



Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Medycznych

lek. Paweł Porzycki

**Ocena przydatności nowych biomarkerów,
a w szczególności cząstek mikroRNA,
w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów
z rakiem gruczołu krokowego**

**Rozprawa doktorska
na podstawie cyklu 6 publikacji**

Promotor: dr hab. n. med. Ewa Kaznowska, prof. URz

Rzeszów, 2021r.

Serdeczne podziękowania składam
Pani dr hab. n. med. Ewie Kaznowskiej, prof. UR,
za inspirację, opiekę naukową, a także wielowymiarowe wsparcie
udzielane mi w trakcie pisanie rozprawy.

SPIS TREŚCI

1.	Tytuł rozprawy doktorskiej	5
2.	Autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa	5
3.	Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	7
4.	Rak gruczołu krokowego	8
4.1.	Epidemiologia	8
4.2.	Klasyfikacja raka gruczołu krokowego	9
4.3.	Klasyfikacja histopatologiczna raka gruczołu krokowego	10
4.4.	Określenie stopnia złośliwości raka gruczołu krokowego	10
4.5.	Rak istotny klinicznie / nieistotny klinicznie	11
4.6.	Rozpoznawanie raka gruczołu krokowego - stan obecny	12
5.	Omówienie publikacji wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej	18
6.	Przebieg pracy naukowej	21

7.	Wykaz publikacji nie wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej	22
8.	Podsumowanie dorobku naukowego	23
9.	Streszczenie rozprawy doktorskiej	24
10.	Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim	29
11.	Wykaz publikacji z zakresu rozprawy doktorskiej	34
[1]	Porzycki P., Ciszkowicz E., Semik M., Tyrka M. Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. International Urology and Nephrology. 2018; 50: 1619-1626.	35
[2]	Porzycki P., Ciszkowicz E. Detection of individual prostate cancer via multiparametric magnetic resonance imaging in own material – initial experience. Journal of Contemporary Brachytherapy. 2019, 11, 6: 1- 6.	43
[3]	Porzycki P., Ciszkowicz E. Initial experience with SelectMDx test in patients considered for prostate biopsy (abstract). European Urology Supplements. 2019; 18(2): e2316.	49
[4]	Ciszkowicz E., Porzycki P., Semik M., Kaznowska E., Tyrka M. MiR-93/miR-375: diagnostic potential, aggressiveness correlation and common target genes in prostate cancer. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21(16): 5667.	50
[5]	Porzycki P., Ciszkowicz E. Modern biomarkers in prostate cancer diagnosis. Central European Journal of Urology, 2020; 73: 1-7	69
[6]	Porzycki P. Potencjalne kliniczne zastosowanie cząsteczek miRNA w diagnostyce raka prostaty. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.	76
12.	Oświadczenia współautorów	106

1. Tytuł rozprawy doktorskiej

Ocena przydatności nowych biomarkerów, a w szczególności cząstek mikroRNA, w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego.

2. Autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

Przedstawione poniżej prace, których jestem **autorem i współautorem**, powstały dzięki **moim staraniom i inicjatywie** w oparciu o uchwałę Komisji Bioetycznej OIL, która pozytywnie zaopiniowała projekt badania pt.: "**Ocena przydatności mikroRNA jako biomarkera w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego**". Jednocześnie zostałem wyznaczony na koordynatora tych badań.

1. **Porzycki P.**, Ciszkowicz E., Semik M., Tyrka M. Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. International Urology and Nephrology. 2018; 50: 1619-1626. doi.org/10.1007/s11255-018-1938-2

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu doświadczeń, przygotowaniu próbek do badań, analizie danych i opracowaniu manuskryptu.

2. **Porzycki P.**, Ciszkowicz E. Detection of individual prostate cancer via multiparametric magnetic resonance imaging in own material – initial experience. Journal of Contemporary Brachytherapy. 2019, 11, 6: 1-6. doi.org/10.5114/jcb.2019.90085

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, analizie danych i przygotowaniu manuskryptu.

3. **Porzycki P.**, Ciskowicz E. Initial experience with SelectMDx test in patients considered for prostate biopsy (abstract). European Urology Supplements. 2019; 18(2): e2316.

doi.org/10.1016/S1569-9056(19)32020-2

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, analizie danych, przygotowaniu manuskryptu i prezentacji wyników pracy na międzynarodowej konferencji naukowej w Wiedniu – maj, 2019r.

4. Ciskowicz E., **Porzycki P.**, Semik M., Kaznowska E., Tyrka M. Mir-93/miR-141/miR-375: diagnostics and molecular pathways in prostate cancer. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21: 5667. doi:10.3390/ijms21165667

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu doświadczeń i opracowaniu manuskryptu.

5. **Porzycki P.**, Ciskowicz E. Modern biomarkers in prostate cancer diagnosis. Central European Journal of Urology, 2020; 73: 1-7.

doi: 10.5173/ceju.2020.0067

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, analizie literatury i przygotowaniu manuskryptu.

6. **Porzycki P.** Potencjalne kliniczne zastosowanie cząsteczek miRNA w diagnostyce raka prostaty. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (przyjęta do druku).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, analizie literatury i przygotowaniu manuskryptu.

3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Moje osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.) stanowi monotematyczny cykl 6 prac dotyczących oceny przydatności nowych biomarkerów, a w szczególności cząstek mikroRNA, w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego, opublikowanych w czasopismach krajowych i zagranicznych o łącznym współczynniku oddziaływania IF wynoszącym 13,872 i punktacji MNiSW 450 pkt.

Głównym moim osiągnięciem jest wykazanie, że zastosowanie różnych biomarkerów diagnostycznych, takich jak:

- multiparametryczny rezonans magnetyczny mpMRI (radiological biomarkers),**
- test genetyczny SelectMDx (genetic biomarkers),**
- cząstki mikroRNA (molecular biomarkers),**

umożliwia uzyskanie większej skuteczności procesu diagnostycznego polegającego na kwalifikowaniu chorych do biopsji gruczołu krokowego.

Zastosowanie nowych ocenianych parametrów zawartych w protokole PIRADS v.2.1 w mpMRI znacząco wpływa na podjęcie decyzji o konieczności wykonania biopsji gruczołu krokowego, a ponadto pozwala na precyzyjne określenie miejsca, z którego należy pobrać wycinki.

Prace z testem genetycznym SelectMDx (MDxHealth) potwierdziły zasadność jego wykonywania, zwłaszcza w sytuacjach diagnostycznie wątpliwych (z podwyższonym stężeniem PSA (> 4 ng / ml), nieprawidłowym badaniu per-rectum lub ewentualnie z rodzinnym wywiadem dotyczącym raka gruczołu krokowego), w celu podjęcia decyzji o wykonaniu biopsji gruczołu krokowego lub o jej niewykonywaniu.

Zastosowanie obecnie niektórych, wybranych cząstek mikroRNA w nowoczesnej diagnostyce molekularnej stanowi innowacyjny trend w procesie diagnostycznym nowotworów, w tym raka gruczołu krokowego. Oznacza to dla pacjenta możliwość uniknięcia inwazyjnych metod diagnostycznych wraz z ich ryzykiem powikłań, a także uzyskanie narzędzia dla lekarza do określenia spersonalizowanej terapii.

Przeprowadzone badania miały charakter prospektywny i dotyczyły pacjentów z jednego ośrodka urologicznego, którzy kierowani byli w celu wykonania pierwotnej lub kolejnej biopsji gruczołu krokowego w trakcie diagnostyki raka gruczołu krokowego. Pacjentów poddano analizie wykorzystując dane: antygen swoisty dla prostaty (PSA) i jego pochodne, nieprawidłowy wynik badania per-rectum, wywiad rodzinny w kierunku raka gruczołu krokowego oraz skalę Gleasona (na podstawie biopsji gruczołu krokowego), a także dane demograficzne.

Wszystkie badania (na podstawie uchwały Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej) zostały przeprowadzone z zachowaniem pełnej poufności – bez ujawniania danych osobowych osób poddawanych eksperymentowi. Pacjenci są objęci ubezpieczeniem wynikającym z hospitalizacji. Przeprowadzenie badań nie było związane z jakimkolwiek ryzykiem dla pacjenta. Pacjenci mają prawo zażądać przerwania badań w dowolnym ich momencie. Pacjenci otrzymają wszelkie dodatkowe informacje i wyjaśnienia, o które poproszą. Udział pacjentów w badaniu możliwy był dopiero po podpisaniu świadomej zgody na badanie.

4. Rak gruczołu krokowego

4.1. Epidemiologia

Rak gruczołu krokowego (prostaty, stercza) (PCa - prostate cancer) jest schorzeniem, którego znaczenie, ze względu na wzrastającą wykrywalność,

a także na wydłużenie życia mężczyzn ogromnie wzrosło. W Europie Zachodniej i Stanach Zjednoczonych zajmuje pierwsze miejsce pod względem zachorowalności na nowotwory w populacji mężczyzn. W Polsce odnotowujemy podobne trendy epidemiologiczne. Rak gruczołu krokowego stanowi 15,5% wszystkich nowo rozpoznanych nowotworów u mężczyzn w Polsce, co daje mu drugie miejsce po raku płuca.

Ryzyko zachorowania na ten nowotwór w Stanach Zjednoczonych oceniono na 16,72%, a ryzyko śmierci na 2,57%. Wzrost wykrywalności, znacząco odnotowywany jest od lat dziewięćdziesiątych XX wieku. Powszechnie tłumaczy się to wzrostem świadomości zdrowotnej pacjentów, wydłużeniem życia mężczyzn oraz rozpowszechnieniem oznaczania stężenia swoistego antygenu sterczowego - PSA (prostate specific antigen) w surowicy krwi, a co za tym idzie większą rozpoznawalność tego nowotworu. Rak gruczołu krokowego najczęściej rozpoznawany jest u mężczyzn w starszym wieku. Średni wiek chorego w momencie rozpoznania to 68 lat. Rzadko stwierdza się go u mężczyzn poniżej 50 roku życia i takie przypadki stanowią 2% w grupie chorych na raka gruczołu krokowego.

4.2. Klasyfikacja raka gruczołu krokowego

Celem stosowania klasyfikacji nowotworów jest możliwość porównywania przebiegu schorzenia w podobnych grupach pacjentów, projektowania przebiegu badań klinicznych w relatywnie homogennych populacjach pacjentów, porównania klinicznych i patologicznych danych pochodzących z różnych szpitali, oraz powstania rekomendacji dotyczących postępowania z pacjentami.

Stopień zaawansowania choroby określa się według klasyfikacji TNM (tumor/nodus/metastases – guz, węzeł chłonny, przerzut) - w wersji z 2017 roku¹.

¹ Mottet N, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on prostate cancer. Eur Ass Urol. 2020; 1-182.
<http://uroweb.org/guidelines/compilations-of-all-guidelines/>

4.3. Klasyfikacja histopatologiczna raka gruczołu krokowego

Nowotwory gruczołu krokowego klasyfikowane według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), obejmują:

1 - raki:

- gruczolakorak – konwencjonalny, groniasty (*acinar adenocarcinoma*) - stanowią 75-98% wszystkich rozpoznań,
- zanikowy,
- rzekomorozrostowy,
- piankowatokomórkowy,
- śluzowokomórkowy,
- onkocytarny,

2 - mięsakoraki,

3 - nowotwory urotelialne,

4 - rak przewodowy,

5 - rak płaskonabłonkowy,

6 - nowotwory mesenchymalne,

7 - nowotwory podścieliskowe stercza,

8 - nowotwory z tkanki limfatycznej i krwiotwórczej,

9 - guzy przerzutowe.

4.4. Określenie stopnia złośliwości raka gruczołu krokowego

Obecnie do określenia złośliwości raka gruczołu krokowego powszechnie używa się systemu Gleasona, który oparty jest na ocenie cytoarchitektoniki i niejednorodności gruczołów. Ostatnia modyfikacja systemu z 2005 dokonana przez International Society of Urological Pathology (ISUP) jest aktualnie obowiązująca. Według systemu przyznaje się punkty od 3 do 5 (5 to najmniej zróżnicowane) dwóm obrazom – komórkom raka, które zajmują największą powierzchnię preparatu, oraz komórkom, które zajmują drugą pod względem wielkości powierzchnię, lub komórkom o największej złośliwości. Suma

punktów tych dwóch obrazów, zwana sumą Gleasona (Gleason score – GS) określa właśnie stopień złośliwości guza.

W 2014 r. International Society of Urological Pathology zaproponowało nowy podział na stopnie złośliwości (grade) raka gruczołu krokowego¹.

Z kolei Europejskie Towarzystwo Urologiczne (EAU) w swoich zaleceniach (guidelines) propaguje stosowanie klasyfikacji grup ryzyka¹. Klasyfikacja ta grupuje pacjentów pod kątem oceny ryzyka wznowy biochemicznej po leczeniu radykalnym – prostatektomii lub radykalnej radioterapii (EBRT).

4.5. Rak istotny klinicznie / nieistotny klinicznie

Pojęcie istotności klinicznej raka gruczołu krokowego powstało w oparciu o wyniki badań wskazujących na znikome ryzyko progresji PCa o niedużym zaangażowaniu i małej objętości oraz złośliwości. Mimo odstąpienia od leczenia radykalnego, PCa o wspomnianych cechach charakteryzuje się wyjątkowo powolnym przebiegiem i małym ryzykiem progresji. Jego rozpoznanie może narazić chorego na przykre następstwa niepotrzebnie podjętego leczenia. W takim przypadku mówi się o nadwykrywalności, a PCa o "łagodnym" klinicznie przebiegu nazywa się **rakiem nieistotnym klinicznie** (nsPCa – nonsignificant prostate cancer). Mężczyźni umierają z **rakiem nsPCa, a nie z powodu raka**.

Przeciwnie do opisanego powyżej, PCa o dużym ryzyku progresji nazywany jest **rakiem istotnym klinicznie** (csPCa – clinical significant prostate cancer) i wymaga leczenia. Najczęściej za istotny klinicznie rak gruczołu krokowego uznaje się nowotwór:

- o złośliwości większej niż 6 punktów w skali Gleasona, Gleason score ≥ 7 (włączając 3+4)¹,
- o objętości zmiany ogniskowej większej niż 0,5 ml,
- naciekający tkanki okołosterczowe, (extraprostatic extension – EPE),

- z obecnością przerzutów.

4.6. Rozpoznawanie raka gruczołu krokowego - stan obecny

Rozpoznanie raka gruczołu krokowego ustala się na podstawie wielomiejscowej biopsji rdzeniowej gruczołu krokowego wykonywanej pod kontrolą ultrasonografii przezodbytniczej (TRUS, transrectal ultrasonography). Zasadniczymi wskazaniami do wykonania biopsji są:

- nieprawidłowości w badaniu gruczołu krokowego palcem przez odbytnicę (DRE - digital rectal examination),
- podwyższone stężenie PSA w surowicy,
- nieprawidłowości w badaniu TRUS.

Ograniczenia badania DRE

Nieprawidłowości stwierdzone w badaniu DRE są klasycznym, niezależnym wskazaniem do biopsji stercza. Badanie gruczołu krokowego palcem przez odbytnicę umożliwia ocenę tylko około 20% powierzchni gruczołu od jego tylnej strony. Ocenia się, że blisko 18% wykrytych nowotworów cechuje się nieprawidłowym badaniem DRE, niezależnie od badania PSA. Ograniczone zaufanie do tego badania wynika z lokalizacji guza (guz może być wykryty jeśli jego objętość przekracza 0,2 ml oraz jeśli jest zlokalizowany w strefie obwodowej, tylnej), a także znacznym stopniem subiektywności badania. Samo badanie DRE charakteryzuje się niską czułością i swoistością ocenianą poniżej 60% w wykrywaniu raka gruczołu krokowego. Ponadto, stopień miejscowego zaawansowania guza, określony w DRE, w przeważającej wielkości przypadków bywa niższy od rzeczywistego stadium zaawansowania.

Ograniczenia badania PSA

Test PSA jest specyficzny dla narządu (gruczoł krokowy), a nie dla nowotworu (raka gruczołu krokowego). Podwyższenie stężenia PSA może się wiązać z różnymi chorobami gruczołu krokowego, w tym z niezłośliwymi

takimi jak różne stany zapalne lub łagodny rozrost tego gruczołu. Już nawet ustalenie zakresu prawidłowych wartości referencyjnych jest dyskusyjne w literaturze urologicznej. PSA ma niską pozytywną wartość predykcyjną (30 - 35%) oraz wykazuje niską swoistość. Niska swoistość PSA powoduje konieczność wykonywania niepotrzebnych biopsji i diagnozuje raki nieistotne klinicznie (overdiagnosis), które nie zagrażają życiu pacjenta. W celu wzbogacenia użyteczności testu PSA, stosuje się dodatkowe metody, pochodne, takie jak:

- odniesienie PSA do objętości gruczołu krokowego – (PSAD, PSA density),
- odniesienie tempa wzrostu PSA do czasu – (PSAV, PSA velocity),
- odniesienie PSA do wieku chorego – (A-PSA, age-specific PSA),
- określenie stosunku frakcji wolnej PSA (F-PSA, free PSA) do stężenia całkowitego PSA (T-PSA, total PSA) wyrażone w postaci ilorazu F/T PSA,
- czas podwojenia PSA – (PSA-DT, PSA doubling time) – parametr stosowany głównie w ocenie wyników leczenia i obserwacji po zakończeniu terapii, jego rola w wykrywaniu raka gruczołu krokowego jest ograniczona.

Biopsja gruczołu krokowego jest uważana za zabieg inwazyjny obarczony możliwymi powikłaniami, takimi jak krwawienie, zatrzymanie moczu, zakażenie, a nawet posocznica. Ponadto radykalne leczenie nieistotnej klinicznie choroby może narazić pacjentów na istotne powikłania bez korzyści w zakresie przeżycia specyficznego dla raka.

Dlatego istnieje **pilna potrzeba stosowania nowych, nieinwazyjnych markerów nowotworowych umożliwiających (i) wczesne wykrycie agresywnych nowotworów**, szczególnie gdy poziom PSA jest poniżej wartości referencyjnej wynoszącej 4 ng / ml; (ii) unikanie niepotrzebnych biopsji u mężczyzn z wysokim PSA z powodu łagodnego rozrostu gruczołu krokowego

(BPH); oraz (iii) identyfikacja pacjentów będących pod aktywnym nadzorem, u których występuje rak o niskim stopniu zaawansowania, nieistotny klinicznie.

Nowoczesne biomarkery w diagnostyce raka gruczołu krokowego

Nowoczesne biomarkery stosowane w diagnostyce PCa w większości wykrywane są w moczu [5 - pkt. 2, 11]. Przykładem jest test ExoDx™ (Intelliscore, MA, USA), który wykorzystuje egzosomalny RNA, a stosowany jest w celu zmniejszania wykonywania niepotrzebnych biopsji. Test TMPRSS2:ERG jest również oparty o biomarkery moczu, które wydają się wskazywać na agresywność raka po biopsji.

Test SelectMDx jest podobnie oparty na izolacji biomarkera mRNA w moczu. Obecność poziomów mRNA genów HOXC6 i DLX1 ocenia się w celu oszacowania ryzyka zarówno obecności PCa podczas biopsji, jak i obecności raka wysokiego ryzyka. W użyciu są niektóre biomarkery molekularne, takie jak gen 3 raka gruczołu krokowego (PCA3, prostate cancer antygen 3) wykryty w moczu i oparty na długich, niekodujących RNA tkanki PCa, który jest obecnie uwzględniony w wytycznych EAU jako czynnik w podejmowaniu decyzji o konieczności wykonania biopsji gruczołu krokowego. Istnieją pewne testy mierzące panel kalikrein w surowicy lub osoczu, które są obecnie dostępne komercyjnie, w tym test wskaźnika zdrowia prostaty (PHI), (łączy wolny i całkowity PSA i izoformę [-2] pro - PSA [p2PSA]), oraz cztery wyniki oceny kalikreiny (4KScore) (pomiar wolnego, nienaruszonego i całkowitego PSA i peptydazy 2 podobnej do kalikreiny [hK2]) oprócz wieku, DRE i wcześniejszego statusu biopsji. Testy te zostały opracowane w celu zmniejszenia liczby wykonywanych niepotrzebnych biopsji gruczołu krokowego u mężczyzn z podwyższonym poziomem PSA.

Istnieje również wysoki odsetek biomarkerów używanych w tkankach, takich jak OncotypeDx genomic prostate score® (Genomic health, CA, USA), Prolaris® (Myriad Genetics Inc., UT, USA) i ProMark® (Metamark, MA, USA); wszystkie używane do monitorowania agresywności guza. Decipher ®

(GenomeDx, Vancouver, Kanada) jest również wykrywany w próbce tkanki, ale głównie koncentruje się na monitorowaniu przebiegu leczenia po operacji gruczołu krokowego.

Potencjalne kliniczne zastosowanie mikroRNA jako biomarkerów w diagnostyce raka gruczołu krokowego

Przegląd literatury [6 - pkt. 2, 11] w odniesieniu do zastosowania cząstek miRNA jako biomarkerów w diagnostyce raka gruczołu krokowego wykazuje, że w dobie „płynnych biopsji” miRNA są idealnymi "kandydatami" do tego celu, szczególnie ze względu na ich udowodnioną stabilność w płynach ustrojowych. miRNA jest małą niekodującą cząsteczką RNA, która działa w wyciszaniu mRNA i regulacji transkrypcyjnej ekspresji genów. miRNA odgrywają kluczową rolę w patogenezie PCa poprzez regulację ekspresji genów zaangażowanych w główne etapy rakotwórczości. Związane z nowotworem miRNA uczestniczą w komunikacji międzykomórkowej i rozprzestrzeniają się przez płyn pozakomórkowy (egzosomy), aby dotrzeć do fenotypu odległych celów i wpłynąć na nie. Ostatnie badania wykazały, że większość ludzkich miRNA znajduje się w obszarach genomu, zwanych kruchymi miejscami, które są związane z rakiem. Ekspresja miRNA koreluje z różnymi nowotworami i uważa się, że geny te działają zarówno jako supresory nowotworów, jak i onkogeny. Wskazuje to, że miRNA mogą odgrywać kluczową rolę w rozwoju i progresji choroby nowotworowej.

Z tych wszystkich powodów badacze skoncentrowali się na analizie profili ekspresji miRNA i zaproponowali cząsteczki miRNA jako możliwe biomarkery dla wielu chorób, w tym raka gruczołu krokowego. Otworzy to drogę do spersonalizowanej strategii terapeutycznej u pacjentów z PCa. miRNA są małymi (długości 18–22 nukleotydów) endogennymi jednoniciowymi niekodującymi RNA. Cząsteczki te regulują ekspresję ponad 60% ludzkich genów. Negatywnie regulują swoje cele, głównie odpowiednie mRNA na jeden z dwóch sposobów, w zależności od stopnia komplementarności miRNA i celu.

Ich mechanizm regulacji w dół opiera się na niecałkowitym komplementarnym wiązaniu z docelowymi regionami nie ulegającymi translacji 3' mRNA 3' (3'UTR). W ten sposób miRNA represjonują swój cel - ekspresję genu po transkrypcji na poziomie translacji. Po drugie, miRNA, które wiążą się z doskonałą lub prawie całkowitą komplementarnością z sekwencjami mRNA kodującymi białko, indukują rozszczepianie i degradację docelowych mRNA. Ponieważ regulują one ekspresję określonych genów docelowych, w tym genów supresorowych nowotworów i onkogenów, ich nieprawidłowa ilość i funkcja bierze udział w zmianie szeregu procesów molekularnych w tkankach, prowadząc do złożoności i heterogeniczności nowotworów. W 2007 r. Porkka i in. powiązali szczególny profil ekspresji miRNA z PCa. Od tego czasu w latach 2007–2008 rozpoczęto kilka badań nad PCa w celu identyfikacji profili miRNA o zdolnościach diagnostycznych, prognostycznych i predykcyjnych.

Badania izolacji i charakterystyki miRNA opierają się na próbkach tkanek lub płynach ustrojowych, ponieważ miRNA są wyjątkowo stabilne w surowicy, osoczu i moczu, co czyni je szczególnie atrakcyjnymi w przypadku testów nieinwazyjnych. W płynach ustrojowych miRNA są chronione przed degradacją enzymatyczną poprzez ich połączenie z białkiem Argonaute2 i lipoproteina o wysokiej gęstości (HDL); ale także poprzez ich włączenie do pęcherzyków pozakomórkowych (EV - extravesicle) miRNA odgrywają kluczową rolę w patogenezie PCa poprzez regulację ekspresji genów biorących udział w szlaku sygnałowym receptora androgenowego (AR - androgen receptor), cyklu komórkowym, apoptozie, procesie EMT (epithelial-mesenchymal transision), w kontroli macierzystości w CSCs (cancer stem cells) i wreszcie w powstawaniu przerzutów odległych. miRNA są atrakcyjnymi celami w badaniach przesiewowych, diagnozowaniu, prognozowaniu, monitorowaniu rozwoju nowotworu i pomaganiu w identyfikacji właściwego leczenia pacjentów.

Przegląd fachowego piśmiennictwa z ostatnich kilku lat zwraca uwagę na wzrost zapotrzebowania, w temacie diagnostyki raka gruczołu krokowego, na

bardziej precyzyjny dobór pacjentów do dostępnej agresywnej diagnostyki (biopsja stercza), określany jako stratyfikacja pacjentów.

Poszukuje się nowych, nieinwazyjnych biomarkerów (markery molekularne i genetyczne) do diagnostyki i prognozowania raka gruczołu krokowego. Dokonuje się również próby przystosowania już znanych narzędzi diagnostycznych takich jak badanie MRI (utworzenie nowego protokołu badania PIRADS v.2.0 lub już istniejąca jego aktualizacja v.2.1). W ostatnim czasie w diagnostyce z użyciem MRI doszło do wielu usprawnień technologicznych związanych z oceną fizjologii badanych tkanek. Doprowadziło to do powstania wieloparametrycznego rezonansu magnetycznego (mpMRI - multiparametric magnetic resonance imaging) stercza. Do kluczowych, w diagnostyce raka gruczołu krokowego, sekwencji należą:

- obrazy T2-zależne, (T2 weighted – T2W),
- obrazy zależne od dyfuzji, (diffusion-weighted imaging – DWI + apparent diffusion coefficient - ADC),
- obrazy dynamiczne ze wzmocnieniem kontrastowym (DCE- dynamic contrast enhanced), - służą ocenie neoangiogenezy po podaniu dożylnie środka kontrastowego – gadoliny,
- spektroskopia rezonansu magnetycznego, (magnetic resonance spectroscopic imaging – MRSI).

Kolejną próbą dokładniejszej diagnostyki jest tworzenie kalkulatorów ryzyka (risk calculators), które oceniają prawdopodobieństwo wystąpienia raka gruczołu krokowego przy zastosowaniu naraz kilku, zazwyczaj różnych danych klinicznych (stężenie PSA, GS z biopsji rdzeniowej, odsetek raka w rdzeniach, liczba zajętych rdzeni przez raka itp.). Aktualnie dostępnych jest on-line kilka kalkulatorów ryzyka, takich jak:

- PCPTRC 2.0 - <https://myprostatecancerrisk.com/>,
- ERSPC - <https://www.prostatecancer-riskcalculator.com/seven-prostate-cancer-risk-calculators>

- Canadian risk calculator: - <https://sunnybrook.ca/content/?page=asure-calc>

W kontekście napływających nowych danych klinicznych dokonywane są również zmiany w corocznie publikowanych rekomendacjach (guidelines) towarzystw naukowych np. Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (EAU), Amerykańskiego Towarzystwa Urologicznego (AUA), czy National Comprehensive Cancer Network (NCCN).

5. Omówienie publikacji wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej

Celem pracy nr 1 [1 - pkt. 2, 11] była analiza krążących mikroRNA w surowicy jako nieinwazyjnych biomarkerów u pacjentów z rozpoznanym rakiem gruczołu krokowego i dla porównania u osób zdrowych. To wstępne badanie objęło populację 62 pacjentów w średnim wieku 68,6 lat i średnim PSA 21,3 ng / ml. Jako kontrolę wykorzystano ośmiu zdrowych pacjentów. miRNA oznaczono ilościowo w całkowitej frakcji RNA wyekstrahowanej z surowicy i oznaczano poziomy pięciu mikroRNA (miR-106b, miR-141, miR-21, mir-34a i miR-375) ilościowo za pomocą RT-qPCR. Dobór rodzajów miRNA dokonano na podstawie danych z analizy literatury. W analizach oceniano korelację między danymi kliniczno-patologicznymi a poziomami ekspresji miRNA. Względne współczynniki ekspresji miR-106b, miR-141-3p, miR-21 i miR-375 były istotnie zwiększone (odpowiednio 1,8-, 1,9-, 2,4 i 2,6-krotnie) w grupie z rozpoznanym rakiem gruczołu krokowego w porównaniu ze zdrowymi pacjentami. Najwyższy obszar pod krzywą ROC (Receiver Operating Characteristic) równy 0,906 uzyskano dla miR-357, co wskazuje na bardzo dobre właściwości diagnostyczne tego biomarkera. Znaleziono poziom ekspresji mir-34a niezwiązany z rakiem. **Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze literaturowe dane dotyczące możliwości odróżnienia pacjentów z rakiem gruczołu krokowego od osób zdrowych przez oznaczanie odpowiednich miRNA (miR-141-3p, miR-21 i miR-375).**

W pracy nr 2 czterdziestu pacjentów poddano analizie wykorzystując ich dane: antygen swoisty dla prostaty, wyniki badania mpMRI i skalę Gleasona (na podstawie biopsji gruczołu krokowego), u ośmiu pacjentów (20%) zdiagnozowano raka. Badanie mpMRI wykonywano, aby ułatwić podjęcie decyzji o ewentualnej konieczności wykonania biopsji gruczołu krokowego.

Współczynnik Spearmana został wykorzystany do oceny zależności między badanymi cechami. Oceniono wydajność diagnostyczną jako pomiar obszaru pod krzywą (AUC - area under curve) analizy charakterystyki krzywych ROC. Dokładność diagnostyczną, czułość i swoistość określono przy użyciu najlepszego punktu odcięcia na każdej krzywej ROC. W całej badanej grupie 55% chorych zostało poddanych biopsji pierwotnej, a u 45% pacjentów wykonano powtórny biopsję gruczołu krokowego, u których istniało podejrzenie nowotworu. Czterdzieści podejrzanych zmian na obrazach MRI zidentyfikowano za pomocą PI-RADS 1 - 5%, PI-RADS 2 - 17.5%, PI-RADS 3 - 32.5%, PI-RADS 4 - 27.5% i PI-RADS 5 - 17.5%. Najwyższą korelację zaobserwowano dla wyników mpMRI i wyniku Gleasona ze współczynnikiem Spearmana równym 0,41 (95% CI: 0,104-0,646). **Analiza ROC (Receiver Operating Characteristic) wykazała, że mpMRI rozróżnia kierowanie pacjentów do biopsji gruczołu krokowego lub aktywnego nadzoru z AUC = 0,771 (0,117, 95% CI: 0,542-1,001).**

Tematem pracy nr 3 był wpływ zastosowania testu SelectMDx na proces diagnostyczny raka gruczołu krokowego. Test ten jest oparty na izolacji biomarkera mRNA z moczu. Obecność poziomów mRNA genów HOXC6 i DLX1 ocenia się w celu oszacowania ryzyka zarówno obecności raka gruczołu krokowego podczas biopsji, jak i obecności raka wysokiego ryzyka (Gleason score ≥ 7).

Wykonane biopsje gruczołu krokowego u pacjentów z dodatnim wynikiem testu SelectMDx potwierdziły rozpoznanie raka gruczołu krokowego oraz wartość Gleason score ≥ 7 . Pacjenci ci zostali objęci

leczeniem radykalnym. Pacjenci z ujemnym wynikiem testu (low risk) uniknęli wykonania natychmiastowej biopsji gruczołu krokowego i są poddani dalszej rutynowej obserwacji i nadzorowi.

Celem pracy nr 4 była ocena możliwości wykorzystania cząstek miRNA do stratyfikacji pacjentów z rakiem gruczołu krokowego i łagodnym jego rozrostem (BPH). Dziewięć cząstek miRNA (-21, -27b, -93, -141, -205, -221, -182, -375 i let-7a) o największej zgłaszanej mocy różnicowania na podstawie piśmiennictwa, zastosowano w badaniach porównawczych próbek surowicy i tkanki prostaty. Zastosowano korelację Spearmana i analizę krzywych ROC, aby ocenić zdolność miRNA obecnych w surowicy do rozróżnienia pacjentów z PCa i BPH.

Niniejsze badanie jasno pokazuje, że **miR-93 i miR-375 mogą być brane pod uwagę jako pojedyncze nieinwazyjne cząsteczki krwi w celu odróżnienia pacjentów z PCa od pacjentów z BPH.** Wskazujemy, że te dwa miRNA mają sześć wspólnych, powiązanych z PCa, genów docelowych (CCND2, MAP3K2, MXI1, PAFAH1B1, YOD1, ZFYVE26), które mają wspólną funkcję molekularną wiązania białek (termin GO: 0005515). Opisano również wysoką wartość diagnostyczną nowego miR-182 pochodzącego z surowicy (AUC = 0,881, 95% przedział ufności, CI = 0,816–0,946, $p < 0,0001$, czułość i swoistość odpowiednio 85% i 79%).

Praca nr 5 jest pracą przeglądową, w której opisano obecnie rekomendowane metody diagnostyki raka gruczołu krokowego, a także innych testów i biomarkerów mających zastosowanie do badań przesiewowych. W tym celu dokonano **analizy publikacji naukowych, przeglądu wytycznych a także ocen ekspertów.** W pracy tej omówione są najnowsze metody zalecane w diagnostyce PCa takie jak: PSA (antygen swoisty dla prostaty), test PHI, 4Kscore oraz nowe technologie diagnostyczne m.in. testy Progensis, SelectMDx, OncotypeDx oraz ExoDx Prostate IntelliScore.

Biorąc pod uwagę heterogeny charakter PCa, jeden test diagnostyczny nie odpowie na wszystkie pytania, więc zastosowanie kilku metod diagnostycznych pozwoli lekarzom udzielić pacjentom lepszej, spersonalizowanej oceny klinicznej na różnym etapie zaawansowania choroby nowotworowej.

Praca nr 6 stanowi podsumowanie aktualnej wiedzy dotyczącej roli cząstek miRNA w diagnostyce raka gruczołu krokowego. miRNA stanowią klasę małych o długości około 22 nukleotydów, niekodujących cząsteczek RNA, które biorą udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji licznych genów. W niniejszym przeglądzie opisano znaczenie miRNA w szlaku sygnałowym receptora androgenowego (AR signaling), w cyklu komórkowym, w procesie przejścia nabłonkowo - mezenchymalnego (EMT), w transformacji rakowych komórek macierzystych (CSC), a także rolę miRNA jako narzędzia terapeutycznego PCa. Najbardziej obiecującą grupą są markery molekularne, wśród których dużą nadzieję wiąże się z wykorzystaniem pozakomórkowych cząstek mikroRNA. Znalezienie lepszych biomarkerów PCa, na bazie miRNA, zastępujących obecny pomiar PSA, jest bardzo potrzebne w nowoczesnej praktyce onkologicznej.

6. Przebieg pracy naukowej

Po ukończeniu studiów w Akademii Medycznej w Łodzi (Wydział Lekarski) w 1994r., uczestniczyłem w kursie j. angielskiego w National Louis University, Chicago, w latach 1994-1995 i odbyłem staż w Department of Surgery, Ealing Hospital, London, w 1999r.

Z chwilą rozpoczęcia pracy w Oddziale Urologii głównym obszarem moich zainteresowań były nowotwory urologiczne oraz nowoczesna diagnostyka raka gruczołu krokowego, w szczególności, w zakresie wiedzy prezentowanej przez czołowe ośrodki zagraniczne. Kolejne lata pracy to

zbieranie doświadczenia i nabywania umiejętności w zakresie moich zainteresowań. W roku 2017, dzięki moim staraniom, Komisja Bioetyczna OIL wydała uchwałę, która pozytywnie zaopiniowała projekt badania pt.: *"Ocena przydatności mikroRNA jako biomarkera w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego"*. Jednocześnie zostałem wyznaczony na koordynatora tych badań. Po czym, rozpocząłem współpracę z prof. M. Tyrką i dr. E. Ciszkowicz z Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej na podstawie umowy o współpracy Szpitala Miejskiego w Rzeszowie z Politechniką Rzeszowską w ramach realizacji prac badawczych z zakresu:

1. Wykrywanie raka gruczołu krokowego przez zastosowanie wieloparametrycznego rezonansu magnetycznego.
2. Badania nad mikroRNA jako potencjalnego narzędzia diagnostycznego w rozpoznaniu raka gruczołu krokowego.
3. Badanie tkanek - analiza korelacji niektórych cząsteczek mikroRNA znalezionych w surowicy i tkance raka gruczołu krokowego.

Efekty tych prac zostały opublikowane i stanowią podstawę rozprawy doktorskiej.

7. Wykaz publikacji nie wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej

- [1] Porzycki P., Tereszkievicz J. Analysis of the construction of crystalline urinary stones with infrared spectroscopy. *Urologia Polska*, 2002/55/3.
- [2] Porzycki P. Practical pointers for EBU examination candidates. *Przegląd Urologiczny*, 2003/2 (18), 25.
- [3] Porzycki P., Ossoliński T., Selwa A. 1st Symposium of the European Society for Urological Oncology. Vienna, January, 16-17, 2004. *Przegląd Urologiczny*, 2004/1 (23), 68-70.
- [4] Porzycki P. Optimization of pharmacological treatment of Benign prostatic hyperplasia (BPH). *Biuletyn OIL w Rzeszowie*, 2 (123); 28-30; February 2006.

- [5] Porzycki P., Kuźniar H. Where are we, where are we headed? da Vinci Surgical System. Biuletyn OIL w Rzeszowie nr 3 (138); 29-30; May 2007.
- [6] Porzycki P. Doctors for Doctors (Lekarze lekarzom). Biuletyn OIL w Rzeszowie nr 4 (146); 4; July - August 2008.
- [7] Porzycki P., Szczygieł S., Tereszkievicz J. Acute epididymitis. Przegląd Urologiczny, 2008/4 (50), 40-43.
- [8] Porzycki P. Selected aspects assessing the quality of urological care. 6.2009, Dissertation concluding postgraduate studies at the University of Information Technology and Management in Rzeszów, faculty of Healthcare Management, “Zarządzanie w służbie zdrowia” – IV edycja – 2008/2009.
- [9] Porzycki P. MicroRNA as non-invasive biomarkers in the diagnosis, forecasting and therapy of prostate cancer. Przegląd Urologiczny, 2017/6 (106), 30-33.
- [10] Porzycki P. Electronic medical documentation (e-documentation). Przegląd Urologiczny, 2018/2 (108), 48-51.

8. Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje **16 prac** publikowanych w polskich i zagranicznych czasopismach, w tym:

- a) w piśmiennictwie posiadającym impact factor - **6**,
- b) w czasopismach bez impact factor - **10**.

Summary IF moich publikacji wynosi **13,872** i osiąga wartość **450** punktów w punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Liczba cytowań wynosi 29 (bez autocytowań).

Jestem **pierwszym autorem 5 prac naukowych** o łącznym **IF 9,316** osiągających wartość **350** punktów w punktacji MNiSW.

9. Streszczenie rozprawy doktorskiej

Pracę doktorską stanowi zbiór 6 artykułów opublikowanych w czasopiśmie posiadających wskaźnik IF. Jestem autorem i współautorem tych artykułów, które powstały dzięki moim staraniom i inicjatywie w oparciu o uchwałę Komisji Bioetycznej OIL, która pozytywnie zaopiniowała projekt badania pt.: "Ocena przydatności mikroRNA jako biomarkera w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego". Jednocześnie zostałem wyznaczony na koordynatora tych badań.

Rak gruczołu krokowego jest schorzeniem, którego znaczenie, ze względu na wzrastającą wykrywalność, a także na wydłużenie życia mężczyzn ogromnie wzrosło.

Aktualne metody diagnostyczne nie są precyzyjne zarówno w zakresie samego rozpoznania nowotworu, jak i określenia jego charakterystyk tj stopnia złośliwości i stopnia zaawansowania. Ma to zasadniczy wpływ na dalsze postępowanie z pacjentem, zwłaszcza dotyczącym sposobów leczenia.

Dlatego istnieje pilna potrzeba opracowania nowych, nieinwazyjnych markerów nowotworowych umożliwiających wczesne wykrycie agresywnych nowotworów.

Głównym osiągnięciem pracy jest wykazanie, że zastosowanie różnych biomarkerów diagnostycznych, takich jak:

- multiparametrycznego rezonansu magnetycznego (radiological biomarkers),
- test genetyczny SelectMDx (genetic biomarkers),
- cząstki mikroRNA (molecular biomarkers),

umożliwia uzyskanie większej skuteczności procesu diagnostycznego polegającego na kwalifikowaniu chorych do biopsji gruczołu krokowego.

Celem pracy nr 1 [1 - pkt. 2, 11] była analiza krążących mikroRNA w surowicy jako nieinwazyjnych biomarkerów u pacjentów z rozpoznanym rakiem gruczołu krokowego w porównaniu u osób zdrowych. To wstępne badanie objęło populację 62 pacjentów w średnim wieku 68,6 lat i średnim PSA

21,3 ng / ml. Jako kontrolę wykorzystano ośmiu zdrowych mężczyzn. miRNA oznaczono ilościowo w całkowitej frakcji RNA wyekstrahowanej z surowicy, określając poziomy pięciu mikroRNA (miR-106b, miR-141, miR-21, mir-34a i miR-375) ilościowo za pomocą RT-qPCR. Dobór rodzajów miRNA dokonano na podstawie danych z analizy literatury. W analizach oceniano korelację między danymi kliniczno-patologicznymi a poziomami ekspresji miRNA. Względne współczynniki ekspresji miR-106b, miR-141-3p, miR-21 i miR-375 były istotnie zwiększone (odpowiednio 1,8- 1,9-, 2,4 i 2,6-krotnie) w grupie z rozpoznany rakiem gruczołu krokowego w porównaniu ze zdrowymi osobami. Najwyższy obszar pod krzywą ROC równy 0,906 uzyskano dla miR-357, co wskazuje na bardzo dobre właściwości diagnostyczne tego biomarkera. Znalezione poziom ekspresji mir-34a niezwiązany z rakiem. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze literaturowe dane dotyczące możliwości odróżnienia pacjentów z rakiem gruczołu krokowego od osób zdrowych przez oznaczanie odpowiednich miRNA (miR-141-3p, miR-21 i miR-375).

W pracy nr 2 czterdziestu pacjentów poddano analizie wykorzystując ich dane: antygen swoisty dla prostaty, wyniki badania mpMRI i skalę Gleasona (na podstawie biopsji stercza), u ośmiu pacjentów (20%) zdiagnozowano raka. Badanie mpMRI wykonywano już na samym początku ścieżki diagnostycznej, aby ocenić podjęcie decyzji o ewentualnej konieczności wykonania biopsji gruczołu krokowego.

Współczynnik Spearmana został wykorzystany do oceny zależności między badanymi cechami. Oceniono wydajność diagnostyczną jako pomiar obszaru pod krzywą (AUC) analizy charakterystyki krzywych ROC. W całej badanej grupie 55% chorych zostało poddanych biopsji pierwotnej, a u 45% pacjentów wykonano powtórny biopsję gruczołu krokowego, u których istniało podejrzenie raka stercza. Czterdzieści podejrzanych zmian na obrazach MRI zidentyfikowano za pomocą PI-RADS 1 - 5%, PI-RADS 2 - 17.5%, PI-RADS 3 - 32.5%, PI-RADS 4 - 27.5% i PI-RADS 5 - 17.5%. Najwyższą korelację

zaobserwowano dla wyników mpMRI i wyniku Gleasona ze współczynnikiem Spearmana równym 0,41 (95% CI: 0,104-0,646). Analiza ROC wykazała, że mpMRI rozróżnia kierowanie pacjentów do biopsji prostaty lub aktywnego nadzoru z AUC = 0,771 (0,117, 95% CI: 0,542-1,001).

Tematem pracy nr 3 był wpływ zastosowania testu genetycznego SelectMDX na proces diagnostyczny raka gruczołu krokowego. Test ten jest oparty na izolacji biomarkera mRNA w moczu. Obecność poziomów mRNA genów HOXC6 i DLX1 ocenia się w celu oszacowania ryzyka zarówno obecności raka gruczołu krokowego podczas biopsji, jak i obecności raka wysokiego ryzyka (Gleason score ≥ 7). Wykonane biopsje gruczołu krokowego u pacjentów z dodatnim wynikiem testu SelectMDx potwierdziły rozpoznanie raka gruczołu krokowego oraz wartość Gleason score ≥ 7 . Pacjenci ci zostali objęci leczeniem radykalnym. Pacjenci z ujemnym wynikiem testu (low risk) uniknęli wykonania natychmiastowej biopsji gruczołu krokowego i są poddani dalszej rutynowej obserwacji i nadzorowi.

Celem pracy nr 4 była ocena możliwości wykorzystania cząstek miRNA do stratyfikacji pacjentów z rakiem gruczołu krokowego i łagodnym jego rozrostem (BPH). Dziewięć cząstek miRNA (-21, -27b, -93, -141, -205, -221, -182, -375 i let-7a) o największej zgłaszanej mocy różnicowania na podstawie piśmiennictwa, zastosowano w badaniach porównawczych próbek surowicy i tkanki gruczołu krokowego. Zastosowano korelację Spearmana i analizę krzywych ROC, aby ocenić zdolność miRNA obecnych w surowicy do rozróżnienia pacjentów z PCa i BPH. Niniejsze badanie jasno pokazuje, że miR-93 i miR-375 mogą być brane pod uwagę jako pojedyncze nieinwazyjne cząsteczki krwi w celu odróżnienia pacjentów z PCa od pacjentów z BPH. Wskazujemy, że te dwa miRNA mają sześć wspólnych, powiązanych z PCa, genów docelowych (CCND2, MAP3K2, MXI1, PAFAH1B1, YOD1, ZFYVE26), które mają wspólną funkcję molekularną wiązania białek (termin GO: 0005515). Opisano również wysoką wartość diagnostyczną nowego miR-

182 pochodzącego z surowicy ($AUC = 0,881$, 95% przedział ufności, $CI = 0,816-0,946$, $p < 0,0001$, czułość i swoistość odpowiednio 85% i 79%).

Praca nr 5 jest pracą przeglądową, w której opisano obecnie rekomendowane metody diagnostyki raka gruczołu krokowego, a także innych testów i biomarkerów mających zastosowanie do badań przesiewowych. W tym celu dokonano analizy publikacji naukowych, przeglądu wytycznych Towarzystw Naukowych, a także ocen ekspertów. W pracy tej omówione są najnowsze metody zalecane w diagnostyce PCa takie jak: PSA (antygen swoisty dla prostaty), test PHI, 4Kscore oraz nowe technologie diagnostyczne m.in. testy ProgenSA, SelectMDx, OncotypeDx oraz ExoDx Prostate IntelliScore.

Praca nr 6 stanowi podsumowanie aktualnej wiedzy dotyczącej roli cząstek miRNA w diagnostyce raka gruczołu krokowego. miRNA stanowią klasę małych o długości około 22 nukleotydów, niekodujących cząsteczek RNA, które biorą udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji licznych genów. W niniejszym przeglądzie opisano znaczenie miRNA w szlaku sygnałowym receptora androgenowego (AR signaling), w cyklu komórkowym, w procesie przejścia nabłonkowo - mezenchymalnego (EMT), w transformacji rakowych komórek macierzystych (CSC), a także rolę miRNA jako narzędzia terapeutycznego PCa. Najbardziej obiecującą grupą są markery molekularne, wśród których dużą nadzieję wiąże się z wykorzystaniem pozakomórkowych cząstek mikroRNA. Znalezienie lepszych biomarkerów PCa, na bazie miRNA, zastępujących obecny pomiar PSA, jest bardzo potrzebne w nowoczesnej praktyce onkologicznej.

Wnioski wynikające z realizacji rozprawy doktorskiej

W przeprowadzonych badaniach najwyższą korelację zaobserwowano dla wyników mpMRI i wyniku Gleasona ze współczynnikiem Spearmana równym 0,41 (95% CI: 0,104-0,646). Analiza ROC wykazała, że mpMRI rozróżnia kierowanie pacjentów do biopsji gruczołu krokowego lub aktywnego nadzoru z $AUC = 0,771$ (0,117, 95% CI: 0,542-1,001). W ogólnym ujęciu

przeprowadzone badania potwierdzają dane literaturowe o korzystnym wprowadzeniu mpMRI przed biopsją do współczesnej ścieżki diagnostycznej PCa. Ponadto poprawia się wydajność biopsji przezodbytniczej poprzez zwiększenie wykrywalności raka gruczołu krokowego w trakcie biopsji celowanej danymi z mpMRI. Zastosowanie mpMRI pozwoliło również uniknąć biopsji wśród pacjentów bez csPCa. Uzyskane wyniki i wnioski są podobne jak prezentowane w międzynarodowym badaniu PRECISION, które udowodniło wyraźną korzyść z wykonania mpMRI już na samym początku ścieżki diagnostycznej u pacjentów z podejrzeniem raka gruczołu krokowego.

Wykonane biopsje stercza u pacjentów z dodatnim wynikiem testu SelectMDx potwierdziły rozpoznanie raka gruczołu krokowego z wynikiem Gleason score ≥ 7 . Pacjenci ci zostali objęci leczeniem radykalnym. Z kolei, pacjenci z ujemnym wynikiem testu (low risk) uniknęli wykonania natychmiastowej biopsji stercza i są poddani dalszej rutynowej obserwacji i nadzorowi.

Z kolei w analizach nad molekułami miRNA oceniano korelację między danymi kliniczno-patologicznymi a poziomami ekspresji wybranych miRNA. Względne współczynniki ekspresji miR-106b, miR-141-3p, miR-21 i miR-375 były istotnie zwiększone (odpowiednio 1,8-, 1,9-, 2,4 i 2,6-krotnie) w grupie z PCa w porównaniu ze zdrowymi, kontrolnymi osobami. Najwyższy obszar pod krzywą ROC równy 0,906 uzyskano dla miR-375 co wskazuje na bardzo dobre właściwości diagnostyczne tego biomarkera. Wyniki prac potwierdzają wcześniejsze ustalenia dotyczące możliwości odróżnienia pacjentów z rakiem gruczołu krokowego od osób zdrowych przez oznaczanie odpowiednich miRNA (miR-141-3p, miR-21 i miR-375).

W podsumowaniu należy stwierdzić, że z uwagi na heterogeniczny charakter raka gruczołu krokowego, jeden test diagnostyczny nie odpowie na wszystkie pytania i dlatego zastosowanie wielu metod diagnostycznych pozwoli na lepsze – spersonalizowane doradztwo kliniczne dla pacjenta.

10. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim

The doctoral dissertation comprises 6 articles published in impact factor (IF) journals. The presented works, which I am the author and co-author, were created thanks to my efforts and initiative based on the resolution of the OIL Bioethics Committee, which positively assessed the research project entitled: "Assessment of the usefulness of microRNA as a biomarker in diagnostics and prognosis in patients with prostate cancer". At the same time, I was appointed the coordinator of these studies.

The significance of prostate cancer, both in terms of enhanced detection and life extension, has increased dramatically.

The current diagnostic methods are imprecise both in respect of diagnosing the cancer itself and determining its nature, i.e. malignance and stage. This has a material bearing on further course of action with the patient, particularly concerning treatment methods.

Therefore, we are in urgent need of developing new, non-invasive cancer markers enabling early detection of aggressive cancers.

The primary achievement of the dissertation is having demonstrated that application of various diagnostic biomarkers, such as:

- multiparametric magnetic resonance imaging (mpMRI) (radiological biomarkers),
- SelectMDx genetic test (genetic biomarkers),
- microRNA (miRNA) molecules (molecular biomarkers),

has enhanced the efficiency of the diagnostic process consisting in qualifying patients for prostate biopsy.

The objective of study no. 1 (as listed) was to analyze serum miRNAs as non-invasive biomarkers in patients diagnosed with prostate cancer and to compare it to that of healthy individuals. This preliminary study included a cohort of 62 patients aged, on average, 68.6 with the average PSA of 21.3 ng/ml. Eight healthy men constituted the control group. The miRNA level was

determined quantitatively from the total RNA fraction extracted from serum, marking five miRNA levels (miR-106b, miR-141, miR-21, miR-34a and miR-375) quantitatively using RT-qPCR. The miRNA types were selected based on the data from the writings analyzed. In the analyses, the correlation between clinical and pathological data and the miRNA expression levels was assessed. The relative expression coefficients of miR-106b, miR-141-3p, miR-21 and miR-375 were significantly increased (1.8- 1.9-, 2.4 and 2.6-times, respectively) within the group diagnosed with prostate cancer in comparison with the healthy control group. The highest area under the receiver operating characteristics curve (ROC), that of 0.906, was obtained for miR-357, which indicates excellent diagnostic properties of this biomarker. An expression level of miR-34a, unrelated to cancer, was identified. The scores corroborate earlier data found in the writings, pertaining to potentially identifying prostate cancer patients from among healthy populations by marking appropriate miRNAs (miR-141-3p, miR-21 and miR-375).

Study no. 2 analyzed 40 patients using the following data: prostate specific antigen (PSA), mpMRI test results and Gleason score (based on prostate biopsy) - 8 of the patients (20%) were diagnosed with cancer. The mpMRI was conducted at the very beginning of the diagnostic path in order to ascertain whether prostate biopsy may be potentially required.

The Spearman coefficient was used to assess the correlations between the characteristics at hand. The diagnostic efficacy was assessed as the area under the curve (AUC) of the ROC curve characteristics analysis. Within the entire cohort, 55% of the patients underwent a primary biopsy, while 45% of them - suspected of prostate cancer - had a repeat prostate biopsy. Forty alarming lesions were identified on MRI images using PI-RADS 1 - 5%, PI-RADS 2 - 17.5%, PI-RADS 3 - 32.5%, PI-RADS 4 - 27.5% and PI-RADS 5 - 17.5%. The highest correlation was observed for the mpMRI results and the Gleason score with the Spearman coefficient of 0.41 (95% CI: 0.104-0.646). It follows from

the ROC analysis that mpMRI differentiates between referring patients for prostate biopsy or active supervision with AUC = 0.771 (0.117, 95% CI: 0.542-1.001).

The subject matter of study no. 3 was the bearing the SelectMDX genetic test may have on the prostate cancer diagnostic process. The test is based on isolating the mRNA biomarker in urine. The presence of certain HOXC6 and DLX1 genes mRNA levels is ascertained in order to estimate the risk of both: prostate cancer during biopsy and high-risk prostate cancer (Gleason score ≥ 7). The prostate biopsies in patients with positive SelectMDx test results confirmed the prostate cancer diagnosis and Gleason score ≥ 7 . These patients were subject to radical treatment. The patients with negative test results (low risk) avoided undergoing prostate biopsy forthwith and are under further routine observation and supervision.

The objective of study no. 4 was to assess the possibility of using miRNA molecules to stratify prostate cancer and benign prostatic hyperplasia (BPH) patients. Nine miRNA molecules (-21, -27b, -93, -141, -205, -221, -182, -375 and let-7a) with the highest differentiating potential reported in the writings were used in comparative studies of serum samples and prostate tissue. The Spearman correlation coefficient and the ROC analysis were applied in order to ascertain the capacity of serum miRNA to differentiate PCa and BPH patients. This study clearly shows that miR-93 and miR-375 may be considered as single, non-invasive blood molecules in order to differentiate between PCa and BPH patients. We indicate that two miRNAs have six common target genes correlated with PCa (CCND2, MAP3K2, MXI1, PAFAH1B1, YOD1, ZFYVE26), which have a common molecular function of binding proteins (gene ontology (GO) term: 0005515). High diagnostic value of new serum miR-182 was also described (AUC = 0.881, 95% confidence interval, CI = 0.816-0.946, $p < 0.0001$, sensitivity and specificity 85% and 79% respectively).

Study no. 5 is an overview describing the currently recommended prostate cancer diagnostic methods, as well as other tests and biomarkers applied in screening tests. To that end, scholarly publications were analyzed, Scientific Associations' guidelines and expert assessments were reviewed. The study discusses the latest methods recommended for PCa diagnostics, such as: PSA (prostate specific antigen), PHI test, 4Kscore test and other new diagnostic technologies, among them Progenisa, SelectMDx, OncotypeDx and ExoDx Prostate IntelliScore tests.

Study no. 6 summarizes the current body of knowledge about the role of miRNA molecules in prostate cancer diagnostics. They are a class of small, approximately 22 nucleotide-long, non-coding RNA molecules which participate in post-transcription expression regulation of a number of genes. This review describes the significance of miRNA in androgen receptor signalling (AR), cell cycle, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), cancer stem cells (CSC) transformation, as well as its role as a prostate cancer therapeutic tool. The most promising group are the molecular markers, among which much is expected of the use of extracellular miRNA molecules. Modern oncological practice is very much in need of identifying better, miRNA-based, PCa biomarkers replacing current PSA measurements.

Doctoral dissertation findings and conclusions

In the course of the studies conducted, the highest correlation was observed for the mpMRI results and the Gleason score with the Spearman coefficient of 0.41 (95% CI: 0.104-0.646). It follows from the ROC analysis that mpMRI differentiates between referring patients for prostate biopsy or active supervision with AUC = 0.771 (0.117, 95% CI: 0.542-1.001). In general terms, the studies conducted corroborate data presented in the writings and pertaining to successful application of mpMRI - prior to biopsy - to the modern PCa diagnostic path. Further, efficiency of per rectum biopsy is increasing due to enhanced detection

of prostate cancer during mpMRI data guided biopsy. Owing to mpMRI, non-csPCa patients managed to avoid undergoing biopsy. The results and conclusions obtained are similar to those presented in the international PRECISION study, which showed the benefits of mpMRI at the very beginning of the diagnostic path in patients potentially suffering from prostate cancer.

Prostate biopsies in patients with positive SelectMDx test results confirmed the prostate cancer diagnosis and Gleason score ≥ 7 . These patients were subject to radical treatment. The patients with negative test results (low risk), in turn, avoided undergoing prostate biopsy forthwith and are under further routine observation and supervision.

In the analyses of miRNA molecules, the correlation between clinical and pathological data and the selected miRNA expression levels was assessed. The relative expression coefficients of miR-106b, miR-141-3p, miR-21 and miR-375 were significantly increased (1.8-, 1.9-, 2.4 and 2.6-times, respectively) within the PCa patients group in comparison with the control group of healthy individuals. The highest area under the receiver operating characteristics curve (ROC), that of 0.906, was obtained for miR-375, which indicates excellent diagnostic properties of this biomarker. The studies findings corroborate earlier determinations, pertaining to potentially identifying prostate cancer patients from among healthy populations by marking appropriate miRNA (miR-141-3p, miR-21 and miR-375).

Summarizing, one ought to propose that due to the heterogeneous nature of prostate cancer, one diagnostic test will not answer all of the questions posed, therefore applying several diagnostic methods will enable physicians to better personalize clinical counsel for patients.

11. Wykaz publikacji z zakresu rozprawy doktorskiej

WYKAZ PUBLIKACJI	IF	MNiSW
[1] Porzycki P. , Ciszkowicz E., Semik M., Tyrka M. Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. International Urology and Nephrology . 2018; 50: 1619-1626. Int Urol Nephrol. 2018; 50: 1619-1626. doi.org/10.1007/s11255-018-1938-2	1.650	70
	28 cytowań	
[2] Porzycki P. , Ciszkowicz E. Detection of individual prostate cancer via multiparametric magnetic resonance imaging in own material – initial experience. Journal of Contemporary Brachytherapy . 2019, 11, 6: 1-6. J Contemp Brachytherapy. 2019; 11, 6: 1-6 doi.org/10.5114/jcb.2019.90085	1.627	70
	1 cytowanie	
[3] Porzycki P. , Ciszkowicz E. Initial experience with SelectMDx test in patients considered for prostate biopsy (abstract). European Urology Supplements . 2019; 18(2): e2316. doi.org/10.1016/S1569-9056(19)32020-2	3.613	100
[4] Ciszkowicz E., Porzycki P. , Semik M., Kaznowska E., Tyrka M. MiR-93/miR-375: diagnostic potential, aggressiveness correlation and common target genes in prostate cancer. International Journal of Molecular Sciences . 2020; 21(16): 5667. Int J Mol Sci. 2020; 21(16): 5667. doi:10.3390/ijms21165667 Wydrukowano również w Int J Mol Sci. Special Issue "MicroRNA as Biomarkers in Cancer Diagnostics and Therapeutics (II)"	4.556	100
[5] Porzycki P. , Ciszkowicz E. Modern biomarkers in prostate cancer diagnosis. Central European Journal of Urology , 2020; 73 Cent European J Urol. 2020; 73. doi: 10.5173/cej.2020.0067	1,320	70
[6] Porzycki P. Potencjalne kliniczne zastosowanie cząsteczek miRNA w diagnostyce raka prostaty. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. (przyjęta do druku)	1.106	40
Razem IF	13,872	
Razem MNiSW	450 pkt	
Razem cytowań	29 cytowań	

12. Oświadczenia współautorów

dr Ewa Ciszkowicz
Politechnika Rzeszowska
Wydział Chemiczny
Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki

Rzeszów, 18.01.2021r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji: Porzycki P., Ciszkowicz E., Semik M., Tyrka M. *Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. International Urology and Nephrology. 2018; 50: 1619-1626.doi.org/10.1007/s11255-018-1938-2,*

mój udział polegał na wyborze metodologii badań, analizie wyników i sformułowaniu wniosków oraz współprzygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że zostałam poinformowana o wykorzystaniu tej pracy do potrzeb otwarcia przewodu doktorskiego lek. Pawła Porzyckiego pt. *Ocena przydatności nowych biomarkerów, a w szczególności mikroRNA w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego.*



.....
Podpis

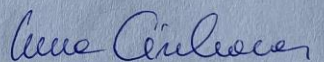
dr Ewa Ciszkowicz
Politechnika Rzeszowska
Wydział Chemiczny
Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki

Rzeszów, 18.01.2021r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji: Porzycki P., Ciszkowicz E. Detection of individual prostate cancer via multiparametric magnetic resonance imaging in own material – initial experience. *Journal of Contemporary Brachytherapy*. 2019, 11(6):1-6. doi.org/10.5114/jcb.2019.90085, mój udział polegał na opracowaniu danych medycznych, sformułowaniu wniosków oraz współprzygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że zostałam poinformowana o wykorzystaniu tej pracy do potrzeb otwarcia przewodu doktorskiego lek. Pawła Porzyckiego pt. *Ocena przydatności nowych biomarkerów, a w szczególności mikroRNA w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego*.



.....
Podpis

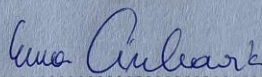
dr Ewa Ciszkowicz
Politechnika Rzeszowska
Wydział Chemiczny
Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki

Rzeszów, 18.01.2021r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji: Porzycki P., Ciszkowicz E. *Initial experience with SelectMDx test in patients considered for prostate biopsy (abstract). European Urology Supplements. 2019; 18(2):e2316. doi.org/10.1016/S1569-9056(19)32020-2*,
mój udział polegał na wyborze metodologii badań, analizie wyników i sformułowaniu wniosków oraz współprzygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że zostałam poinformowana o wykorzystaniu tej pracy do potrzeb otwarcia przewodu doktorskiego lek. Pawła Porzyckiego pt. *Ocena przydatności nowych biomarkerów, a w szczególności mikroRNA w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego*.



.....
Podpis

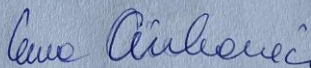
dr Ewa Ciszkowicz
Politechnika Rzeszowska
Wydział Chemiczny
Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki

Rzeszów, 18.01.2021r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji: Ciszkowicz E., Porzycki P., Semik M., Kaznowska E., Tyrka M. Mir-93/miR-141/miR-375: diagnostics and molecular pathways in prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(16):5667. doi:10.3390/ijms21165667, mój udział polegał na wyborze metodologii badań, analizie wyników eksperymentalnych, opracowaniu narzędzi bioinformatycznych, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że zostałam poinformowana o wykorzystaniu tej pracy do potrzeb otwarcia przewodu doktorskiego lek. Pawła Porzyckiego pt. *Ocena przydatności nowych biomarkerów, a w szczególności mikroRNA w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego*.



.....
Podpis

dr Ewa Ciskowicz
Politechnika Rzeszowska
Wydział Chemiczny
Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki

Rzeszów, 18.01.2021r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji: Porzycki P., Ciskowicz E. Modern biomarkers in prostate cancer diagnosis. *Central European Journal of Urology*, 2020; 73(3):300-306. doi:10.5173/cej.2020.0067, mój udział polegał na analizie literatur oraz współprzygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że zostałam poinformowana o wykorzystaniu tej pracy do potrzeb otwarcia przewodu doktorskiego lek. Pawła Porzyckiego pt. *Ocena przydatności nowych biomarkerów, a w szczególności mikroRNA w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego*.



.....
Podpis

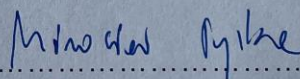
Prof. dr hab. inż. Mirosław Tyrka
Politechnika Rzeszowska
Wydział Chemiczny
Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki

Rzeszów, 18.01.2021r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji: Ciszkowicz E., Porzycki P., Semik M., Kaznowska E., Tyrka M. Mir-93/miR-141/miR-375: diagnostics and molecular pathways in prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(16):5667. doi:10.3390/ijms21165667, mój udział polegał na koordynacji zadań oraz recenzji przygotowanego manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że zostałam poinformowana o wykorzystaniu tej pracy do potrzeb otwarcia przewodu doktorskiego lek. Pawła Porzyckiego pt. *Ocena przydatności nowych biomarkerów, a w szczególności mikroRNA w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego*.



.....
Podpis

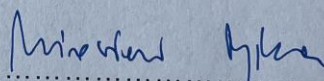
Prof. dr hab. inż. Mirosław Tyrka
Politechnika Rzeszowska
Wydział Chemiczny
Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki

Rzeszów, 18.01.2021r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji: Porzycki P., Ciszkowicz E., Semik M., Tyrka M. Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. *International Urology and Nephrology*. 2018; 50:1619-1626. doi.org/10.1007/s11255-018-1938-2, mój udział polegał na koordynacji zadań oraz recenzji przygotowanego manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że zostałam poinformowana o wykorzystaniu tej pracy do potrzeb otwarcia przewodu doktorskiego lek. Pawła Porzyckiego pt. *Ocena przydatności nowych biomarkerów, a w szczególności mikroRNA w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego*.



.....
Podpis

mgr Małgorzata Semik
Politechnika Rzeszowska
Wydział Chemiczny
Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki

Rzeszów, 18.01.2021r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji: Ciszkowicz E., Porzycki P., Semik M., Kaznowska E., Tyrka M. Mir-93/miR-141/miR-375: diagnostics and molecular pathways in prostate cancer. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21(16):5667.doi:10.3390/ijms21165667, mój udział polegał na przeprowadzeniu badań.

Jednocześnie oświadczam, że zostałam poinformowana o wykorzystaniu tej pracy do potrzeb otwarcia przewodu doktorskiego lek. Pawła Porzyckiego pt. *Ocena przydatności nowych biomarkerów, a w szczególności mikroRNA w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego.*

.....Małgorzata Semik.....
Podpis

mgr Małgorzata Semik
Politechnika Rzeszowska
Wydział Chemiczny
Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki

Rzeszów, 18.01.2021r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji: Porzycki P., Ciszkowicz E., Semik M., Tyrka M. *Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. International Urology and Nephrology. 2018; 50:1619-1626. doi.org/10.1007/s11255-018-1938-2,* mój udział polegał na przeprowadzeniu badań.

Jednocześnie oświadczam, że zostałam poinformowana o wykorzystaniu tej pracy do potrzeb otwarcia przewodu doktorskiego lek. Pawła Porzyckiego pt. *Ocena przydatności nowych biomarkerów, a w szczególności mikroRNA w diagnostyce i prognozowaniu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego.*

.....
Małgorzata Semik
Podpis