

Załącznik nr 2

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego dr n. med. Marka Cybulskiego

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko: Marek Cybulski

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

Dyplom lekarza, Wydział Lekarski Akademii Medycznej w Lublinie, 1994 r.

Dyplom doktora nauk medycznych, Wydział Lekarski Akademii Medycznej w Lublinie, 2000 r.,
tytuł rozprawy doktorskiej: „Badanie katepsyny D w gruczołach jelita grubego.”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

1994 r. - 1997 r. - uczestnik stacjonarnych Studiów Doktoranckich z zakresu biochemii w Zakładzie Chemii Fizjologicznej na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Lublinie.

1997 r. - 2002 r. - asystent w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizjologicznej (w 1999 r. nazwa jednostki została zmieniona na Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej) na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Lublinie.

2002 r. - obecnie - adiunkt w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej na II Wydziale Lekarskim z Oddziałem Anglojęzycznym Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

„Poszukiwanie nowych genów zaangażowanych w patogenezę raka jajnika kobiet oraz ocena ich wartości prognostycznej”

Na osiągnięcie składa się cykl 4 prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR).

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),

1) **Marek Cybulski**, Bożena Jarosz, Andrzej Nowakowski, Witold Jeleniewicz, Przemysław Seroczyński, Magdalena Mazurek-Kociubowska. Cyclin I correlates with VEGFR-2 and cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2012, 127, 217-222. Praca Oryginalna; Impact Factor: 3,929; Punktacja MNiSW: 35.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń, ocenie mikroskopowej ekspresji badanych białek wykrytych metodą immunohistochemiczną w skrawkach tkankowych, wykonaniu analizy statystycznej wyników, interpretacji wyników badań, przeglądzie piśmiennictwa, napisaniu całego manuskryptu, korespondencji z biurem edytora, udzieleniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy (Projekt MNiSW Nr N407 092 32/3452). Mój udział procentowy szacuję na 70%.

2) **Marek Cybulski**, Witold Jeleniewicz, Andrzej Nowakowski, Agnieszka Stenzel-Bembenek, Rafał Tarkowski, Jan Kotarski, Andrzej Stepulak. Cyclin I mRNA expression correlates with kinase insert domain receptor expression in human epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2015, 35, 1115-1119. Praca Oryginalna; Impact Factor: 1,895; Punktacja MNiSW: 20.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń, udziale w oznaczaniu poziomu mRNA badanych genów metodą real-time PCR, wykonaniu analizy statystycznej wyników, interpretacji wyników badań, przeglądzie piśmiennictwa, napisaniu całego manuskryptu, korespondencji z biurem edytora, udzieleniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy (Projekt MNiSW Nr N407 092 32/3452). Mój udział procentowy szacuję na 65%.

3) **Marek Cybulski**, Bożena Jarosz, Andrzej Nowakowski, Witold Jeleniewicz, Elżbieta Kutarska, Wiesława Bednarek, Andrzej Stepulak. Cyclin A correlates with YB1, progression and resistance to chemotherapy in human epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2015, 35, 1715-1721. Praca Oryginalna; Impact Factor: 1,895; Punktacja MNiSW: 20.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń, ocenie mikroskopowej ekspresji badanych białek wykrytych metodą immunohistochemiczną w skrawkach tkankowych, wykonaniu analizy statystycznej wyników, interpretacji wyników badań, przeglądzie piśmiennictwa, napisaniu całego manuskryptu, korespondencji z biurem edytora, udzieleniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy (Projekt MNiSW Nr N407 092 32/3452). Mój udział procentowy szacuję na 65%.

4) Barbara Marzec-Kotarska[#], **Marek Cybulski[#]**, Józef C. Kotarski, Anna Ronowicz, Rafał Tarkowski, Grzegorz Polak, Halina Antosz, Arkadiusz Piotrowski, Jan Kotarski. Molecular bases of aberrant miR-182 expression in ovarian cancer. Genes Chromosomes Cancer 2016, 55, 877-889. Praca Oryginalna; Impact Factor: 3,696; Punktacja MNiSW: 35.

- Barbara Marzec-Kotarska i Marek Cybulski mieli równy wkład w powstanie tej pracy.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu części analizy statystycznej i interpretacji wyników badań, wykonaniu tabel I i II, rycin: 3, 4A, 4B, 4D, 5C, 6D i 8, częściowym opracowaniu ryciny 2, napisaniu części rozdziałów: „Materiały i Metody” oraz „Wyniki”, recenzowaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na część uwag recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 35%.

Sumaryczna punktacja wyżej wymienionych publikacji wynosi: IF - 11,415, MNiSW - 110.

Wymienione prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych.

c) omówienie celu naukowego/~~artystycznego~~ ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Rak jajnika nadal stanowi poważny problem zarówno diagnostyczny, jak i terapeutyczny. Nowotwór ten jest trzecim co do częstości, po raku szyjki i trzonu macicy, nowotworem złośliwym narządu rodnych kobiet i stanowi ósmą przyczynę zgonów kobiet z powodu nowotworów złośliwych na świecie. Ze względu na bezobjawowy przebieg tej choroby, jak i brak skutecznych badań przesiewowych, u ponad 60% pacjentek nowotwór ten wykrywa się już w stadium zaawansowanym. Z tego powodu oraz na skutek rozwoju oporności na chemioterapię rak jajnika jest nadal obciążony wysoką śmiertelnością pacjentek. W Polsce w 2014 roku wykryto 3722 nowych przypadków nowotworów złośliwych jajnika, a współczynnik

standaryzowany dla zachorowań na te nowotwory wyniósł 11,1 na 100.000 kobiet. Liczba zgonów spowodowanych tymi nowotworami wzrosła z 1959 zgonów w 1999 roku (standaryzowany współczynnik dla zgonów 6,7/100.000) do 2678 zgonów w 2014 roku (standaryzowany współczynnik dla zgonów 6,9/100.000). Przeżycie 5-letnie pacjentek z nowotworem w obrębie jajnika wynosi około 90%, jednak gdy nowotwór ten daje odległe przerzuty spada do około 30%. Standardowa terapia raka jajnika opiera się na operacyjnej cytoredukcji połączonej ze skojarzoną chemioterapią paklitakselem i karboplatiną lub cisplatiną. Mimo iż początkowo u pacjentek obserwuje się dobrą odpowiedź na leczenie, z czasem rozwija się u nich oporność na chemioterapię i ostatecznie chore te umierają z powodu wznowy. Dlatego też niezmiernie ważne jest odkrywanie nowych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój, progresję i chemooporność raka jajnika.

Celem przeprowadzonych badań było:

- a) odkrycie nowych genów zaangażowanych w rozwój i progresję raka jajnika kobiet
- b) ocena wartości rokowniczej badanych genów (analiza przeżycia pacjentek)
- c) analiza przydatności badanych genów jako markerów odpowiedzi pacjentek na chemioterapię.

Przyczyną trudności związanych z leczeniem pacjentek może być znaczne zróżnicowanie histologiczne raka jajnika. Nowotwór ten wywodzi się z różnych typów komórek, a tym samym przyjmuje szereg typów histologicznych o odmiennych zmianach molekularnych stwierdzanych w komórkach nowotworowych. Najczęściej występującym typem raka jajnika jest rak surowiczy, a po nim endometrioidalny, śluzowy i rzadki typ jasnokomórkowy. W pierwszej fazie moich doświadczeń ocenilem ekspresję ponad 30 tysięcy genów metodą mikromacierzy DNA w czterech komercyjnych liniach raka jajnika o różnym pochodzeniu: Caov-3, OV-90, TOV-112D i

OVCAR-3. Linie Caov-3, OV-90 i OVCAR-3 wywodzą się z komórek raka jajnika typu surowiczego, a TOV-112D z raka jajnika typu endometrioidalnego. Dodatkowo linia OVCAR-3 jest oporna na różne leki cytostatyczne. Do dalszego etapu moich badań wybrałem cztery geny, których ekspresję stwierdziłem we wszystkich badanych liniach komórkowych: *CCNI*, *VEGFR-2*, *CCNA2* i *YBX1*.

W **publikacjach 1 i 2** przedstawiłem wyniki dotyczące badań ekspresji genów *CCNI* i *VEGFR-2* w rakach jajnika o różnym utkaniu histologicznym. Ekspresję obu genów badałem metodami: immunohistochemii (IHC) [**Publikacja 1**] i real-time PCR [**Publikacja 2**]. Gen *CCNI* koduje cyklinę I, białko o którego funkcji wciąż niewiele wiemy. Białko to należy do grupy cyklin - białek, które wraz z zależnymi od nich kinazami (cdk) regulują cykl komórkowy. Zaburzenie ekspresji tych białek może doprowadzić do rozwoju nowotworu. Początkowo ekspresję cykliny I wykryto w zróżnicowanych komórkach mózgu, mięśni, serca i podocytach nerki. Później wykryto ją także w komórkach nowotworowych raka sutka i trzustki. *VEGFR-2* jest receptorem błonowym o aktywności kinazy tyrozynowej wykrytym początkowo w komórkach śródbłonna naczyń, a później także w komórkach nowotworowych. Receptor *VEGFR-2* odgrywa kluczową rolę w procesie angiogenezy, a od niedawna przypisuje się mu także udział w sygnalizacji prowadzącej do nasilenia proliferacji i zahamowania apoptozy komórek nowotworowych. Jako pierwszy wykryłem ekspresję cykliny I w liniach komórkowych i w rakach jajnika. W **publikacji 1** wykazałem, że ekspresja cykliny I i *VEGFR-2* jest obecna w komórkach nowotworowych i jest skorelowana z ich proliferacją. Ponadto stwierdziłem dodatnią istotną korelację pomiędzy ekspresją obu genów zarówno na poziomie mRNA [**Publikacja 2**], jak i białka [**Publikacja 1**]. Stwierdziłem także, że ekspresja *VEGFR-2* na poziomie białka [**Publikacja 1**], ale nie mRNA [**Publikacja 2**] jest powiązana z zaawansowaniem choroby i

stopniem zróżnicowania histologicznego raków jajnika. Nie stwierdziłem jednak istotnych różnic ekspresji obu genów zarówno na poziomie mRNA [**Publikacja 2**], jak i białka [**Publikacja 1**] w zależności od odpowiedzi pacjentek, ani wrażliwości nowotworów na chemioterapię. W analizie przeżycia cyklina I nie okazała się istotnym czynnikiem prognostycznym co do całkowitego przeżycia chorych (OS), ani czasu do wystąpienia wznowy procesu nowotworowego (DFS) [**Publikacja 1**]. Jednak wyższa ekspresja receptora VEGFR-2 była istotnie powiązana z krótszym DFS, co potwierdza wcześniejsze obserwacje autorów japońskich.

W **publikacji 3** przedstawiłem wyniki badań dotyczące ekspresji genów *CCNA2* i *YBX1* w rakach jajnika. Gen *CCNA2* koduje cyklinę A2 (cyklinę A), białko biorące udział w regulacji cyklu komórkowego i w procesie rozdziału chromosomów w czasie mitozy. Cyklina A kontroluje zarówno przejście G1/S, jak i G2/M cyklu komórkowego oddziałując na kinazy zależne od cyklin (cdk) 1 i 2. Gen *YBX1* koduje białko YB-1, które reguluje na poziomie transkrypcji i translacji ekspresję wielu genów zaangażowanych między innymi w proces proliferacji komórek i oporności komórek nowotworowych na cytostatyki. Wysoką ekspresję obu tych genów wykazano w różnych nowotworach człowieka. W **publikacji 3** wykazałem obecność białek cykliny A i YB-1 w komórkach nowotworowych raka jajnika metodą IHC. Stwierdziłem wysoką ekspresję cykliny A w guzach zaawansowanych i niskozróżnicowanych. Ponadto po raz pierwszy odkryłem, że nadekspresja tej cykliny w komórkach nowotworowych jest w sposób istotny powiązana z gorszą odpowiedzią pacjentek na chemioterapię i jest charakterystyczna dla raków jajnika opornych i niewrażliwych na chemioterapię. Dodatkowo ekspresja cykliny A w rakach jajnika była dodatnio i istotnie skorelowana z ekspresją białka YB-1. Co ciekawe ekspresja białka YB-1 nie różniła się istotnie w zależności od odpowiedzi pacjentek, czy wrażliwości raków jajnika na chemioterapię.

Publikacja 4 poświęcona jest badaniu ekspresji mikro-RNA-182 (miR-182) w rakach jajnika oraz mechanizmów odpowiedzialnych za regulację ekspresji tego miRNA. miRNA są krótkimi cząsteczkami RNA, które nie kodują białek lecz biorą udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów poprzez zahamowanie translacji lub nasilenie degradacji mRNA. Wykazano, że miRNA pełnią rolę onkogenów lub genów supresorowych w różnych nowotworach człowieka. W **publikacji 4** badano poziom miR-182 metodą mikromacierzy i real-time PCR, ilość kopii badanych genów metodą macierzy aCGH, a metylację regionów promotorowych genów metodą immunoprecypitacji metylovanego DNA. Przeprowadzona przeze mnie analiza danych uzyskanych metodą real-time PCR wykazała istotnie wyższą ekspresję miR-182 w rakach jajnika w porównaniu do prawidłowej tkanki jajnika. Po raz pierwszy stwierdziliśmy, że wysoka ekspresja tego miRNA w rakach jajnika jest powiązana z krótszym przeżyciem pacjentek (OS). Po raz pierwszy wykazałem, że metylacja promotora genu *miR-182* jest w sposób istotny związana z niższą ekspresją miR-182 w rakach jajnika. Dodatkowo odkryłem, że w rakach jajnika wykazujących wysoką ekspresję miR-182 występuje zwiększona ilość kopii genu *miR-182* i zmniejszona liczba kopii genu *PRDM5*, który pełni funkcję supresora nowotworzenia.

Wnioski i ewentualne wykorzystanie wyników badań:

- a) wyniki moich badań wskazują na istnienie powiązania pomiędzy genami kodującymi cyklinę I i VEGFR-2 oraz ich pobudzający wpływ na proliferację komórek raka jajnika. Gen *CCNI* może stać się nowym celem terapii przeciwnowotworowej u pacjentek z rakiem jajnika
- b) wyniki moich badań sugerują, że cyklina A może stać się nowym markerem odpowiedzi na chemioterapię pacjentek z rakiem jajnika

- c) zaobserwowana przeze mnie korelacja pomiędzy genami *CCNA2* i *YBX1* może wskazywać na istotny udział genu *YBX1* w rozwoju raka jajnika poprzez nasilenie ekspresji cykliny A
- d) ekspresja miR-182 jest czynnikiem rokowniczym u pacjentek z rakiem jajnika
- e) odkrycie wpływu metylacji promotora genu *miR-182* na ekspresję tego miRNA w raku jajnika może pomóc w opracowaniu przyszłych metod leczenia tego nowotworu opartych o modyfikacje epigenetyczne.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (~~artystycznych~~).

Dane bibliometryczne:

Jestem autorem lub współautorem 42 publikacji naukowych w tym: 34 prac oryginalnych w czasopismach (w tym 4 artykuły wchodzące w skład osiągnięcia), 3 prac poglądowych, 4 publikacji w suplementach czasopism, 1 listu do redakcji czasopisma i 62 streszczeń zjazdowych (19 ze zjazdów międzynarodowych i 43 ze zjazdów krajowych).

Łączny Impact Factor publikacji wynosi **57,228**, a łączna punktacja MNiSW **594,50**.

Liczba cytowań według bazy Web of Science Core Collection wynosi: **208** (bez autocytowań).

Indeks Hirscha według bazy Web of Science Core Collection wynosi: **9**.

Lista najważniejszych spośród pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

A. Ocena przydatności badania poziomu kwasu sialowego w surowicy krwi jako markera choroby nowotworowej.

Kwas sialowy (KS) stanowi element składowy glikoprotein i gangliozydów błon komórkowych. W przebiegu m.in. choroby nowotworowej dochodzi do uwalniania KS do krwi w

wyniku złuszczenia składników błon komórkowych, lizy komórek nowotworowych i jego nasilonej syntezy połączonej z sekrecją z komórek.

W pracach własnych oznaczaliśmy poziom KS metodą chemiczną Warrena w surowicy krwi i w guzach nowotworowych. W **publikacji 1** oznaczyliśmy poziom KS w surowicy i w guzach pacjentek z rakiem endometrium, jajnika i szyjki macicy oraz grupie kontrolnej, którą stanowiły osoby zdrowe. Stwierdziliśmy istotnie wyższy poziom KS w surowicy krwi chorych w porównaniu do osób zdrowych oraz wyższy poziom KS w surowicy krwi pacjentek z zaawansowanym rakiem endometrium (stadium FIGO II+III) w porównaniu do pacjentek z nowotworem w stadium FIGO I. W **publikacji 2** badaliśmy poziom KS, antygenu CA 125 i aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w surowicy pacjentek z rakiem jajnika i kobiet zdrowych. Wykazaliśmy istotnie wyższy poziom KS i CA 125 w surowicy krwi chorych w porównaniu do kobiet zdrowych oraz wyższy poziom KS u pacjentek z zaawansowanym nowotworem (FIGO II lub III vs I). Odkryliśmy także istotną, dodatnią korelację pomiędzy poziomem KS i CA 125 w grupie chorych. W **publikacji 3** oznaczyliśmy poziom KS w raku endometrium, hiperplazji endometrium i prawidłowej błonie śluzowej macicy. Stwierdziliśmy istotnie wyższy poziom KS w raku endometrium w porównaniu do prawidłowej błony śluzowej macicy.

Uzyskane przez nas wyniki badań wykazały przydatność oznaczania KS w surowicy krwi, jako markera nowotworowego u pacjentek z niektórymi nowotworami narządu rodnego kobiet.

Publikacje:

1) Alicja Paszkowska, Henryk Berbeć, Andrzej Semczuk, **Marek Cybulski**. Sialic acid concentration in serum and tissue of endometrial cancer patients. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 1998, 76, 211-215.

2) Henryk Berbeć, Alicja Paszkowska, Bogusław Siwek, Krystyna Grądziel, **Marek Cybulski**. Total serum sialic acid concentration as a supporting marker of malignancy in ovarian neoplasia. Eur. J. Gynaecol. Oncol. 1999, 20, 389-392.

3) Alicja Paszkowska, **Marek Cybulski**, Andrzej Semczuk, Krzysztof Postawski, Henryk Berbeć. Total sialic acid content in endometrial cancer tissue in relation to normal and hyperplastic human endometrium. Cancer Detect. Prev. 2000, 24, 459-463.

B. Ocena udziału białka p53 w progresji raka jelita grubego oraz jego wartości prognostycznej.

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym kodowanym przez gen supresorowy *TP53*. Białko to bierze udział w regulacji cyklu komórkowego, apoptozy i naprawy DNA. Mutacje genu *TP53* prowadzące do zaburzenia funkcji białka p53 stwierdzono w około połowie nowotworów człowieka o różnej lokalizacji.

W pracach własnych badaliśmy poziom białka p53 metodami immunohistochemii (IHC) i Western-blot (WB) oraz mutacje genu *TP53* metodą PCR-SSCP w gruczolakorakach jelita grubego. W **Publikacjach 1-3** oznaczyliśmy ekspresję białka p53 metodą IHC w skrawkach tkankowych gruczolakoraków jelita grubego. Stwierdziliśmy istotnie częstsze występowanie złogów białka p53 w nieśluzotwórczych gruczolakorakach jelita grubego, rakach zlokalizowanych w odbytnicy i rakach zaawansowanych. Ponadto wykazaliśmy, że chorzy z gruczolakorakami wykazującymi obecność białka p53 żyli krócej. W **publikacji 3** w metodzie IHC jako kontrolę pozytywną zastosowaliśmy raki jelita grubego, w których wykryliśmy mutacje punktowe w eksonach 5-8 genu *TP53* metodą PCR-SSCP. Ponadto użyliśmy metody WB do ustalenia punktu odcięcia dla metody IHC (odczyn negatywny vs odczyn pozytywny na białko p53). Odkryliśmy, że przy długim okresie obserwacji chorych (ponad 10 lat) akumulacja białka

p53 okazuje się być niekorzystnym i niezależnym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z gruczolakorakami zlokalizowanymi w lewej części jelita grubego.

Uzyskane przez nas wyniki badań wskazują na udział genu *TP53* w procesie progresji gruczolakoraków jelita grubego oraz na przydatność rokowniczą oznaczania białka p53 w skrawkach tkankowych tych nowotworów.

Publikacje:

- 1) Piotr Paluszkiewicz, Barbara Pawłowska-Wakowicz, **Marek Cybulski**, Henryk Berbeć. Białko p53 w gruczolakorakach jelita grubego. (P53 protein in colorectal adenocarcinomas.) Wiad. Lek. 1997, 50, supl. 1, 87-91.
- 2) Piotr Paluszkiewicz, Jerzy Karski, Henryk Berbeć, Barbara Pawłowska-Wakowicz, **Marek Cybulski**, Maciej Karski, Alicja Paszkowska. Prognostic significance of p53 protein accumulation in cancer cells obtained from selected group of patients with sporadic colorectal cancer. J. Appl. Genet. 1999, 40, 135-144.
- 3) Piotr Paluszkiewicz, Henryk Berbeć, Barbara Pawłowska-Wakowicz, **Marek Cybulski**, Alicja Paszkowska. p53 protein accumulation in colorectal cancer tissue has prognostic value only in left-sided colon tumours. Cancer Detect. Prev. 2004, 28, 252-259.

C. Badanie mechanizmów zaangażowanych w procesy rozwoju i progresji nowotworów złośliwych macicy kobiet.

W **publikacji 1** badaliśmy mutacje genu *KRAS* w rakach endometrium metodą PCR-RFLP. Gen *KRAS* koduje białko K-ras i należy on do grupy onkogenów biorących udział w regulacji proliferacji komórek. Białko K-ras jest GTP-azą, elementem szlaku RAS/MAPK, biorącym udział w przekazywaniu sygnałów zewnątrzkomórkowych do jądra komórkowego. W naszych badaniach stwierdziliśmy obecność mutacji aktywujących w kodonie 12 genu *KRAS*

jedynie w 14% przypadków raków endometrium i trend w kierunku krótszego przeżycia pacjentek z tymi mutacjami. W **publikacji 2** ocenialiśmy częstość występowania infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) typu 16 i 18 w rakach błony śluzowej macicy metodą PCR. Wirus HPV należy do grupy wirusów onkogennych, które sprzyjają rozwojowi nowotworów m.in. raka szyjki macicy, pochwy i sromu. Stwierdziliśmy obecność wirusa HPV 16 w 20%, a HPV 18 tylko w 4 % raków endometrium. Infekcja wirusem HPV nie była jednak powiązana z parametrami klinicznymi choroby. W **publikacji 3** badaliśmy wartość prognostyczną wskaźnika MIB-1 w rakach endometrium. Stosując przeciwciała MIB-1 wykryliśmy metodą immunohistochemii (IHC) antygen Ki-67, który jest markerem proliferacji komórek. Stwierdziliśmy istotnie wyższy wskaźnik MIB-1 w rakach niskozróżnicowanych i silniej naciekających mięśni macicy, jednak nie był on istotnie powiązany z przeżyciem pacjentek. W **publikacji 4** oceniliśmy poziom antygeny sialosyl-Tn (STn) metodą IHC w prawidłowej błonie śluzowej macicy, hiperplazji i rakach endometrium. Antygen STn jest glikoproteiną błonową rzadko występującą w komórkach prawidłowych w odróżnieniu od komórek nowotworowych. Stwierdziliśmy niewielką ilość STn w komórkach endometrium w fazie sekrecyjnej i jego brak w endometrium w fazie proliferacyjnej. Silniejszy odczyn na STn występował w hiperplazji i rakach endometrium. W rakach błony śluzowej macicy ekspresja STn była istotnie powiązana ze stopniem zróżnicowania i głębokością naciekania mięśnia macicy, ale nie z przeżyciem pacjentek. W **publikacji 5** przeanalizowaliśmy zaburzenia drogi sygnalizacyjnej Rb obejmujące: utratę heterozygotyczności (LOH) genu *RBI*, zmiany w obrębie genu *CDKN2A* (mutacje, zaburzona metylacja promotora, LOH) oraz zmienioną ekspresję białek pRb, cykliny D1, cdk4 i p16^{INK4A} w rakach endometrium. Szlak Rb jest zaangażowany w regulację przejścia z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego. Stwierdziliśmy częstsze występowanie zaburzeń szlaku Rb w zaawansowanych rakach błony

śluzowej macicy, jednak ich obecność nie miała wpływu na długość czasu do wystąpienia wznowy nowotworu. W **publikacji 6** zbadaliśmy LOH genu *TP53* metodą PCR-RFLP/VNTR oraz ekspresję białka p53 i wskaźnik MIB-1 metodą IHC w rakach endometrium. Stwierdziliśmy istotną, dodatnią korelację pomiędzy ekspresją białka p53 i wskaźnikiem MIB-1 w rakach błony śluzowej macicy, istotnie wyższą ekspresję białka p53 w rakach niskozróżnicowanych oraz trend w kierunku krótszego przeżycia pacjentek z LOH genu *TP53*. W **publikacji 7** zbadaliśmy ekspresję białek p53 i MDM2 metodą IHC w przerzutach i pierwotnych rakach endometrium. Białko MDM2 jest E3 ligazą ubikwityny odpowiedzialną za znakowanie białek ubikwityną co kieruje je na drogę degradacji przez proteasom. Białko to m.in. ubikwityluje białko p53 obniżając jego poziom w komórce co prowadzi do zniesienia hamującego wpływu białka p53 na cykl komórkowy. Stwierdziliśmy istotną korelację pomiędzy ekspresją białek p53 (w guzach pierwotnych i przerzutach) i MDM2 w przerzutach oraz krótsze przeżycie pacjentek z nadekspresją białka p53 w guzach pierwotnych lub przerzutach. Dodatkowo ekspresja białka p53 okazała się być niezależnym czynnikiem prognostycznym. W **publikacji 8** badaliśmy obecność delekcji 4977-bp mitochondrialnego DNA (mtDNA4977) metodą PCR w rakach endometrium i prawidłowej błonie śluzowej macicy. Delekcję 4977-bp wykryto w różnych tkankach i jest ona jedną z najczęstszych delekcji mitochondrialnego DNA (mtDNA). Wykazaliśmy obecność delekcji mtDNA4977 zarówno w rakach jak i w tkance prawidłowej. U pacjentek w wieku 50-60 lat w prawidłowym endometrium stwierdziliśmy istotnie wyższy stosunek mtDNA4977/prawidłowy mtDNA co może być następstwem starzenia organizmu. W **publikacji 9** oceniliśmy częstość LOH genu *TP53* w przerzutach i pierwotnych rakach endometrium. Wykazaliśmy obecność LOH genu *TP53* zarówno w guzach pierwotnych, jak i przerzutach raka błony śluzowej macicy i jej powiązanie z niektórymi cechami klinicznymi. W rakach pierwotnych LOH *TP53* w obrębie intronu 1 korelowała z nadekspresją białka p53. W **publikacji 10** zbadaliśmy ekspresję białka

p14^{ARF} metodą IHC w przerzutach i pierwotnych rakach endometrium. Białko to działa jako supresor nowotworzenia poprzez indukcję zahamowania cyklu komórkowego i pobudzenie apoptozy. Odkryliśmy, że ekspresja białka p14^{ARF} w guzach pierwotnych i przerzutach jest powiązana z obecnością nowotworu w jajowodzie, ale nie jest markerem przeżycia pacjentek. W **publikacji 11** oceniliśmy metodą IHC ekspresję białek p53 i Ki-67 w pierwotnych mięsakorakach narządów rodnych (macicy, szyjki macicy i jajnika) i przerzutach. Stwierdziliśmy, że nadekspresja białka p53 w mięsakorakach istotnie koreluje z obecnością przerzutów do jajników. Odkryliśmy także istotną korelację pomiędzy ekspresją badanych białek w składowej nabłonkowej i mezenchymalnej mięsakoraków.

Uzyskane przez nas wyniki wskazują na: (1) prawdopodobnie niewielki udział mutacji w kodonie 12 genu *KRAS* w patogenezie raka błony śluzowej macicy, (2) powiązanie wielkości wskaźnika MIB-1, a także ekspresji STn ze stopniem zróżnicowania i głębokością naciekania mięśnia macicy przez raki endometrium, (3) udział zaburzeń szlaku Rb w rozwoju i progresji raka błony śluzowej macicy, (4) wpływ białka p53 na aktywnością proliferacyjną raków endometrium i jego wartość jako niezależnego czynnika rokowniczego, (5) brak udziału delecji mtDNA4977 w patogenezie raka endometrium, (6) wpływ LOH genu *TP53* na ekspresję białka p53 w pierwotnych rakach błony śluzowej macicy, (7) udział białka p14^{ARF} w tworzeniu przerzutów raka endometrium do jajowodów, (8) wspólne pochodzenie obu składowych utkania histologicznego mięsakoraków narządu rodnych kobiet.

Publikacje:

1) Andrzej Semczuk, Henryk Berbeć, Marzena Kostuch, **Marek Cybulski**, Jacek Wojcierowski, Włodzimierz Baranowski. K-ras gene point mutations in human endometrial carcinomas: correlation with clinicopathological features and patients' outcome. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1998, 124, 695-700.

- 2) Andrzej Semczuk, Agnieszka Stenzel, Włodzimierz Baranowski, Krystyna Różyńska, **Marek Cybulski**, Marzena Kostuch, Jerzy Jakowicki, Jacek Wojcierowski. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 in human neoplastic endometrium: lack of correlation with established prognostic factors. *Oncol. Rep.* 2000, 7, 905-910.
- 3) Andrzej Semczuk, Danuta Skomra, **Marek Cybulski**, Jerzy A. Jakowicki. Immunohistochemical analysis of MIB-1 proliferative activity in human endometrial cancer. Correlation with clinicopathological parameters, K-ras codon 12 point mutations. *Histochem. J.* 2001, 33, 193-200.
- 4) Andrzej Semczuk, Alicja Paszkowska, Roman Miturski, Danuta Skomra, **Marek Cybulski**, Jerzy A. Jakowicki, Henryk Berbeć. Sialosyl-Tn expression in normal and pathological conditions of human endometrium. An immunohistochemical study. *Pathol. Res. Pract.* 2002, 198, 589-595.
- 5) Andrzej Semczuk, **Marek Cybulski**, Jacek Tomaszewski, Tomasz Rechberger, Jerzy A. Jakowicki. Clinicoprognostic significance of pRb1 pathway alterations in uterine endometrial adenocarcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2004, 154, 186-189.
- 6) Andrzej Semczuk, Barbara Marzec, Danuta Skomra, Albert Roessner, **Marek Cybulski**, Tomasz Rechberger, Regine Schneider-Stock. Allelic loss at TP53 is not related to p53 protein overexpression in primary human endometrial carcinomas. *Oncology* 2005, 69, 317-325.
- 7) Ryszard Jęczeń, Danuta Skomra, **Marek Cybulski**, Regine Schneider-Stock, Wiktor Szewczuk, Albert Roessner, Tomasz Rechberger, Andrzej Semczuk. P53/MDM2 overexpression in metastatic endometrial cancer: correlation with clinicopathological features and patient outcome. *Clin. Exp. Metastasis* 2007, 24, 503-511.

- 8) Konrad Futyma, Lechosław Putowski, **Marek Cybulski**, Paweł Miotła, Tomasz Rechberger, Andrzej Semczuk. The prevalence of mtDNA4977 deletion in primary human endometrial carcinomas and matched control samples. *Oncol. Rep.* 2008, 20, 683-688.
- 9) Wiktor Szewczuk, Danuta Skomra, **Marek Cybulski**, Dorota Prządka-Rabaniuk, Agata Filip, Maciej Jóźwik, Piotr Olcha, Albert Roessner, Andrzej Semczuk. Allelic loss at TP53 in metastatic human endometrial carcinomas. *Clin. Exp. Metastasis* 2009, 26, 789-796.
- 10) Piotr Olcha, **Marek Cybulski**, Danuta Skomra, Bogdan Obrzut, Atanas Ignatov, Maciej Jóźwik, Regine Schneider-Stock, Andrzej Semczuk. The pattern of p14ARF expression in primary and metastatic human endometrial carcinomas: correlation with clinicopathological features and TP53 pathway alterations. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2010, 20, 993-999.
- 11) Beata Bałon, Ewa Kaznowska, Atanas Ignatov, Anna Steć, Anna Semczuk-Sikora, Regine Schneider-Stock, Maciej Jóźwik, Stanisław Sulkowski, **Marek Cybulski**, Justyna Szumiło, Andrzej Semczuk. p53 is not related to Ki-67 immunostaining in the epithelial and mesenchymal components of female genital tract carcinosarcomas. *Oncol. Rep.* 2013, 30, 1661-1668.

D. Ocena skuteczności programu profilaktyki raka szyjki macicy w Polsce.

Rak szyjki macicy jest jednym z nielicznych nowotworów człowieka wywołanych głównie infekcją wysokoonkogennymi typami wirusa HPV. W związku z powyższym wprowadzenie w wielu krajach szczepień ochronnych i programu profilaktyki polegającego na wczesnym wykrywaniu zmian przedrakowych szyjki macicy zmniejszyło ilość zachorowań, a tym samym umieralność pacjentek z powodu raka szyjki macicy. W **publikacji 1** poddaliśmy analizie skuteczność programu profilaktyki raka szyjki macicy wprowadzonego w Polsce w 2006/2007 r. i jego zgodność z zaleceniami europejskimi. Wykazaliśmy, że program ten jest tylko częściowo zgodny z zaleceniami i ma ograniczony zasięg oddziaływania (niski odsetek

kobiet korzystających z zaproszeń na badania przesiewowe). Dodatkowo nie stwierdziliśmy istotnych zmian trendów dla zachorowań i umieralności pacjentek z powodu raka szyjki macicy w latach 1999-2011, które powinny nastąpić po wprowadzeniu programu profilaktyki. W **publikacji 2** porównaliśmy wybrane parametry kliniczne pacjentek z rakiem szyjki macicy (wiek chorych i stadium zaawansowania FIGO), typ histologiczny nowotworu i przeżycie pacjentek przed i w 3 lata po wprowadzeniu programu profilaktyki. Stwierdziliśmy istotny wzrost częstości występowania zaawansowanych raków po wprowadzeniu programu profilaktyki raka szyjki macicy oraz krótsze przeżycia pacjentek w wieku ≥ 60 lat i tych z zaawansowanym nowotworem. W **publikacji 3** oceniliśmy koszty związane z wykrywaniem zmian przedrakowych i raka szyjki macicy oraz leczeniem pacjentek w Polsce. Stwierdziliśmy, że koszty te są dosyć wysokie (około 137 mln zł rocznie) co wskazuje na to, że rak szyjki macicy wciąż stanowi znaczący problem ochrony zdrowia w naszym kraju. W **publikacji 4** przeanalizowaliśmy wpływ programu profilaktyki raka szyjki macicy na zachorowalność i umieralność pacjentek z powodu raka szyjki macicy w latach 1980-2014. Wykazaliśmy istotne spadki zachorowalności i umieralności dla chorych poniżej 60 roku życia w latach 2008 i 2005, jednak trendy dla pacjentek w wieku ≥ 60 lat po wprowadzeniu programu profilaktyki pozostają stabilne. Ponadto zaobserwowaliśmy wysokie ryzyko zachorowań i zgonów z powodu raka szyjki macicy dla chorych w wieku powyżej 50-60 lat.

Wyniki naszych badań wskazują na potrzebę wprowadzenia zmian w polskim programie profilaktyki raka szyjki macicy w celu poprawy jego skuteczności.

Publikacje:

1) Andrzej Nowakowski, **Marek Cybulski**, Andrzej Śliwczyński, Arkadiusz Chil, Zbigniew Teter, Przemysław Seroczyński, Marc Arbyn, Ahti Anttila. The implementation of an organised

cervical screening programme in Poland: an analysis of the adherence to European guidelines.

BMC Cancer 2015, 15:279, 1-11.

2) Andrzej Nowakowski, **Marek Cybulski**, Irmina Buda, Iwona Janosz, Katarzyna Olszak-

Wąsik, Piotr Bodzek, Andrzej Śliwczyński, Zbigniew Teter, Anita Olejek, Włodzimierz

Baranowski. Cervical cancer histology, staging and survival before and after implementation of

organised cervical screening programme in Poland. PLoS One 2016, 11:e0155849, 1-10.

3) Andrzej Nowakowski, Andrzej Śliwczyński, Przemysław Seroczyński, **Marek Cybulski**,

Zbigniew Teter. Reimbursed costs of management of uterine cervical neoplasia in Poland - a

descriptive analysis based on the data from the National Health Fund. Centr. Eur. J. Pub. Health

2016, 24, 163-168.

4) Andrzej Nowakowski, Urszula Wojciechowska, Paulina Wieszczy, **Marek Cybulski**, Michał

F. Kamiński, Joanna Didkowska. Trends in cervical cancer incidence and mortality in Poland: is

there an impact of the introduction of the organised screening? Eur. J. Epidemiol. 2017, 32, 529-

532.

20.12.2017r. M. Cybulski