AUTOREFERAT

dr n. med. Tomasz Waśniewski

Olsztyn, 2019

1. Imię i Nazwisko: **Tomasz Waśniewski**

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe** – z podaniem nazwy miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

   - Dyplom ukończenia studiów wyższych: **Akademia Medyczna w Gdańsku**, Wydział Lekarski, 24 czerwca 1994 roku

   - 1998 – I-szy stopień specjalizacji z położnictwa i chorób kobiecych

   - 2001 – II-gi stopień specjalizacji z położnictwa i chorób kobiecych

   - 2011 – specjalizacja z ginekologii onkologicznej

   - **dyplom doktora nauk medycznych**: rozprawa doktorska *„Retrospektywna ocena wybranych czynników prognostycznych u chorych leczonych z powodu raka błony śluzowej trzonu macicy"*, uchwała Rady Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Gdańsku z 17 maja 2007 roku, stopień doktora nauk medycznych w zakresie medycyny, promotor: prof. dr hab. med. Janusz Emerich

   - 2000 – 2004 **Studia Doktoranckie na Wydziale Nauk Ekonomicznych** Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie

   - dyplom **Państwowej Szkoły Muzycznej** Pierwszego (1982) i Drugiego (1987) Stopnia w Olsztynie w klasie kontrabasu

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**:

   - **Wojewódzki Szpital Specjalistyczny w Olsztynie** – Oddział Kliniczny Ginekologiczno-Położniczy i Ginekologii Onkologicznej:

     1994-1995 – stażysta

     1995-1998 – młodszy asystent

     1998-2001 – asystent

     2001–2015 – starszy asystent

     od kwietnia 2015 do chwili obecnej – ordynator Oddziału

   - 2007 – 2012 - adiunkt w Katedrze Podstawowych Nauk Medycznych **Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie**

   - 2012 – 2013 - adiunkt w Katedrze Ginekologii i Położnictwa Wydziału Nauk Medycznych **Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**

   - od 2013 roku do chwili obecnej - zastępca Kierownika Kliniki w Katedrze Położnictwa, Perinatologii i Ginekologii Wydziału Lekarskiego (następnie od 2017 Collegium

Medicum) **Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**

- 2009-2015 - **Przewodniczący Warmińsko-Mazurskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego**, członek Zarządu Głównego PTG

- od 2015 roku do chwili obecnej - **Konsultant Wojewódzki** w dziedzinie ginekologii onkologicznej dla woj. warmińsko – mazurskiego

4. **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:

Nowe biomarkery molekularne patologicznych zmian błony śluzowej trzonu macicy

b) Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem 3 prac oryginalnych oraz 1 pracy przeglądowej

Sumaryczny IF = 8,621

Sumaryczny MNiSzW$_{2016}$ = 80

Sumaryczny MNiSW$_{2013-2016}$ = 95

I. Wasniewski T, Woclawek-Potocka I. *Altered expression of lysophosphatidic acid receptors, in association with the synthesis of estrogens and androgens in type 1 endometrial cancer biology.* ***Gynecol Endocrinol.*** 2018 May; 34(5):422-427.

DOI: 10.1080/09513590.2017.1409707
Impact Factor ISI: **1.453**
Mój wkład procentowy w pracę szacuję na 90%.

II. Wasniewski T, Woclawek-Potocka I, Boruszewska D, Kowalczyk-Zieba I, Sinderewicz E, Grycmacher K. *The significance of the altered expression of lysophosphatidic acid receptors, autotaxin and phospholipase A2 as the potential biomarkers in type 1 endometrial cancer biology.* ***Oncol Rep.*** 2015 Nov;34(5):2760-7.

DOI: 10.3892/or.2015.4216
Impact Factor ISI: **2.486**

Mój wkład procentowy w pracę szacuję na 70%.

III. Kowalczyk-Zięba Ii, Wocławek-Potocka I, Waśniewski T, Boruszewska D, Grycmacher K, Sinderewicz E, Staszkiewicz J, Wołczyński S *LPAR2 and LPAR4 are the Main Receptors Responsible for LPA Actions in Ovarian Endometriotic Cysts.* **Reproductive Sciences** 2019, 26 (1), s. 139-150.

DOI: 10.1177/1933719118766263
Impact Factor ISI: **2.548**

Mój udział procentowy w pracę szacuję na 35 %.

IV. Kiewisz J, Wasniewski T, Kmiec Z. *Participation of WNT and β-Catenin in Physiological and Pathological Endometrial Changes: Association with Angiogenesis.* **Biomed Res Int.** 2015;2015:854056

DOI: 10.1155/2015/854056
Impact Factor ISI: 2.134
Mój wkład procentowy w pracę szacuję na 40% (pierwsze współautorstwo – 40%/40%/20%).

c) **Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Rak błony śluzowej trzonu macicy jest obecnie jednym z najczęściej spotykanych nowotworów złośliwych wśród kobiet na świecie. Według danych epidemiologicznych Krajowego Rejestru Nowotworów plasuje się w ścisłej czołówce pod względem zachorowalności, wśród kobiet w Polsce. Większość nowotworów błony śluzowej macicy jest rozpoznawana we wczesnej fazie, często po charakterystycznych objawach, takich jak nieregularne miesiączki czy nieprawidłowe krwawienia z dróg rodnych. Do czynników prognostycznych zalicza się wiek pacjentki, stopień klinicznego zaawansowania, typ i stopień zróżnicowania histologicznego, wielkość zmiany nowotworowej oraz głębokość naciekania mięśnia macicy (Wright i in. 2012). Rak błony śluzowej trzonu macicy charakteryzuje się złożoną epidemiologią. Do najważniejszych czynników ryzyka zachorowania zalicza się

przedłużoną ekspozycję na estrogeny niezrównoważoną działaniem progesteronu, oraz otyłość i nadwagę (Schouten i in. 2004). Najczęstszym źródłem egzogennego estradiolu jest estrogenowa terapia zastępcza oraz stosowanie tamoksyfenu (Fisher i in. 1998). Hiperestrogenizm może być również wywołany endogennymi czynnikami tj. otyłością, nadwagą, marskością wątroby, występowaniem guzów produkujących estrogeny, oraz zaburzeniami cyklu menstruacyjnego m.in. brakiem owulacji (Brinton i in. 1992, Creasman i in. 2006). Także niektóre zaburzenia genetyczne (np. Zespół Lyncha) mogą zwiększać ryzyko zachorowania, zwłaszcza bardziej agresywnych typów histologicznych nowotworów w obrębie błony śluzowej trzonu macicy. Wyróżnia się dwa główne typy raka błony śluzowej trzonu macicy (Bokhman 1983): Typ I – endometrioidalny, występujący częściej, charakteryzuje się rozwojem na podłożu atypowej hiperplazji błony śluzowej, jest zależny od nieprawidłowej stymulacji estrogenowej; Typ II – nieendometrioidalny, rzadziej występujący, zazwyczaj związany z rozwojem w obrębie atroficznej błony śluzowej, bez stymulacji hormonalnej, wykazujący wyższe stopnie zaawansowania i gorsze rokowanie.

W 2017 roku zaproponowano nowy podział raków błony śluzowej trzonu macicy opracowany w oparciu o wyniki uzyskane metodami biologii molekularnej, uwzględniający mutacje w zakresie genu POLE, niestabilność mikrosatelitarną, oraz mutacje w zakresie genu p53. Niniejsza praca habilitacyjna dotyczyła poszukiwania nowych, molekularnych, potencjalnych markerów I-go endometrioidalnego typu raka błony śluzowej trzonu macicy, oraz innych patologicznych zmian w endometrium, np. w torbielach endometrialnych jajników.

Na podstawie dostępnej literatury i wstępnych prac własnych, do badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, wytypowano kwas lizofosfatydowy (LPA), jako potencjalny marker molekularny, charakteryzujący się możliwością autoparakrynnego działania w etiopatogenezie badanego schorzenia. Kwas lizofosfatydowy (LPA) jest prostym, naturalnie występującym fosfolipidem, uczestniczącym w wielu procesach, zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych, w organizmie, takich jak: proliferacji i różnicowaniu komórek (Pustilnik i in.1999), przekazywaniu sygnałów między komórkami (Fukushima i in. 2002) czy nowotworzeniu (Kim i in. 2006). U ssaków, LPA oddziałuje poprzez swoiste receptory związane z białkami G: LPAR1/EDG2, LPAR2/EDG4, LPAR3/EDG7, LPAR4/P2Y9 oraz LPAR5/GPR92 (Im i in. 2000, Noguchi i in. 2003).

Większość przeprowadzonych dotychczas badań dotyczyła udziału LPA w patogenezie nowotworów jajnika. U kobiet z nowotworami jajnika zaobserwowano zwiększone stężenie LPA w osoczu krwi oraz wykazano, że LPA poprzez LPAR2 i LPAR3 aktywuje komórki nowotworowe jajnika i zapobiega ich apoptozie (Choi i in. 2009; Sutphen i in. 2004). Interesujący jest również fakt, iż LPA działając poprzez LPAR1 odgrywa rolę supresorową w stosunku do komórek nowotworowych jajnika (Murph i in. 2008). Badania nad udziałem kwasu w układzie rozrodczym kobiet wykazały, że LPA pobudza wydzielanie angiogenicznych cytokin (IL-6 i IL-8) z ciałek żółtych, powstałych w wyniku leczenia niepłodności, co może prowadzić do zespołu hiperstymulacji jajników. Obecność receptorów dla LPA–LPAR1-3, wykazano w komórkach ziarnistych pęcherzyka kobiet poddawanym zabiegowi zapłodnienia *in vitro* (Chen i in. 2008).

Wobec powyższych danych w pracy habilitacyjnej założono, że LPA może odgrywać rolę również w etiopatogenezie raka błony śluzowej trzonu macicy, a poszczególne enzymy i receptory będące składowymi szlaku syntezy i metabolizmu LPA mogą być potencjalnymi, molekularnymi markerami stopnia dojrzałości histologicznej schorzenia, a także jego klinicznego zaawansowania. Zbadano również wzajemne korelacje pomiędzy auto/parakrynną rolą LPA, a syntezą oraz mechanizmem działania hormonów steroidowych. Wyniki te zostały poparte badaniami nad udziałem LPA w patogenezie endometriozy, u pacjentek z torbielami endometrialnymi jajników.

Opublikowane, oryginalne prace eksperymentalne wchodzące w skład osiągnięcia naukowego opisują ekspresję czterech różnych typów receptorów dla LPA oraz enzymów biorących udział w syntezie kwasu (autotaksyna – AX i fosfolipaza A2 – PLA2) zarówno w prawidłowej błonie śluzowej macicy, w typie I raka endometrium, oraz endometriozie. Dodatkowo dokładnie scharakteryzowano korelacje ekspresji wszystkich badanych elementów ścieżki sygnałowej LPA z wybranymi cechami klinicznymi tych schorzeń. W przypadku wszystkich typów receptorów dla LPA (poza LPAR3) oraz dwóch głównych enzymów biorących udział w syntezie kwasu, wykazano ich wyższą ekspresję, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka w chorobowo zmienionym endometrium, w porównaniu do tkanki zdrowej. Przy czym, w rakach endometrium wykazano najwyższą ekspresję dla LPAR1 i LPAR2. Udowodniono również że ekspresja LPAR1, LPAR2, LPAR4 i PLA2 były bezpośrednio zależne od stopnia zróżnicowania histologicznego nowotworu (klasyfikacja FIGO). Ponadto, ekspresja LPAR1, LPAR2 i PLA2 były pozytywnie skorelowane z wiekiem

pacjentek onkologicznych, a ekspresja mRNA dla LPAR1 i białka dla LPAR2, oraz mRNA dla LPAR3 z ich indeksem masy ciała (body mass index - BMI). Istotnym odkryciem prezentowanych badań, była również zależność ekspresji badanych czynników ścieżki sygnałowej LPA z występowaniem innych schorzeń - cukrzycy czy nadciśnienia.

Kolejnym aspektem opisywanego osiągnięcia naukowego było zbadanie zależności syntezy i działania LPA od status hormonalnego badanych tkanek. Główną przyczyną powstawania raka błony śluzowej trzonu macicy jest przedłużona ekspozycja na estrogeny niezrównoważona działaniem progesteronu (Akhmedkhanov i in. 2001). Z drugiej strony, wiadomo, że podwyższony poziom androgenów, a szczególnie testosteronu i najbardziej aktywnego 5β-dihydrotestosteronu (DHT) jest bezpośrednio związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka endometrium (Allen i in. 2008, Audet-Walsh i in. 2011). Wiadome jest, że lokalne androgeny w rakach endometrium mogą wywierać zarówno działanie pośrednie, jak i bezpośrednie. Z jednej strony, testosteron może być prekursorem syntezy estrogenów jako substrat dla aromatazy-5α-reduktazy typu 2 (SRD5A2), która w tym przypadku działa jako marker proliferacji komórek i tkanek (Sasano i Harada 1998, Belanger i in. 2002, Somboonporn i in. 2004), czy też prekursorem syntezy DHT, jako substratu dla cytochromu P450 family 19 subfamily A member - 1 -5- reductase (CYP19A1), która w tym przypadku wykazuje działanie antyproliferacyjne poprzez ścieżkę sygnałową DHT-AR w rakach endometrium (Kamal i in. 2016). Podobnie stwierdzono, że patologią estrogeno-zależną i progesterono-niezależną jest także endometrioza. Biorąc powyższe pod uwagę, w przeprowadzonych badaniach określono związek pomiędzy ekspresją dwóch głównych receptorów dla LPA (LPAR2 and LPAR1), jako potencjalnych markerów progresji nowotworu, a odpowiedzialnego za proliferację SRD5A2, jak również antyproliferacyjnego CYP19A1. Zbadano również koncentrację LPA, ekspresję jego receptorów i enzymów biorących udział w syntezie kwasu (autotaksyna – AX i fosfolipaza A2 – PLA2), a także korelację z receptorami dla estrogenu i progesteronu w endometriozie występującej u pacjentek z torbielami endometrialnymi jajników. W przeprowadzonych badaniach wykazano, pozytywne korelacje pomiędzy ekspresją LPAR1 i LPAR2 oraz odpowiedzialnej za proliferację SRD5A2 w tkance chorobowo zmienionej, co sugeruje że wewnątrznowotworowa synteza i metabolizm estrogenów są kluczowe w progresji raka endometrium typu I, sugerując jednocześnie udział LPA w etiopatogenzie tego schorzenia. Jakkolwiek, pozytywne korelacje pomiędzy ekspresją CYP19A1 i LPAR1, na poziomie

ekspresji białka, mogą świadczyć o pomocniczej roli LPA w etiologii progresji nowotworu endometrium poprzez wpływ na aktywność DHT. Dodatkowo, wykazano związek ekspresji receptorów LPAR, CYP19A1 i SRD5A2 z głębokością inwazji mięśniówki macicy przez nowotwór, oraz stopniem zróżnicowania histologicznego schorzenia. Badania nad udziałem LPA w endometriozie występującej u pacjentek z torbielami endometrialnymi jajników wykazały, że najwyższa ekspresja, dodatkowo skorelowana z ekspresją receptorów steroidowych, jest obserwowana w przypadku receptorów LPAR2 i LPAR4. Potwierdza to wcześniejsze przypuszczenia, że zarówno LPA jak i jego receptory biorą udział w powstaniu tego schorzenia.

Kolejnym problemem poruszanym w osiągnięciu naukowym jest określenie udziału białek WNT i *β*-kateniny w procesie angiogenezy i nowotworzenia endometrium. Do ludzkich genów kodujących białka sygnalizacyjne WNT zaliczono geny kodujące białka o właściwościach onkogennych: WNT1, WNT3, WNT3A, WNT7, WNT8 oraz WNT8B, oraz geny kodujące białka nie mające właściwości transformujących: WNT2, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7B, WNT11 (Kikuchi i wsp., 2007). Geny WNT kodują glikoproteiny bogate w cysteinę. Są to białka wydzielnicze, które mają przyłączoną dużą liczbę reszt kwasu palmitynowego. Przyłączanie reszty kwasu palmitynowego w obrębie cysteiny związane jest nie tylko z charakterem hydrofobowym tych białek, ale również z ich aktywnością. Aktywne białka WNT, w zależności od grupy do której należą, oraz w zależności od receptorów na powierzchni komórki, aktywują kanoniczny (geny uczestniczące w transformacji nowotworowej) i niekanoniczny (geny nie uczestniczące w transformacji nowotworowej) szlak przekazywania sygnału komórkowego. Kanoniczny szlak przekazywania sygnału komórkowego określany mianem WNT/β-katenina jest aktywowany poprzez przyłączenie białek WNT do kompleksu receptorów *Frizzled* (*Fzd*)/ *Low-density-lipoprotein Receptor-related Protein* (*LRP*) na powierzchni komórki. Aktywowane w ten sposób cytoplazmatyczne białko o nazwie *Dishevelled* (*Dsh*), hamuje aktywność kompleksu białkowego (*Axin/Adenomatous Polyposis Coli* (*APC*)/ *Glycogen Synthase Kinase 3β* (*GSK3β*)) odpowiedzialnego za degradację β-kateniny. Po stymulacji za pomocą WNT, cytoplazmatyczna β-katenina, trafia do jądra komórkowego, gdzie przyłącza się do domeny aktywującej czynniki transkrypcyjne *T Cell Factor* (*TCF*) / *Lymphoid Enhancer Factor* (*LEF*). Ponieważ β-katenina poprzez wiązanie z α-kateniną i z cytoplazmatyczną domeną E-kadheryny uczestniczy w oddziaływaniach adhezyjnych komórek, sposobem na zahamowanie sygnału komórkowego wywołanego przez WNT jest podwyższenie poziomu

E-kadheryny (Heasman i wsp., 2004). U ssaków, aktywacja szlaku WNT/β-katenina prowadzi do nabywania pluripotencji i rekrutacji komórek macierzystych. Ma również znaczenie dla rozwoju zarodkowego, determinacji płci, procesów angiogenezy i nowotworzenia. U ludzi zaobserwowano zmiany w ekspresji genów kodujących białka WNT biorące udział w kanonicznym szlaku przekazywania sygnału komórkowego w endometrium w takich stanach patologicznych jak endometrioza (Wang i wsp., 2010; Gaetie i wsp., 2007) a także rak (Bui et al., 1997). Doniesienia z ostatnich lat wskazują również na udział białek WNT i szlaku WNT/β-katenina, a także udział szlaków aktywowanych przez białka WNT, ale niezależnych od β-kateniny, w procesach różnicowania komórek endotelialnych, angiogenezie i nowotworzeniu. Tym samym krążące we krwi białka z rodziny WNT mogą się okazać czynnikiem istotnym dla mechanizmu rozwoju raka endometrium, a weryfikacja tej hipotezy w kolejnych badaniach autora wniosku habilitacyjnego, może mieć znaczenie diagnostyczne i/lub prognostyczne.

Przedstawione w ramach osiągnięcia naukowego badania, to oryginalne prace eksperymentalne podejmowane w głównej mierze w celu zdobywania nowej wiedzy na temat poszukiwania potencjalnych, molekularnych markerów nowotworzenia w endometrium. Podsumowując uzyskane wyniki, białka z rodziny WNT mogą się okazać czynnikiem istotnym dla mechanizmu rozwoju raka błony śluzowej trzonu macicy, zaś LPAR1 i LPAR2, wydają się efektywnymi kandydatami na molekularne markery prognostyczne w typie I raka endometrium, mogącymi w dalszej perspektywie znaleźć również zastosowanie w celowanej, spersonalizowanej terapii nowotworu.

Tomasz Waśniewski