie zostało wdrożone. Poszukiwanie odpowiedzi na pytania jak powinna wyglądać skuteczna diagnostyka, jak właściwie dopasować do danego chorego leczenie, jak oszacować rokowania, jak zapewnić pacjentowi najlepszy komfort w czasie i po leczeniu, jak utrzymać na dobrym poziomie jego jakość życia, stanowią wyzwania współczesnej uro-onkologii.

Przekazana mi do recenzji praca została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Wojciecha Krajewskiego oraz Dr hab. Aleksandra Pawlaka, prof. uczelni. Ośrodek urologiczny w którym pracuje Pan prof. Wojciech Krajewski jest uznanym miejscem na polskiej mapie urologicznej z istotnym wkładem w szczególności w rozwój diagnostyki i leczenia nowotworów urothelialnych.

Na rozprawę doktorską składa się monotematyczny cykl publikacji opublikowany w międzynarodowych czasopiśmie naukowych.

Nowak, Ł., Krajewski, W., Małkiewicz, B., Szydełko, T., & Pawlak, A. (2022). Characteristics and Applications of Canine In Vitro Models of Bladder Cancer in Veterinary Medicine: An Up-to-Date Mini Review. *Animals (Basel)*, 12(4), 516.

Nowak, Ł., Krajewski, W., Poterek, A., Śliwa, A., & Zdrojowy, R. (2020). The prognostic value of programmed cell death protein ligand 1 in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacille Calmette-Guérin immunotherapy: Current status. *Arab journal of urology*, 19(1), 67–70.

Krajewski, W., **Nowak, Ł.**, Moschini, M., Poletajew, S., Chorbińska, J., Necchi, A., Montorsi, F., Briganti, A., Sanchez-Salas, R., Shariat, S. F., Palou, J., Babjuk, M., Teoh, J. Y., Soria, F., Pradere, B., Ornaghi, P. I., Pawlak, A., Dembowski, J., & Zdrojowy, R. (2021). Impact of Adjuvant Chemotherapy on Survival of Patients with Advanced Residual Disease at Radical Cystectomy following Neoadjuvant Chemotherapy: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of clinical medicine*, 10(4), 651.

Nowak, Ł., Krajewski, W., Moschini, M., Chorbińska, J., Poletajew, S., Tukiendorf, A., Muilwijk, T., Joniau, S., Tafuri, A., Antonelli, A., Orlando, R., Di Trapani, E., Alvarez-Maestro, M., Simone, G., Zamboni, S., Simeone, C., Marconi, M. C., Mastroianni, R., Piszczek, R., Xylinas, E., European Association of Urology - Young Academic Urologists (EAU-YAU): Urothelial Carcinoma Working Group (2021). Assessment of the oncological outcomes of three different bacillus Calmette-Guérin strains in patients with high-grade T1 non-muscle-invasive bladder cancer. *Arab journal of urology*, 19(1), 78–85.

Nowak, Ł., Krajewski, W., Dejnaka, E., Małkiewicz, B., Szydełko, T., & Pawlak, A. (2023). Ubiquitin-Specific Proteases as Potential Therapeutic Targets in Bladder Cancer-In Vitro Evaluation of Degrasyn and PR-619 Activity Using Human and Canine Models. *Biomedicines*, 11(3), 759.

Łączna wartość współczynnika oddziaływania IF wynosi 12,952 oraz 480 punktów wg wykazu czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. We wszystkich publikacjach lek. Łukasz Nowak jest pierwszym lub drugim autorem.

Praca doktorska liczy 48 stron i napisana jest w typowym układzie doktoratu składającego ze zbioru prac naukowych. Spis treści ma klasyczną, klarowną strukturę z podziałem na: wstęp, cel pracy, publikacje naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, podsumowanie, wnioski oraz piśmiennictwo składające się z 16 pozycji.

We wstępie pracy autor dokładnie przedstawia zagadnienia związane z epidemiologią, czynnikami ryzyka, patogenezą, symptomatologią, klasyfikacją histopatologiczną oraz diagnostyką jak i postępowaniem terapeutycznym dotyczącym raka pęcherza moczowego. W sposób wnikliwy przedstawiane są dane epidemiologiczne dotyczące raka pęcherza

moczowego w odniesieniu do Polski i Europy, co w klarowny sposób pozwala na ich porównanie. Ważnym omówionym podrozdziałem są metody diagnostyczne związane z omawianą chorobą. Zwrócono słusznie uwagę na istotną cechę nowotworu pęcherza moczowego jaką jest nawrotowość a co jest z tym związane konieczność wykonywania wielokrotnych kontroli, badań diagnostycznych i wynikających z tego istotnych kosztów. Recenzent zwraca się z prośbą o rozwinięcie pojęcia „leczenie adjuwantowe” i przedstawienie wyników zbiorczych publikacji dotyczących tego zagadnienia.

Kolejnym ważnym i wnikliwie opisanym tematem jest wątek ekspresji wybranych białek związany z nowotworzeniem i przerzutowaniem. W tym zakresie ubikwityna odgrywać może istotną rolę co przekłada się na wykorzystanie szlaków molekularnych związanych z procesem deubikwitynylacji.

Ostatnim wątkiem opisanym we wstępie jest koncepcja prowadzenia badań onkologicznych na modelach zwierzęcych co w przypadku raka pęcherza dotyczy modeli psich.

Cel pracy jest sformułowany jasno i precyzyjnie i dotyczył analizy wybranych markerów molekularnych mających potencjalne znaczenie prognostyczne, jak i stanowiących potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu raka pęcherza moczowego oraz analizy wpływu wybranych form terapeutycznych na wyniki leczenia pacjentów z tym nowotworem.

W dalszej części pracy autor przedstawia publikacje będące tematem rozprawy.

W publikacji **Characteristics and Applications of Canine In Vitro Models of Bladder Cancer in Veterinary Medicine: An Up-to-Date Mini Review. Animals (Basel), 12(4), 516** przedstawiono analizę aktualnego stanu wiedzy dotyczącej psich modeli in vitro raka pęcherza moczowego oraz ich zastosowań w badaniach nad nowymi markerami molekularnymi i terapeutycznymi. Przeprowadzono podsumowanie dostępnych danych z 33 prac naukowych, oceniających charakterystykę histopatologiczną i molekularną 19 ustalonych linii komórkowych. Ponadto w sposób szczegółowy omówiono zalety i wady hodowli dwu- i trójwymiarowych. Większość dostępnych ustalonych linii komórkowych psiego raka pęcherza moczowego wywodzi się z pierwotnie inwazyjnych guzów pęcherza o wysokim stopniu złośliwości (G3). Linie komórkowe (hodowle dwuwymiarowe) stanowią główny materiał badawczy w eksploracji nowych biomarkerów i leków głównie ze względu na swoją niską cenę i możliwość prowadzenia eksperymentów w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. Jednakże, wyniki uzyskane z użyciem tych ustalonych linii komórkowych nie odzwierciedlają dokładnie warunków panujących in vivo, głównie z powodu braku interakcji komórek nowotworu z mikrośrodowiskiem guza. W związku z powyższymi ograniczeniami, wyniki eksperymentów opartych na ustalonych liniach komórkowych rzadko przekładają się na zastosowania kliniczne, mimo szerokiego ich zastosowania w badaniach eksperymentalnych.

W literaturze opisano komórkowe hodowle trójwymiarowe psiego raka pęcherza moczowego, w tym organoidy wyhodowane z komórek urotelialnych izolowanych z moczu pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Komórki po wstępnej selekcji umieszczane są na rusztowaniach

tkankowych, tworząc hodowle o budowie sferoidalnej, które lepiej imitują warunki panujące in vivo. Mimo wyższych kosztów prowadzenia takich hodowli, zapewniają one bardziej wiarygodne wyniki eksperymentów. Recenzent zwraca się do doktoranta z prośbą o przedstawienie dostępnych rozwiązań poprawiających wyniki badań linii dwuwymiarowych modeli in vitro dla raka pęcherza. Proszę także o pogłębiony opis koncepcji trójwymiarowej hodowli komórkowej.

Publikacja **The prognostic value of programmed cell death protein ligand 1 in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacille Calmette-Guérin immunotherapy: Current status. Arab journal of urology, 19(1), 67–70** stanowi dogłębną analizę aktualnego stanu wiedzy dotyczącej związku ekspresji PD-L1 z parametrami onkologicznymi i odpowiedzią kliniczną na immunoterapię BCG u pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka. W ramach tej analizy zidentyfikowano pięć badań, które oceniały związek między ekspresją PD-L1 a parametrami onkologicznymi oraz odpowiedzią kliniczną na terapię BCG u pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka. Wnikliwie przeprowadzona analiza doktoranta dotycząca związku pomiędzy pozytywną ekspresją PD-L1 a opornością na terapię BCG wykazywała znaczną niejednorodność zależności. Wyniki tylko dwóch z pięciu analizowanych badań wykazały związek pozytywnej ekspresji PD-L1 z opornością na leczenie BCG u pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka. W pozostałych badaniach nie stwierdzono istotnego związku między ekspresją PD-L1 a odpowiedzią na terapię BCG. W analizowanym materiale nie wykazano prognostycznego znaczenia pozytywnej ekspresji PD-L1 w kontekście parametrów przeżycia bez nawrotu (RFS) oraz całkowitego przeżycia (PFS) u pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka.

Wnioski z publikacji podkreślają heterogeniczność dostępnych danych na temat związku ekspresji PD-L1 z parametrami onkologicznymi i odpowiedzią na immunoterapię BCG w kontekście NMIBC wysokiego ryzyka. Konieczne są dalsze badania i analizy w celu lepszego zrozumienia tego związku oraz oceny potencjalnego prognostycznego znaczenia ekspresji PD-L1 dla pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka. Recenzent zwraca się z prośbą o rozwinięcie wątku braku pozytywnej korelacji ekspresji PD-L1 na przeżycie chorych oraz o rolę innych mechanizmów mogących być obszarem badań w przyszłości w zakresie szacowania przeżycia oraz odpowiedzi na BCG terapię – np. DNA mismatch repair (MMR).

W publikacji **Impact of Adjuvant Chemotherapy on Survival of Patients with Advanced Residual Disease at Radical Cystectomy following Neoadjuvant Chemotherapy: Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of clinical medicine, 10(4), 651** został przeprowadzony szczegółowy przegląd uzupełniony metaanalizą dotyczący obecnej wiedzy na temat wpływu chemioterapii adiuwantowej na wyniki onkologiczne pacjentów z zaawansowanym rakiem pęcherza moczowego po radykalnej cystektomii poprzedzonej neoadiuwantową chemioterapią u których stwierdzono obecność zaawansowanej choroby rezydualnej.

W trakcie analizy zidentyfikowano 6 badań, które dokładnie przeanalizowały wpływ chemioterapii adiuwantowej po radykalnej cystektomii poprzedzonej neoadiuwantową

chemioterapią na wyniki onkologiczne pacjentów z zaawansowaną chorobą rezydualną. W sumie w badaniach uwzględniono 3096 pacjentów, z których 2355 (76,1%) stanowiło grupę kontrolną (pacjenci poddani obserwacji po radykalnej cystektomii), podczas gdy 741 (23,9%) pacjentów otrzymało chemioterapię adiuwantową. Wszystkie badania objęte analizą miały charakter retrospektywny. Mediana okresu obserwacji wahała się od 30 do 50 miesięcy. W porównaniu z grupą kontrolną, pacjenci otrzymujący chemioterapię adiuwantową mieli istotnie statystycznie wyższy wskaźnik całkowitego przeżycia oraz przeżycia specyficznego dla choroby. Dodatkowa analiza podgrupy pacjentów z potwierdzonymi histopatologicznie przerzutami do węzłów chłonnych wykazała, że stosowanie chemioterapii adiuwantowej nie miało istotnego wpływu na całkowite przeżycie. Recenzent zwraca się z prośbą przedstawić definicję wykorzystywanej w analizie dotyczącej „choroby rezydualnej” – stopień zaawansowania T, margines chirurgiczny, liczba usuniętych węzłów chłonnych, liczba przerzutowych węzłów chłonnych. Zwracam się także z prośbą o komentarz dotyczący wpływu modyfikacji schematów chemioterapii w zależności od jej rodzaju w aspekcie przed i po cystektomii (zmiana schematu podawana jest w literaturze nawet u 2/3 chorych) i wpływu takich zmian na ostateczny wynik leczenia. Zgadzam się z badaczem, że jednym z ważniejszych wątków dotyczących wieloetapowego leczenia systemowego raka pęcherza jest toksyczność takiego postępowania w szczególności w sytuacji możliwości zastosowania leczenia adjuwantowego.

W publikacji **Assessment of the oncological outcomes of three different bacillus Calmette-Guérin strains in patients with high-grade T1 non-muscle-invasive bladder cancer. Arab journal of urology, 19(1), 78–85** e, poddano analizie skuteczność przeciwnowotworową różnych szczepów bakteryjnych BCG (Moreau, TICE i RIVM) stosowanych do immunoterapii dopęcherzowej u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego nienaciekającego błony mięśniowej o wysokim ryzyku nawrotu i progresji. W badaniu uwzględniono 590 pacjentów, z których 138 (23,4%) otrzymywało szczep Moreau, 272 (46,1%) leczono szczepem TICE, a 180 (30,5%) pacjentów otrzymało szczep RIVM. Wyniki analizy wskazują, że 5-letni wskaźnik przeżycia bez nawrotu choroby (RFS) wynosił 70,5% u pacjentów leczonych szczepem Moreau, 66,7% u pacjentów leczonych szczepem TICE, oraz 55,2% u pacjentów leczonych szczepem RIVM ($p = 0,016$). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy w RFS między szczepami Moreau i TICE. Jednak stosowanie szczepu RIVM wiązało się z istotnie wyższym prawdopodobieństwem nawrotu guza w porównaniu do dwóch pozostałych szczepów BCG. W odniesieniu do 5-letniego wskaźnika przeżycia wolnego od progresji (PFS), wynosił on odpowiednio 84%, 85% i 77,8% dla pacjentów leczonych szczepami Moreau, TICE i RIVM. Analiza nie wykazała istotnych różnic w PFS między poszczególnymi szczepami.

Dodatkowo, przeprowadzono analizę regresji proporcjonalnego zagrożenia Coxa z wykorzystaniem metody IPW (inverse probability weighting). Wyniki tej analizy nie wykazały istotnych różnic w RFS pomiędzy szczepami Moreau i TICE ($p = 0,69$). Natomiast stosowanie szczepu RIVM było związane z istotnie niższym RFS w porównaniu do szczepu Moreau (HR 1,69; 95% CI 1,03-2,78; $p = 0,034$) oraz szczepu TICE (HR 1,87; 95% CI 1,25-2,81, $p = 0,002$). W podsumowaniu autor stwierdził, że szczep RIVM może być mniej skuteczny w zapobieganiu nawrotom raka pęcherza moczowego w porównaniu do szczepów Moreau i TICE w

immunoterapii dopęcherzowej u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego NMIBC o wysokim ryzyku nawrotu i progresji. Recenzent zwraca się z prośbą o pogłębioną wypowiedź dotyczącą przyczyn różnic uzyskanych wyników – np. różnic w immunogenności poszczególnych szczepów.

Publikacja **Ubiquitin-Specific Proteases as Potential Therapeutic Targets in Bladder Cancer- In Vitro Evaluation of Degrasyn and PR-619 Activity Using Human and Canine Models. Biomedicines, 11(3), 759** to badanie oceniające ekspresję białek USP5, USP9X i USP14 w komórkach raka pęcherza u człowieka i psa oraz analizujące działanie dwóch inhibitorów USP - degrasynu (selektywnego) i PR-619 (nieselektywnego) na komórki raka. Badanie wykazało, że komórki ludzkiej linii raka pęcherza (T24) miały wyższą ekspresję białka USP5 w porównaniu z komórkami zdrowego urotelium (SV-HUC-1). Poza tym, poziom ekspresji białek USP9X i USP14 był podobny w obu typach komórek. W teście MTT zauważono, że degrasyn (selektywny inhibitor USP5, USP9X i USP14) hamował wzrost wszystkich badanych linii komórkowych w zależności od dawki i czasu inkubacji. Dla ludzkiej linii T24, degrasyn wykazywał większą aktywność antyproliferacyjną niż dla ludzkiej linii SV-HUC-1, a komórki człowieka były bardziej wrażliwe na degrasyn niż komórki psie (K9TCC-PU-NK i RDSVS-TCC1). Działanie antyproliferacyjne degrasynu było również silniejsze niż drugiego badanego inhibitora - PR-619.

Dodatkowo, degrasyn wykazywał zdolność indukcji procesu apoptozy w komórkach. Po 24 godzinach inkubacji, komórki linii T24 i RDSVS-TCC1, leczone różnymi stężeniami degrasynu, wykazywały znaczny wzrost odsetka komórek wczesno- i późnoapoptotycznych. W przeciwieństwie do degrasynu, PR-619 nie wykazywał istotnego działania proapoptotycznego. Analiza wykazała również, że degrasyn aktywował efektorową kaspazę 3/7, co sugeruje mechanizm proapoptotyczny działania. W badaniu stwierdzono także, że degrasyn powoduje zmniejszenie poziomu ekspresji białek antyapoptotycznych Bcl-xl i Bcl-2 oraz zwiększenie ekspresji fosforylowanej formy białka H2AX (γ H2AX) będącego markerem uszkodzenia DNA. Doktorant w podsumowaniu stwierdził, że degrasyn, selektywny inhibitor USP, wykazuje silne działanie przeciwnowotworowe na komórki raka pęcherza u człowieka i psa, indukując apoptozę i uszkodzenie DNA. Recenzent zwraca się zapytaniem do doktoranta jakie wg niego powinny być dalsze działania naukowe / kliniczne związane z uzyskanymi wynikami.

Każda z prac zawiera wyczerpująco przeprowadzoną dyskusję przedstawiającą wyniki współczesnych publikacji dotyczących danego zagadnienia oraz odwołania ich do własnych danych. We podsumowaniach autor określa uzyskane wyniki i wskazuje na dalsze obszary badań związanych z danym tematem.

Przedstawione w cyklu publikacji dwie prace badawcze posiadają wspólny wątek jakim jest ocena markerów w określaniu przebiegu klinicznego raka pęcherza moczowego. Prace te są starannie pod względem naukowym przeprowadzone, wyniki w sposób czytelny i zrozumiały

odzwierciedlają proces badawczy a dyskusje świadczą o pogłębionej wiedzy doktoranta. Pozostałe publikacje bezpośrednio związane są z omawianym głównym tematem pogłębiają analizę ważnych zagadnień klinicznych dotyczącym prognozowania i skuteczności leczenia raka pęcherza moczowego.

W podsumowaniu wszystkie prace przedstawione w zbiorze publikacji posiadają wspólny mianownik jakim jest nowoczesna diagnostyka i ocena ryzyka przebiegu klinicznego raka pęcherza moczowego.

Wymienione niewielkie uwagi nie zmieniają mojej pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej. Praca doktorska Pan Łukasza Nowaka jest bardzo wartościowa i stanie się najprawdopodobniej istotnym elementem ważnej dyskusji dotyczącej diagnostyki i leczenia raka pęcherza moczowego. Chciałbym serdecznie pogratulować wytrwałości i pracowitości w aspekcie pracy naukowej w nowym, dynamicznie rozwijającym się obszarze medycznym jakim jest biologia molekularna. Tym bardziej jest to cenne, iż badania naukowe był niejako dzielone w czasie z kliniczną, chirurgiczną pracą doktoranta.

Przedstawiona mi rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668) i z całym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady o nadanie wyróżnienia lek. Łukaszowi Nowakowi za przygotowaną rozprawę doktorską.

Z poważaniem

dr hab. n. med. Roman Sosnowski


dr hab. n. med. Roman Sosnowski
urolog FEBU, chirurg
ZUS 4473763