

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej p. mgr Anny Janeckiej-Widła

Tytuł rozprawy: „*Wpływ infekcji HPV16 na funkcjonowanie szlaku EGFR/P13K/AKT/mTOR i rokowanie u chorych na płaskonabłonkowe nowotwory terenu głowy i szyi*”.

Promotor: dr. hab. n. med. Beata Biesaga, prof. NIO-PIB

Promotor pomocniczy: dr n.med. Anna Mucha-Małecka

W roku 2008 prof. Harald zur Hausen otrzymał nagrodę Nobla za poznanie roli wirusów brodawczaka ludzkiego (HPV) w powstawaniu raka szyjki macicy. Teraz już wiemy, że zakażenia HPV odpowiadają za ponad 5 % wszystkich nowotworów w tym oprócz raka szyjki macicy, także raka sromu, penisa, czy głowy i szyi np. w jamie ustnej i gardle środkowym. Wśród wielu typów HPV do grupy wysokiego ryzyka zalicza się HPV16 i 18, a mechanizmy wiodące do powstania nowotworu są dalej nie do końca poznane i szeroko badane. Wyjaśnienie tych mechanizmów wiąże się nie tylko z profilaktyką, jak to ma miejsce w przypadku między innymi szczepionki przeciw rakowi szyjki macicy, ale także ze skutecznym leczeniem przeciwnowotworowym. W nurt tych prac wpisuje się przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, której autorką jest p. mgr Anna Janecka-Widła.

Praca ta składa się z cyklu 3 publikacji o łącznym IF – 8,925, w których Doktorantka jest pierwszą autorką i opisu tych publikacji liczącego 37 stron. Na wstępie opisu publikacji autorka zamieściła wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Kolejnymi rozdziałami rozprawy doktorskiej są: wstęp, cele pracy, materiał i metody. Zamiast klasycznej dyskusji praca zawiera: omówienie wyników, kliniczne znaczenie przeprowadzonych badań, główne osiągnięcia i wnioski i kolejno: piśmiennictwo i spis załączników. Załącznikami są 3 publikacje wchodzące w skład rozprawy oraz oświadczenia współautorów prac o ich udziale w powstawaniu niniejszych prac.

Celem przedstawionych w pracy badań było głównie porównanie ekspresji wybranych białek szlaku EGFR/P13K/AKT/mTOR oraz białek regulujących ten szlak (EGFR, AKT, pAKT(Ser473), pAKT(Thr308), mTOR, PTEN, pPTEN, APOBEC3B) u pacjentów chorych na płaskonabłonkowe raki jamy ustnej i krtani z aktywną infekcją HPV16 czyli pacjentów HPV16 pozytywnych oraz pacjentów HPV negatywnych. W tych grupach pacjentów badano również częstość występowania mutacji *PIK3CA*.

I tutaj mam pytanie: czy nie zbyt odważnie Autorka w swojej pracy używa określenia „aktywna infekcja HPV”? Czy jednak nie ostrożniej byłoby używać formy „nowotwory zależne od HPV” czy „HPV pozytywne”. W pracy wykrywano wyłącznie obecność wirusa bardzo czułą metodą nested PCR oraz potwierdzano metodą PCR w czasie rzeczywistym, którą wykorzystywano do genotypowania HPV. Nie badano ekspresji genów wirusa co świadczyłoby, o aktywnej formie wirusa. Natomiast aktywność wirusa badano pośrednio poprzez wykrywanie komórkowego

białka p16 metodą immunohistochemiczną (podobnie jak badanie ekspresji innych białek) w oparciu o dane literaturowe, w szczególności pracy S. J. Smeets'a i innych z 2007. W pracach tych autorzy wskazują na wzrost ekspresji tego białka pod wpływem infekcji HPV. Białko p16 bierze udział w procesie kontroli prawidłowego cyklu komórkowego. W całkowicie dojrzałych komórkach poziom p16 jest prawie niewykrywalny. Natomiast w komórkach nowotworowych, gdzie często onkogenne wirusy HPV inicjują niekorzystne zmiany, poziom p16 jest znacznie podwyższony. Według Autorki jednoczesne wykrywanie obecności genomu wirusa oraz nadekspresji białka p16 świadczy o aktywnej infekcji wirusa zgodnie z panującym trendami światowymi. Niewątpliwie zgadzam się z tym, że jednoczesne zastosowanie tych dwóch metod badawczych dokładniej określa status wirusa i jego ewentualną rolę w inicjowaniu procesu nowotworowego. Czy były prowadzone jakieś badania na poziomie molekularnym jakie są mechanizmy tego procesu i czy znane są jakieś białka wirusowe które mają wpływ na ekspresję białka p16? Moje pytanie o aktywną infekcję HPV nie jest bynajmniej zarzutem o błędnym wykorzystaniu metod badawczych, a wręcz o zwrócenie uwagi, jaka w dalszym ciągu, trudna jest jednoznaczna diagnostyka nowotworów zależnych od HPV, a w dalszej konsekwencji, w połączeniu z innymi czynnikami prognostycznymi i predykcyjnymi, może to mieć wpływ na decyzje terapeutyczne i odmienne schematy leczenia chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, gardła bądź krtani w zależności od statusu HPV.

Do badań prezentowanych w niniejszej pracy zakwalifikowano 155 chorych na nowotwory płaskonabłonkowe głowy i szyi z terenu Małopolski. Chorzy Ci nie byli uprzednio leczeni przeciwnowotworowo i z analizy wyłączono również osoby, u których w chwili diagnozy stwierdzono występowanie przerzutów odległych. Dla wszystkich uczestników badania zebrano dokładne dane dotyczące poziomu palenia papierosów, spożywania alkoholu, dane populacyjne jak wiek, płeć, fizyczna sprawność w skali Karnofsky'ego, dane kliniczne (lokalizacja nowotworu, stopień zaawansowania klinicznego, obecność przerzutów do węzłów chłonnych, zastosowane leczenie) i histopatologiczne (stopień złośliwości histopatologicznej, stopień keratynizacji).

W badanej grupie chorych odsetek chorych z nowotworami w obrębie głowy i szyi (HNSCC) zależnych od HPV (DNA+/p16+) wyniósł 20,65% i były to głównie nowotwory w obrębie gardła środkowego. Zgodnie z danymi literaturowymi najczęściej identyfikowanym typem wirusa był HPV16. Ale wykryto również po raz pierwszy w Polsce HPV35, a także podwójne infekcje HPV16 i 35 oraz HPV18 i 35. I te dane pochodzą z pierwszej prezentowanej w pracy publikacji natomiast w dwóch kolejnych publikacjach przedstawiono dane dotyczące ekspresji białek szlaku EGFR/P13K/AKT/mTOR oraz białek regulujących ten szlak (EGFR, AKT, pAKT(Ser473), pAKT(Thr308), mTOR, PTEN, pPTEN, APOBEC3B) u pacjentów chorych na płaskonabłonkowego raka głowy i szyi HPV16 pozytywnych oraz pacjentów HPV negatywnych. Badano również częstość występowania mutacji *PIK3CA*.

Prace te miały na celu poszukiwanie specyficznych biomarkerów predykcyjnych i prognostycznych, które pomogłyby w szukaniu nowych celów terapeutycznych (np. w celu obniżenia toksyczności leczenia przy jednoczesnym zachowaniu efektu terapeutycznego) u chorych na HNSCC. Do czynników które indukują HNSCC zalicza się głównie: dym papierosowy, alkohol i aktywną infekcję HPV, a dane literaturowe pokazują, że chorzy na HNSCC zależne od HPV, mają lepsze prognozy niż ci u których nie wykryto wirusowej infekcji. Dlatego tak ważne jest poszukiwanie tych specyficznych biomarkerów. Podczas

aktywnej infekcji HPV w kancerogenezie nowotworów zależnych od HPV dochodzi do ekspresji onkogennych białek E6, E7, które oddziałują z komórkowymi białkami supresorowymi p53 i pRb, ale także białka wirusowe mogą wpływać na białka szlaków sygnałowych w komórce np. badanego w pracy szlaku EGFR/P13K/AKT/mTOR, a to w istotny sposób może przyczyniać się do powstania nowotworu. We wstępie do przedstawionej mi do recenzji pracy Autorka bardzo dobrze i dokładnie opisuje mechanizmy działania tego szlaku w komórce, zwracając uwagę, że stosunkowo mało prac przedstawia dane dotyczące ekspresji białek tego szlaku u pacjentów z HNSCC w zależności od statusu HPV. I niewątpliwie uważam, że jest to bardzo pozytywny aspekt tej pracy i bardzo duży wkład naukowy w uzupełnienie tej luki. Wyniki sugerują bowiem, występowanie istotnych różnic w funkcjonowaniu szlaku EGFR/P13K/AKT/mTOR u pacjentów zakażonych HPV16 i pacjentów bez wirusowej infekcji co z kolei może wpływać na przeżycie chorych w tych dwóch grupach. Wnioski te oparto o między innymi następujące wyniki analiz eksperymentów, które mogą mieć także duże znaczenie kliniczne:

1. W badanej grupie pacjentów z Małopolski chorych na nowotwory głowy i szyi wykryto stosunkowo duży odsetek (20,65%) nowotworów zależnych od HPV – głównie HPV16. Nowotwory te głównie zlokalizowane były w obrębie gardła środkowego. Do oceny aktywnej infekcji zastosowano jednoczesne wykrywanie DNA wirusa (metodą nested PCR i PCR w czasie rzeczywistym) oraz wykrywanie ekspresji białka p16. Ponieważ zaobserwowano, że obecność HPV była związana z większym odsetkiem przeżyć chorych (o lepszym rokowaniu) Autorka uważa, że te badania powinny być stosowane w diagnostyce HNSCC i w konsekwencji w podjęciu odpowiedniego leczenia, mniej agresywnego niż w przypadku innych nowotworów. Pacjenci u których wykrywano inne niż HPV16 typy wirusa przeżywali 5 lat bez objawów choroby nowotworowej.

2. W guzach HPV16 pozytywnych zaobserwowano stosunkowo wysoką ekspresję całkowitego AKT – kinazy białkowej (67,86%) w porównaniu z innymi guzami (55,43%) i obniżony poziom pAKT(Ser473) (64,29%) – inne guzy aż 79,83%. Przy wprowadzeniu do praktyki klinicznej tych badań można by w grupie osób z nadekspresją pAKT(Ser473) próbować stosować u chorych inhibitory AKT, tym bardziej, że niektóre doniesienia naukowe wskazują na udział tego białka w indukowaniu oporności na leczenie onkologiczne.

3. Zdecydowanie większość guzów z infekcją HPV charakteryzowała się małą ekspresją EGFR (receptora naskórkowego czynnika wzrostu) aż 89,29% guzów, a w przypadku pozostałych guzów tylko 58,82%

4. Ogólnie analiza przeżyć, zarówno całkowitych (OS) jak i przeżyć bezobjawowych (DFS) wykazała, że spośród badanych białek pozytywny potencjał rokowniczy miały: brak nadekspresji pAKT(Ser473), pAKT(Thr308) i EGFR, a więc podobnie jak w przypadku guzów HPV pozytywnych. Ponadto zaobserwowano, że dłuższy czas przeżyć bezobjawowych (DFS) charakteryzował chorych z brakiem nadekspresji APOBEC3B (podjednostki katalitycznej 3B enzymu edytującego mRNA apoliproteiny B) .

5. Obecność mutacji genu *PIK3CA* obserwowana była rzadko, a więc najprawdopodobniej geny te nie mają wpływu na funkcjonowanie badanego w pracy szlaku

EGFR/P13K/AKT/mTOR, ale dane te wymagają jeszcze dodatkowych badań, które opisane są dokładniej w trzeciej przedstawionej w rozprawie pracy oryginalnej.

W rozdziale pracy: „Kliniczne znaczenie przeprowadzonych badań”, Autorka wyciąga wnioski z tych bardzo rozległych i pracochłonnych badań laboratoryjnych oraz żmudnych analiz i obliczeń statystycznych. Zwraca uwagę dodatkowo na różne trudności związane z metodyką samych badań. Uważa, że przedstawione wyniki dowodzą, że ocena statusu HPV (metodami, które najlepiej odzwierciedlą, że to właśnie wirus jest inicjatorem rozwoju nowotworu) oraz badanie ekspresji takich biomarkerów jak EGFR, AKT i pAKT mogą mieć wartość prognostyczną (i/lub ewentualnie predykcyjną) dla pacjentów z HNSCC i powinny być wprowadzone do praktyki klinicznej. Zdaje sobie jednak sprawę, że zanim to nastąpi jej badania wymagają potwierdzenia w badaniach przedklinicznych i klinicznych na odpowiedniej dużej liczbie chorych. Uważam, że wyniki badań Autorki przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej mogą stać się także podstawą do badań nad mechanizmami wiodącymi do rozwoju nowotworu, szczególnie związanymi z nowotworami głowy i szyi.

Reasumując uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska zasługuje na bardzo wysoką ocenę, a 3 prace, które wchodzi w skład rozprawy już wcześniej zostały ocenione pozytywnie przez recenzentów czasopism, w których zostały opublikowane. Zawsze bardzo wysoko oceniam prace, które łączą metody podstawowe z praktyką kliniczną. Doktorantka wykonała, z zastosowaniem dobrze dobranych metod badawczych, i opisała rzetelnie i dojrzałe wszystkie etapy bardzo pracochłonnych eksperymentów i wyciągnęła cenne wnioski. Praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom na stopień doktora. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie mgr Anny Janeckiej-Widła do dalszych etapów przewodu doktorskiego, jednocześnie, ze względu na walory poznawcze i aspekt praktyczny, uważam, że praca zasługuje na wyróżnienie.



Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kosz-Vnenchak