



UNIwersytet Medyczny w Lublinie

Zakład Genetyki Klinicznej

ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin

tel./fax. 81 448 61 10; email: janusz.kocki@umlub.pl

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki

Lublin, dnia 13. 01. 2023 r.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „Ocena zmiany poziomu ekspresji wybranych genów uczestniczących w kancerogenezie oraz regulujących ich miRNA w powiązaniu z czynnikami zakaźnymi u pacjentów z rakiem żołądka”

mgr Magdaleny Dzikowicz

z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

W odpowiedzi na prośbę Pani prof. dr hab. n. med. Agnieszki Piastowskiej-Ciesielskiej, Prodziekan ds. Nauki Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, przedstawiam recenzję rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Dzikowicz.

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotora rozprawy Pani dr hab. n. med. Doroty Pastuszek-Lewandoskiej w Zakładzie Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej, Katedry Biologii i Mikrobiologii Medycznej, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Rozprawa doktorska jest napisana poprawnie w języku polskim i jest przedstawiona w formie wydruku komputerowego oraz pliku PDF na płycie CD. Rozprawa liczy 122 strony, jest podzielona na następujące rozdziały - typowe dla tego rodzaju opracowań: *Streszczenie* i *słowa kluczowe* str. 4 - 7, *Streszczenie w języku angielskim* str. 8 - 11, *Wstęp* str. 12 - 28, *Cele pracy* str. 29 - 30, *Hipoteza badawcza* str. 31, *Material* str. 32 - 35, *Metody* str. 36 - 50, *Wyniki* str. 51 - 83, *Wnioski* str. 84, *Dyskusja* str. 85 - 105, *Spis piśmiennictwa* str. 106 - 118, *Spis tabel, rycin i fotografii* str. 119 - 122.

Podjęty przez Doktorantkę temat rozprawy doktorskiej jest bardzo ważny klinicznie w rozwijającej się stale dziedzinie genetyki klinicznej nowotworów w Polsce i na świecie. Jest to również ważny temat społeczny w związku ze stosunkowo częstym rakiem żołądka w populacji polskiej. Rak żołądka jest nowotworem o poważnym rokowaniu. Ma podłoże wieloczynnikowe. Jest często diagnozowany zbyt późno co wpływa na efekty terapii i rokowanie. W tym kontekście, na podkreślenie zasługuje odważne podjęcie tematu rozprawy doktorskiej, a co najważniejsze, zaplanowanie realizacji badań wg najwyższych standardów badań naukowych i klinicznych.

We wstępie Doktorantka szeroko opisała definicję, klasyfikację, epidemiologię i przegląd czynników etiologicznych raka żołądka. Przedstawiła udział czynników patogenetycznych: *Helicobacter pylori* i wirusa Epsteina Barr w raku żołądka, opisała szeroko udział genów kodujących *PTEN*, *SMOX* i genów miRNA oraz czynników prozapalnych i katelicydyny w tej chorobie. We wstępie autorka umieściła trzy rysunki – warto byłoby pod rysunkami 2 i 3 podać ich źródła (są one wymienione w tekście), tak jak przy rysunku 1. Na pokreślenie zasługuje szczegółowa wiedza Doktorantki w zakresie przedstawionych czynników patogenetycznych raka żołądka. Wstęp doskonale podsumowuje aktualny stan wiedzy i bardzo dobrze wprowadzające czytelnika w metodykę badawczą.

Przy przygotowywaniu publikacji do druku, należy zastosować aktualną nomenklaturę nazw genów: gen *LL37* - **CAMP** (*Cathelicidin Antimicrobial Peptide*), gen TNF ALPHA – **TNF**, gen kodujący interferon gamma – **IFNG**, gen MicroRNA 21 - **MIR21** a gen MicroRNA 200a - **MIR200A**. Należy podkreślić, że nazwy genów podlegają modyfikacjom i mają wiele nazw historycznych a w publikacjach stosowane są zmienne nazwy tych samych genów. Dla genów niekodujących, w tym mikroRNA, stosuje się różne dodatkowe określenia m. in. 5p czy 3p w zależności od sekwencji dominującej, hsa oznaczające gatunek i inne.

Doktorantka postawiła sobie bardzo ambitne cele - cel główny: „znaczenie wybranych zaburzeń genetycznych i epigenetycznych w karcynogenezie raka żołądka, z uwzględnieniem obecności czynników zakaźnych (*Helicobacter pylori*, wirus Epsteina-Barr), w kontekście poszukiwania biomarkerów o znaczeniu diagnostycznym i/lub prognostycznym” oraz sześć celów szczegółowych.

Dzięki dobrze zaplanowanym procedurom badawczym, Doktorantka przeprowadziła wiele badań, które uzyskały akceptację komisji bioetycznej.

Materiałem badawczym były wycinki tkanki żołądka (po całkowitej resekcji z powodu raka żołądka) od 32 pacjentów (grupa badana): z guza pierwotnego (próbka oznaczona „A”, ok. 150-200 mg) oraz dwie próbki tkanki niezmięnionej makroskopowo, pobranej w odległości 3 cm od zmiany pierwotnej (próbka „B”, ok. 150-200 mg) i z przeciwległej do guza pierwotnego ściany żołądka (próbka „C”, ok. 150-200 mg). Dodatkowo, od każdego pacjenta przed operacją została pobrana krew (2 x 4 ml) do jałowych probówek bez antykoagulantów, w celu uzyskania surowicy.

Pacjenci byli leczeni w latach 2018-2020 w II Onkologicznym Oddziale Chirurgii – Klinika Chirurgii Onkologicznej, Wojewódzkiego Wielospecjalistycznego Centrum Onkologii i Traumatologii im. M. Kopernika w Łodzi oraz w Klinice Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Centralnego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Grupę kontrolną stanowiło 31 osób leczonych w Regionalnym Ośrodku Menopauzy i Osteoporozy (Łódź), bez zdiagnozowanych chorób nowotworowych, od których w trakcie rutynowej wizyty u lekarza pobrano krew (4 ml) do jałowych probówek bez antykoagulantów, w celu pozyskania surowicy. Należy podkreślić właściwy dobór grupy badanej i kontrolnej oraz właściwe zabezpieczenie materiału do dalszych badań.

Doktorantka zastosowała w rozprawie doktorskiej liczne metody analiz molekularnych: izolację DNA i RNA, izolację RNA z egzosomów, reakcję odwrotnej transkrypcji, qPCR, analizę niestabilności mikrosatelitarnej i utraty homozygotyczności, analiz immunologicznych: immunofluorescencji pośredniej i ELISA oraz analiz mikroskopowych.

Startery i sondy zostały zaprogramowane i zsyntetyzowane przez Środowiskową Pracownię Sekwencjonowania i Syntezy DNA IBB PAN. Analizowano geny kodujące: *GAPDH*, *PTEN*, *SMOX*, *LL37 (CAMP)*, *IL2*, *TNF* i *IFNG*. Do analizy ekspresji mikroRNA zaplanowano sondy dla sekwencji dominujących: hsa-miR-21-5p i hsa-miR-200a-3p – co przedstawiono w tabeli na str. 43.

Wyniki badań zostały opracowane wg obowiązujących metod statystycznych z użyciem oprogramowania Statistica v. 13.1. Stwierdzam, że projekt rozprawy doktorskiej został właściwie zaplanowany a właściwy dobór metod badawczych pozwolił na bardzo dobrą realizację założeń pracy. Świadczy też o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki przez Promotora do prowadzenia badań naukowych na bardzo wysokim poziomie.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka bardzo dobrze udokumentowała wyniki swoich badań w sposób przystępny dla czytelnika. Wyniki badań są bogato ilustrowane licznymi fotografiami, wykresami i tabelami. Szczególnie podkreślam otrzymana wysoką jakość wyników w obszarach badań ekspresji genów oraz niestabilności mikrosatelitarnej. Bardzo wysoko oceniam oryginalność planu badań, oryginalność zastosowanych metod badawczych i trud pracy włożony w ich wykonanie.

Szczegółowy, wieloetapowy i skomplikowany plan pracy oraz jego doskonałe wykonanie umożliwiło ostateczne sformułowanie wniosków. Stwierdzam, że wszystkie założenia badań zostały w pełni wykonane.

Uważam również, że przedstawiona dyskusja wyników badań w kontekście doniesień literaturowych jest wysokim osiągnięciem Doktorantki. Należy podkreślić stosunkowo niewielką liczbę publikacji w bazie *PubMed* szczególnie na temat powiązań raka żołądka z genami *PTEN* i *SMOX* oraz badanymi mikroRNA.

Doktorantka przedstawiła spis piśmiennictwa. Publikacje są dobrze dobrane w kontekście tematyki pracy.

Autorka nie uniknęła kilku drobnych błędów edytorskich jak np. niezręczne określenie „napędza (...) transformację” (str. 5) – powinno być powoduje transformację, „zlokalizowany na chromosomie” (str. 20, str. 22 i in.) - powinno być w chromosomie, komórki T i B (str. 23) – powinno być limfocyty T i B. Przedstawione powyżej moje uwagi, jako recenzenta, nie zmniejszają w żaden sposób wartości pracy a mogą być uwzględnione przy przygotowywaniu pracy do druku. .

W podsumowaniu podkreślam, że Doktorantka zrealizowała badania zgodnie z wytyczonymi celami, z zastosowaniem właściwych metod badawczych, a uzyskane wyniki poprawnie zinterpretowała na podstawie wykonanych analiz i danych literaturowych.

Rozprawa jest znaczącym osiągnięciem Doktorantki i Jej Promotora i ponadstandardowo spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w stosownej *Ustawie* (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) została przygotowywana pod opieką promotora i stanowi oryginalne rozwiązanie przez Autorkę problemu naukowego. Doktorantka wykazała dużą,

ogólną wiedzę teoretyczną w określonej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań, staranność i dbałość w przygotowaniu manuskryptu rozprawy oraz potencjalne znaczenie dla przyszłych praktycznych aplikacji klinicznych, rozprawę oceniam pozytywnie i bardzo wysoko, stawiając wniosek do Wysokiej Rady nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Magdaleny Dzikowicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie biologia medyczna.

Biorąc pod uwagę powyższe podsumowanie, zgłaszam również wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Dzikowicz pt. „Ocena zmiany poziomu ekspresji wybranych genów uczestniczących w kancerogenezie oraz regulujących ich miRNA w powiązaniu z czynnikami zakaźnymi u pacjentów z rakiem żołądka”.



Janusz Kocki

Prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki