



Warszawa, dnia 11 grudnia 2023 r.

**Recenzja rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych
i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne**

Lek. Michaliny Kryszczuk

Pt. „Ocena statusu mutacyjnego genów układu NRF2-KEAP1 u chorych na operacyjnego niedrobnokomórkowego raka płuca z regionu północno-wschodniej Polski.”

Rak płuca stanowi najczęstszą przyczynę zgonów wśród mężczyzn i drugą co do częstości wśród kobiet. Jest on typowym nowotworem tytoniozależnym tzn. głównym czynnikiem predysponującym do rozwoju nowotworu jest palenie papierosów oraz wyrobów tytoniopodobnych (ponad 80% pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem płuc, było lub często nadal są nałogowymi palaczami tytoniu). Dodatkowym czynnikiem zwiększającym to ryzyko jest narażenie na azbest (obecnie czynnik mniej doceniany), a kumulacja obydwu tych czynników zwiększa ryzyko zachorowania na nowotwór płuc nawet 40-to krotnie. Jednymi z istotnymi czynnikami mutagennymi są wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (np. benzopiren), który znajduje się w dymie papierosowym. W organizmie przekształca się w epoksyd diolu benzopirenu, który jest uważany za związek wysoce mutageny predysponujący do zachorowania na raki płuc.

Na podstawie klasyfikacji histologicznej wyróżnia się następujące rodzaje raka płuca: drobnokomórkowego raka płuca (SCLC) oraz raka niedrobnokomórkowego (NSCLC). Z kolei wśród NSCLC wyróżniamy raka płaskonabłonkowego oraz niepłaskonabłonkowego do którego zaliczamy raka wielkokomórkowego, gruczołowego, bez specjalnego typu. Przeżycia 5-cio letnie we wczesnym stadium klinicznego zaawansowania (I stopień zaawansowania klinicznego) rokuje pięcioletnim przeżyciem na poziomie 70%. Niestety u większości chorych nowotwór ten jest wykrywany w zaawansowanym stadium (IIIb i IV) i jedynie niespełna 1% chorych ma szansę na przeżycia 5-letnie.

Rozwój raka płuca następuje na podłożu molekularnym, wśród których wyróżnia się nagromadzenie w komórce zmian genetycznych i epigenetycznych, zwykle wyróżnia się inaktywację genów supresorowych oraz aktywację onkogenów. W wyniku utraty przez prawidłową komórkę wrażliwości na zewnętrzne sygnały, kontrolujące podziały oraz wzrost



komórkowy dochodzi do transformacji nowotworowej komórki, która jest uznawana za początkowy etap rozwoju nowotworu. Na dalszych etapach rozwoju nowotworu, w transformowanych komórkach dochodzi do dalszego nagromadzenia zmian genetycznych i epigenetycznych, prowadzących ostatecznie do głębokich zmian w fizjologii oraz morfologii. Efektem tego jest między innymi nabycie zdolności do tworzenia inwazyjnej formy nowotworu i zdolności przerzutowania odległego.

Jednym z ważnych komórkowych układów antystresowych, który odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy komórkowej jest białko NRF2. Jest ono odpowiedzialne za unieszkodliwienie różnorodnych czynników oksydacyjnych, które powstają w komórce zarówno podczas prawidłowego funkcjonowania, jak i również w warunkach stresowych. Jest ono kluczowe dla aktywacji rozbudowanego układu antyoksydacyjnego, w skład którego wchodzi wiele enzymów i innych substancji o aktywności przeciwutleniającej. Dotychczasowe badania sugerują, że oporność komórek nowotworowych na stres oksydacyjny może być związana z nadmierną aktywacją białka NRF2. Białko to jest czynnikiem transkrypcyjnym („Cap'n'Collar”), który jest kodowany przez gen NFE2L2. Białka z tej rodziny mają zdolność do przemieszczania się z i do jądra komórkowego, dimeryzacji oraz przyłączania się do jądrowego DNA. Istotny wpływ na aktywność NRF2 mają również postranslacyjne modyfikacje białka związane głównie z fosforylacją. Inna aktywność NRF2 w komórce jest regulowana za pośrednictwem mechanizmów epigenetycznych, które obejmują metylację promotora genu, modyfikacje histonów chromatyny w obrębie genu oraz działanie mikroRNA na transkrypty (miRNAs). NRF2 jako czynnik transkrypcyjny również może wpływać na transkrypcję miRNA, które z kolei wpływa na jego ekspresję. Wśród genów docelowych czynnika transkrypcyjnego NRF2 znajduje się m.in. gen płytkowego czynnika wzrostu A (PDGFA), który prowadzi do aktywacji ekspresji PDGFA w warunkach stabilizacji i gromadzenia się NRF2. Zwiększona ilość czynnika wzrostu powoduje aktywację dwóch ścieżek sygnałowych, kontrolowanych przez kinazy PI3K/Akt oraz Akt/p21, czego efektem jest zwiększenie proliferacji oraz zdolności do przetrwania komórek nowotworowych. Na podstawie aktualnej wiedzy udowodnione zostało, że w komórkach nowotworowych nadmierna aktywność białka NRF2 nie tylko zwiększa zdolność komórek do przeżycia w warunkach stresu komórkowego, ale również czyni je opornymi na wiele rodzajów stosowanej terapii przeciwnowotworowej. W warunkach fizjologicznych NRF 2 bierze udział w wielu procesach w tym jest odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy komórkowej. Ponadto uczestniczy w metabolizmie komórkowym, odpowiedzi zapalnej organizmu jak również utrzymaniu stresu oksydacyjnego na poziomie, niezagrażającym komórce. Bierze ono także udział w regulacji metabolizmu komórkowego, w metabolizmie ksenobiotyków, reakcjach zapalnych, regulacji redoks w komórce oraz w proliferacji i różnicowaniu komórkowym. W warunkach nieprawidłowych rola NRF2 jest związana funkcją ochronną, zmniejszając toksyczność leków podawanych pacjentowi w wielu tkankach m.in. w nerkach, wątrobie, skórze, płucach, wątrobie oraz w całym układzie pokarmowym. W nowotworach rola białka NRF2 w nowotworach postrzegana jest w dwojaki sposób. Z jednej strony aktywność białka chroni



organizm przed rozwojem i progresją nowotworu, ale z drugiej, może spowodować szybszy rozrost tkanki nowotworowej oraz jej oporność na onkologiczne metody leczenia, takie jak radio- i chemioterapia.

Inną, ważną przyczyną aktywacji NRF2 w nowotworach (m.in. w raku niedrobnokomórkowym płuc) są swoiste mutacje w genie kodującym białko KEAP1, które z kolei jest negatywnym regulatorem NRF2. Mutacje te zaburzają oddziaływanie KEAP1 z NRF2 i w efekcie prowadzą do stabilizacji czynnika transkrypcyjnego i jego nieprawidłowej aktywności.

Cel pracy

Lek. Michalina Kryszczuk określiła precyzyjnie cel główny swojej pracy, którym było:

1. Oszacowanie częstości występowania znanych mutacji aktywujących NRF2 i inaktywujących KEAP1 wśród operacyjnych pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca z regionu północno-wschodniej Polski.

Dane formalne

Pod względem formalnym rozprawa doktorska liczy 65 stron oraz zawiera 191 pozycji piśmiennictwa, które dobrane jest w sposób prawidłowy oraz została podzielona na typowe dla dysertacji rozdziały: wstęp, cel i założenia pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, suplement, piśmiennictwo wykaz tabel i rycin.

W tym miejscu chciałbym podkreślić znaczenie kliniczne przeprowadzonych badań naukowych, co nadaje im praktycznego znaczenia.

Materiał i metody

Analizie retrospektywnej poddano 88 guzów rozpoznanych jako niedrobnokomórkowy rak płuca (rak gruczołowy, wielkokomórkowy oraz płaskonabłonkowy) w stadium zaawansowania I – IIIa pobranych w czasie radykalnej resekcji guza w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Następnie fragmenty tkanek przeznaczone do badania molekularnego, zostały zamrożone w ciekłym azocie, a następnie przechowywane w temperaturze -80°C . Przed rozpoczęciem badania, tkanki przebadano przez doświadczonego histopatologa w celu potwierdzenia odpowiedniego utkania nowotworowego i wyselekcjonowania tylko te tkanki, które zawierały co najmniej



50% komórek transformowanych. Schemat postępowania z próbkami tkanki guza niedrobnokomórowego obejmował: izolację DNA z tkanki guza, ocenę stężenia oraz jakości uzyskanego izolatu, namnożenie egzonu 2 *NFE2L2* oraz 6 egzonów *KEAP1*, detekcję otrzymanych produktów, oczyszczenie produktów PCR, reakcję sekwencjonowania, oczyszczenie produktów sekwencjonowania, sekwencjonowanie próbek metodą Sangera oraz analizę wyników sekwencjonowania.

Charakterystyka chorych

W grupie chorych przeważali mężczyźni - 72 osoby w wieku od 46 lat do 81 lat ze średnim wiekiem mężczyzn 63 lata, natomiast wśród kobiet zakres wieku mieścił się od 48 lat do 78 lat ze średnim wiekiem 65 lat. Wg skali TNM 27% badanych stanowili chorzy ze stopniem zaawansowania 1, u 41% badanych stwierdzono stopień zaawansowania 2, natomiast stopień 3 - u 32% badanych. U kobiet wykryto jedynie guzy dobrze zróżnicowane (G1, G2), z kolei u mężczyzn dominowały guzy nisko zróżnicowane (G3). 8 na 88 przebadanych pacjentów zadeklarowało niepalenie tytoniu.

Wyniki

W oparciu o dostępne w piśmiennictwie światowym dane dotyczących znanych, aktywiających mutacji *NRF2* w komórkach nowotworowych, sekwencjonowaniu poddany został ekson 2 *NFE2L2* oraz wszystkie 5 eksonów genu *KEAP1*. Poszukiwano zarówno substytucje pojedynczego nukleotydu jak i również delecje oraz insercje zmieniających ramkę odczytu transkryptów genów. Wykryte zmiany sekwencyjne były porównywane z sekwencją referencyjną określonego genu w bazie NCBI oraz sprawdzane pod względem ich wpływu na fenotyp. Po wykonaniu wszystkich analiz wykryto 9 wariantów genetycznych o potwierdzonej patogenności i udziale w procesie nowotworzenia: dwa wykryto w genie *NRF2*, natomiast pozostałe siedem – w genie *KEAP1*. Zdecydowaną większość wariantów obejmowały substytucje pojedynczego nukleotydu, jedynie w jednym z guzów wykryto przesuwającą ramkę odczytu delecję nukleotydu. Osiem z dziewięciu wykrytych mutacji w bazie COSMIC zostały oznaczone jako zmiany z wysokim współczynnikiem patogenności na poziomie >95% lub >99%, w jednym z wykrytych wariantów ostatecznie nie potwierdzono jej patogenności. W genie *KEAP1* 5 z 7 patogennych wariantów sekwencji typu substytucji nukleotydów wykryto w eksonie 2, a jedną substytucję - w eksonie 5; z kolei delecję, wykryto w eksonie trzecim.



Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wyciągnęła wnioski, które były zgodne, z założonym celem:

1. Wykryto 9 przypadków mutacji patologicznych w genach *NFE2L2* i *KEAP1* w 88 rakach niedrobnokomórkowych płuca, poddanych radykalnej resekcji guza.
2. Częstość występowania mutacji w genie *NFE2L2* w badanej grupie wyniosła 2,3%, a w genie *KEAP1* - 8%.
3. Wśród wykrytych mutacji dominowały substytucje typu zmiany sensu (8 z 9). Wykryto również 1 przypadek delecji 1 nukleotydu, przesuwejacej ramkę odczytu transkryptu.
4. Wysoki stopień patogenności wariantu sekwencji potwierdzono dla 8 z 9 wykrytych mutacji, natomiast dla 1 z wariantów patogenność nie została ostatecznie udowodniona.
5. Patogenne warianty sekwencyjne wykryto w trzech z 5 przebadanych eksonów genu *KEAP1*, lecz większość z nich wykryto w eksonie 2.

Podsumowanie

Temat, który podjęła Doktorantka jest ważny z uwagi na być może w niedalekiej przyszłości standardowe wykrywanie przypadków mutacji patologicznych w genach *NFE2L2* i *KEAP1* w związku z dostępnością i znacznym zmniejszeniem kosztów technik nowoczesnego NGS, co być może przełoży się również na leczenie ukierunkowane molekularnie. Warto jednak, aby w tych samych guzach ocenić jakość i ilość innych uznanych klinicznie zaburzeń molekularnych takich jak mutacje aktywujące, insercje genu *EGFR*, rearanżacje genów *ALK* czy *ROS1*. Moglibyśmy mieć odpowiedź, czy te zaburzenia molekularne mogą ze sobą współistnieć oraz czy mają kliniczne znaczenie.

Praca jest ciekawa, przejrzysta, dobrze zaplanowana i czyta się ją z przyjemnością i lekkością, a dodatkowe ryciny, wykresy niewątpliwie podnoszą jej atrakcyjność. Doktorantka w swojej pracy wykazała się dobrym warształem naukowym, umiejętnością prospektywnego i logicznego myślenia, które świadczą o znajomości zasad planowania i przeprowadzania badań naukowych.

Nie ma także wątpliwości odnośnie znaczącego wkładu w pracę badawczą Doktorantki, który niewątpliwie był znaczący i samodzielny, chociaż oczywiście pod „czujnym okiem” Promotora.



W dyskusji, lek. Michalina Kryszczuk oceniła i porównała swoje wyniki z danymi literaturowymi w sposób prawidłowy, z krytycznym spojrzeniem na własne wyniki. W podsumowaniu i dyskusji Doktorantka powinna jednak zawrzeć ograniczenia tej pracy wynikające z jednośrodkowej rekrutacji chorych, małej grupy pacjentów, jej retrospektywnego charakteru oraz heterogenności badanej grupy.

Chciałbym także zaznaczyć, że oceniana przeze mnie praca może mieć swoje istotne implikacje kliniczne, jednak wymaga to potwierdzenia w badaniach bez ograniczeń o których wspomniałem powyżej. Dlatego wnioskiem płynącym z tej pracy jest konieczność dalszych badań w tym kierunku.

Po szczegółowym zapoznaniu się całością pracy jednoznacznie stwierdzam, że nie mam uwag obniżających jej poziom.

Jednak z obowiązku recenzenta znalazłem następujące drobne uchybienia – literówki, których praktycznie nie można uniknąć w tak obszernej dysertacji:

1. błędy literówki i stylistyczne wymagające drobnej korekty:

- str. 1: „u chorych na operacyjnego niedrobnokomórkowego raka płuca” – powinno być: „u chorych na resekcyjnego niedrobnokomórkowego raka płuca”; operacyjny jest pacjent np. z powodu stanu ogólnego, a resekcyjna jest zmiana ze względu np. na warunki techniczne;

- str. 5: „Jednocześnie szacuję się, że w Polsce, co roku, choroba nowotworowa jest diagnozowana u około 85 tysięcy ludzi” – obecnie mamy ponad 171 000 zachorowań, błędna statystyka, około 80 tysięcy zachorowań mieliśmy pod koniec lat 80-tych ubiegłego wieku;

- str. 5: „Histologicznie wyróżniają się następujące rodzaje raka płuca: guzki płucne, międzybłoniak,”. – ani guzki płucne nie są rakiem, ani międzybłoniak, rak to nowotwór wywodzący się z nabłonka;

- str. 25: „oszacowanie częstości występowania znanych mutacji aktywujących NRF2 i inaktywujących KEAP1 wśród operacyjnych pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca z regionu północno-wschodniej Polski”; - powinno być: „oszacowanie częstości występowania znanych mutacji aktywujących NRF2 i inaktywujących KEAP1 wśród operacyjnych pacjentów chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca z regionu północno-wschodniej Polski”;

- str. 36: „Osiem z dziewięciu wykrytych mutacje...” – powinno być: „Osiem z dziewięciu wykrytych mutacji...”;



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Klinika Onkologii

- str. 37: „W genie KEAP1 5 z 7 patogennych wariantów sekwencji typu substytucji nukleotydów wykryto w eksonie 2, a 1 substytucja - w eksonie 5.” – powinno być: W genie KEAP1 5 z 7 patogennych wariantów sekwencji typu substytucji nukleotydów wykryto w eksonie 2, a 1. substytucję - w eksonie 5.;

Pomijając moje uwagi, przedstawiona do oceny rozprawa spełnia ustawowe wymogi na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Należy podkreślić, że badanie zostało zaplanowane, wykonane i opisane na dobrym poziomie naukowym i niewątpliwie stanowi próbę rozwiązania oryginalnego zagadnienia naukowego dotyczącego oszacowanie częstości występowania znanych mutacji aktywujących *NRF2* i inaktywujących *KEAP1* wśród operacyjnych pacjentów chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc z regionu północno-wschodniej Polski.

W związku z powyższym z przyjemnością wnioskuję do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Michałiny Kryszczuk do dalszych etapów procedury przewodu doktorskiego.

Prof. zw. dr hab. n. med. Rafał Stec

