



Olsztyn, dnia 9 stycznia 2023 roku

Dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. uczelni
Katedra Mikrobiologii i Mykologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 1A
10-719 Olsztyn

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Dzikowiec
pt. „Ocena zmiany poziomu ekspresji wybranych genów uczestniczących
w kancerogenezie oraz regulujących ich miRNA w powiązaniu z czynnikami
zakaźnymi u pacjentów z rakiem żołądka”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Dzikowiec pt. „Ocena zmiany poziomu ekspresji wybranych genów uczestniczących w kancerogenezie oraz regulujących ich miRNA w powiązaniu z czynnikami zakaźnymi u pacjentów z rakiem żołądka” została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod opieką naukową Pani dr hab. n. med. Doroty Pastuszek-Lewandoskiej. Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo z dnia 17 listopada 2022 roku Pani prof. dr hab. n. med. Agnieszki Piastowskiej-Ciesielskiej, Prodziekan ds. Nauki Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

1. Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska liczy 122 strony. Składa się z 10 rozdziałów typowych dla prac o charakterze eksperymentalnym: Streszczenia (w języku polskim oraz angielskim), Wstępu, Celu pracy, Hipotez badawczych, Materiałów, Metod, Wyników, Wniosków, Dyskusji, Piśmiennictwa oraz Spisu tabel, rycin i fotografii. Literatura wykorzystana do przygotowania dysertacji jest ściśle związana z tematyką rozprawy i obejmuje pozycje opublikowane głównie w ostatnich latach. Przegląd literatury uważam za wartościowy

i powinien zostać przetłumaczony na język angielski i opublikowany w jednym z renomowanych czasopism międzynarodowych. W moim odczuciu brakuje wykazu zastosowanych skrótów co znacznie ułatwiłoby czytanie przygotowanej monografii.

Rozprawa doktorska przygotowana przez Panią mgr Magdalenę Dzikowiec ma charakter doświadczalny, a jej tematyka wpisuje się w dziedzinę nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinę nauki medyczne.

2. Ocena zasadności wyboru tematu rozprawy doktorskiej

Pani mgr Magdalena Dzikowiec podjęła się trudnej tematyki związanej z wyjaśnieniem znaczenia wybranych zaburzeń genetycznych i epigenetycznych w kancerogenezie żołądka. Dodatkowo, Doktorantka zbadała wpływ obecności dwóch czynników zakaźnych (*Helicobacter pylori* oraz wirusa Epsteina-Barr) w rozwoju raka żołądka.

Pod względem liczby zgonów w 2020 roku rak żołądka znalazł się na czwartym miejscu, po raku płuc, okrężnicy i wątroby. Pomimo odnotowywanego spadku zachorowalności i śmiertelności w wielu krajach, rak ten nadal stanowi problem diagnostyczny i leczniczy. Wysoka śmiertelność związana jest z jego wykryciem w późnych stadium zaawansowania. Wczesną diagnostykę utrudnia brak charakterystycznych objawów na wczesnym etapie rozwoju choroby, często mylonych, z tymi które występują w zapaleniu błony śluzowej żołądka, chorobie wrzodowej i refluksowej. Dlatego też coraz więcej uwagi poświęca się badaniom polimorfizmu genetycznego gospodarza jako nowego biomarkera molekularnego o wartości predykcyjnej. Powszechnie wiadomo, że rak żołądka związany jest z czynnikami genetycznymi. W związku z powyższym został sklasyfikowany na cztery odrębne molekularnie podtypy: genomowo stabilny, z niestabilnością chromosomalną, z niestabilnością mikrosatelitarną oraz związany z obecnością wirusa Epsteina-Barr. Ponadto, liczne prace badawcze wskazują na udział czynników zakaźnych w powstawaniu nowotworów. Proces nowotworzenia może być następstwem infekcji wywołanych przez *Helicobacter pylori* czy też wirus Epstein-Barr. Tematyka przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest więc związana z niezwykle ważnym zagadnieniem poszukiwania biomarkerów o znaczeniu diagnostycznym i/lub prognostycznym w raku żołądka.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że wybór tematu przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest uzasadniony i aktualny. Postawiony cel naukowy odpowiada poziomowi jakim powinna odznaczać się rozprawa doktorska.

3. Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Tytuł przedłożonej rozprawy doktorskiej sformułowany przez Doktorantkę odzwierciedla zakres prowadzonych przez nią prac badawczych.

Streszczenia, w języku polskim oraz angielskim, zostały przygotowane rzetelnie i starannie. Przekazują czytelnikowi w sposób syntetyczny opis podjętych zagadnień badawczych, otrzymanych wyników oraz wniosków końcowych.

We wstępie Pani mgr Magdalena Dzikowiec w sposób przekonujący uzasadniła celowość podjęcia tematyki badawczej. W rozdziale tym zawarła opis związany z patogenezą raka żołądka, ponadto opisała związek dwóch badanych czynników zakaźnych, wybranych genów i miRNA z procesami kancerogenezy u pacjentów z rakiem żołądka. Jednakże, w mojej opinii, w bardzo oszczędny sposób opisała dotychczasowy stan wiedzy z zakresu problematyki dysertacji, co budzi mój niedosyt. Autorka mogła podjąć się bardziej wnikliwej analizy dostępnej literatury naukowej, pozwalając docenić nowatorski charakter przeprowadzonych badań. Skróceniowo opisała zagadnienia związane z diagnostyką i leczeniem raka żołądka, nie wspomniała między innymi o wytycznych dotyczących wskazań leczenia infekcji *Helicobacter pylori*. W rozdziale „1.3. Wirus Epstein-Barr” Doktorantka oszczędnie opisała związek infekcji tym wirusem z rakiem żołądka. Ponadto, Autorka wspomniała również o dotychczasowych wynikach badań związanych ze współwystępowaniem *Helicobacter pylori* oraz wirusa Epstein-Barr w chorobach i raku żołądka. Rozdział ten należałoby uzupełnić. Ponadto, sugerowałabym opisanie zagadnienia związanego z koinfekcją dwoma badanymi czynnikami zakaźnymi w oddzielnym rozdziale co byłoby bardziej przejrzyste i pozwoliłoby w pełni zweryfikować co już wiadomo na ten temat, a co zostało zrobione w ramach realizacji rozprawy i dlaczego oraz określić wartość merytoryczną wniosków opisanych w przedłożonej dysertacji. Z kolei w dalszej części wstępu Doktorantka szczegółowo opisuje obecny stan wiedzy na temat badanych genów i ich związku z procesem nowotworzenia. Ta część została przedstawiona w sposób jasny i klarowny, co świadczy o dobrej znajomości tej problematyki badawczej. Jest interesującym i wartościowym przeglądem literatury ściśle związanym z tematyką opisanych prac badawczych.

W kolejnych rozdziałach sformułowano **Cele pracy** oraz **Hipotezy badawcze**. Cele pracy są poprawne i zostały uporządkowane w logiczny ciąg związany z poszczególnymi etapami wykonanych prac badawczych. Niemniej jednak Doktorantka dosyć lakonicznie sformułowala hipotezy badawcze. Brakuje hipotez związanych z analizowanymi czynnikami prozapalnymi

oraz katelicydyną LL-37 czy też z wpływem koinfekcji lub zakażenia pojedynczym patogenem na rozwój raka żołądka.

W rozdziale „**Materiał**” Doktorantka opisała materiał biologiczny oraz sporządziła wykaz odczynników i sprzętu laboratoryjnego wykorzystywanych podczas analiz. Zaznaczyła, że uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (nr RNN/206/19/KE) na wykonanie opisanych w dysertacji badań, niemniej jednak należałoby kopię stanowiska ww. Komisji dołączyć do przedłożonej rozprawy doktorskiej. Doktorantka wspomniała, że grupa badana obejmowała 32 pacjentów (20 mężczyzn i 12 kobiet), u których zdiagnozowano raka żołądka. Z kolei grupę kontrolną stanowiło 31 osób (w tym 29 kobiet oraz 2 mężczyzn) leczonych w Regionalnym Ośrodku Menopauzy i Osteoporozy w Łodzi. Czy pacjentkom badano poziom hormonów płciowych? Z uwagi na fakt, że dane literaturowe sugerują ochronną rolę hormonów płciowych w raku żołądka, pomiar tego parametru wydaje się być interesujący i zasadny. Ponadto, zestawienie w formie tabelarycznej (na przykład jako załącznik do przedłożonej dysertacji) zawierające nr pacjenta, wiek, płeć i stopień zaawansowania nowotworu znacznie ułatwiłoby śledzenie i analizę uzyskanych wyników.

W rozdziale „**Metody**” Doktorantka opisała zastosowane metody badawcze oraz analizy statystyczne. Brakuje opisu analiz tkanek pobranych od pacjentów w kierunku badania histopatologicznego. Czy tkanki do określenia cech histopatologicznych guza były utrwalane? W jaki sposób zabezpieczano i przechowywano materiał biologiczny do izolacji DNA? Pozostałe metody związane z analizą ekspresji genów, miRNA, niestabilności mikrosatelitarnej w *locus PTEN* oraz analizą badanych zakażeń zostały czytelnie opisane. Doktorantka szczegółowo opisała etapy izolacji materiału genetycznego. Czy procedury te zostały przeprowadzone zgodnie z protokołem opisanym przez producenta zastosowanych zestawów czy też Doktorantka dokonała modyfikacji? Doktorantka nie wspomniała również o zastosowaniu enzymu DNAza po ekstrakcji RNA. Czy brak obecności DNA w próbach RNA został przez Doktorantkę zweryfikowany? Ponadto, w opisie reakcji odwrotnej transkrypcji Pani mgr Magdalena Dzikowiec nie wspomniała o stężeniu RNA zastosowanego do RT-PCR, a jedynie o jego objętości. W metodzie immunoenzymatycznej ELISA zastosowanej do analizy zakażeń *Helicobacter pylori* błędnie napisano rozcieńczenie surowicy. W Tabeli 5 przedstawiono czułość i swoistość zastosowanych metod ELISA. Tabela ta została zaczerpnięta z katalogu producenta, o czym należałoby wspomnieć w opisie. Niemniej jednak chciałabym podkreślić, że metodyczne zróżnicowanie wykonanych badań oraz prawidłowe dostosowanie metod do postawionego celu badawczego świadczy o dobrym warsztacie naukowym Pani mgr Magdaleny Dzikowiec.

Uzyskane rezultaty badań zostały przedstawione w rozdziale „Wyniki” w formie opisu, rycin, tabel oraz fotografii. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą badaną i kontrolną w odniesieniu do wieku pacjentów. Czy analizie statystycznej poddano również płeć pacjentów pomiędzy grupami? Dodatkowo, Doktorantka nie stwierdziła również istotnych statystycznie zależności pomiędzy poziomem ekspresji genów *PTEN*, *SMOX*, *TNF- α* , *IFN- γ* , *LL-37*, *IL-2* oraz miRNA a badanymi czynnikami demograficznymi. Ponadto, nie wykazano różnic pomiędzy wiekiem pacjentów a stopniem zaawansowania nowotworu oraz występowaniem przeciwciał przeciwko *Helicobacter pylori*. Ponadto, Pani mgr Magdalena Dzikowiec szczegółowo opisuje obecność przeciwciał anty-*Helicobacter pylori* w surowicy pacjentów z rakiem żołądka oraz z grupy kontrolnej. Wyniki zestawiała w sposób czytelny w formie tabelarycznej. Nie podano jednostki przy zestawieniu wyników poszczególnych przeciwciał. Ponadto, jak wspomniałam wyżej śledzenie wyników byłoby łatwiejsze, gdyby Doktorantka przyporządkowała do numeru pacjenta jego wiek, płeć i stopień zaawansowania nowotworu. Co najważniejsze Doktorantka stwierdza dodatnią korelację między stadium rozwoju nowotworu a obecnością IgG przeciwko *Helicobacter pylori* oraz między wielkością guza pierwotnego a obecnością IgG przeciwko *Helicobacter pylori*. Również analizie poddano obecność przeciwciał anty-EBV. W Tabeli 8 przedstawiono obecność tych przeciwciał w surowicy oraz profil serologiczny pacjentów z rakiem żołądka. Dlaczego nie przedstawiono (analogicznie do analiz wykonanych dla *Helicobacter pylori*) obecności przeciwciał anty-EBV u osób z grupy kontrolnej? Przykładowe wyniki obecności przeciwciał anty-CA IgM, anty-CA IgG, anty-EBNA IgG oraz awidności przeciwciał anty-CA IgG zostały przedstawione również w formie fotografii. Jednak, opis fotografii jest niepełny, w moim odczuciu brakuje numeru pacjenta, od którego pobrano próbki do analiz. Również fotografie otrzymane z analiz prób pozostałych pacjentów powinny zostać dołączone do rozprawy jako załączniki. Największą część rozdziału ”Wyniki” Doktorantka poświęciła analizie ekspresji badanych genów oraz miRNA. Otrzymane wyniki zostały generalnie prawidłowo opisane. Natomiast na wielu rycinach (Rycina 14, 16, 18,19,22, 23, 24) błąd standardowy jest wysoki, dlatego też chciałabym prosić Doktorantkę o wyjaśnienie tak dużych rozbieżności pomiędzy analizowanymi próbkami oraz ich wpływ na interpretację uzyskanych wyników. W ilu powtórzeniach technicznych wykonano analizy molekularne? W rozdziale „Materiały” wspomniano o badaniach histopatologicznych wielkości guza pierwotnego i jego naciekania do sąsiednich tkanek, stanu regionalnych węzłów chłonnych oraz obecności lub braku przerzutów odległych. Jednakże, w rozdziale „Wyniki” nie opisano tego etapu badawczego, nie umieszczono również wyników oceny histopatologicznej materiału biologicznego pozyskanego od pacjentów z rakiem żołądka.

W moim odczuciu, aby wyniki były pełne należałoby otrzymane dane z analizy prób pobranych od pacjentów umieścić chociaż w załączniku do przedłożonej dysertacji.

Na podstawie uzyskanych wyników badań w rozdziale „**Wnioski**” Doktorantka wyciągnęła 10 wniosków obrazujących najważniejsze osiągnięcia przedłożonej do oceny rozprawy. Zbyt niska liczebność pacjentów objętych badaniami sprawia, że wnioski te należałoby zweryfikować. Wniosek drugi dotyczący wskazania roli infekcji wirusem Epsteina-Barr w kancerogenezie żołądka w związku z obecnością przeciwciał przeciwko EBV u pacjentów z rakiem żołądka uważam za „nieprawidłowy” – w rozprawie nie podano wyników otrzymanych z próbek pobranych od osób z grupy kontrolnej.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka w sposób logiczny omówiła otrzymane wyniki w konfrontacji z danymi z piśmiennictwa. W kilku miejscach Doktorantka pisze „...poziom ekspresji *PTEN* jest nieprawidłowy.”, natomiast nie wyjaśnia co oznacza ta nieprawidłowość. Ponadto, Doktorantka jedynie wspomina, że ryzyko rozwoju raka żołądka jest dwukrotnie wyższe u mężczyzn. Wydaje się celowe rozwinięcie tego wątku w rozdziale „Dyskusja”.

Na końcu rozdziału „Dyskusja” Doktorantka opisuje ograniczenia przedłożonej rozprawy doktorskiej. Zwraca uwagę na zbyt małą liczbę pacjentów objętych badaniem oraz trudności w pozyskaniu materiału klinicznego od pacjentów onkologicznych w związku z okresem pandemii SARS-CoV-2. Ponadto, w mojej opinii jednym z ważnych ograniczeń ocenianej dysertacji jest brak informacji dotyczących występowania zaburzeń metabolicznych (np.: otyłości) u analizowanych pacjentów. Dane literaturowe wskazują, że zarówno otyłość jak również insulinooporność i hiperinsulinemia są związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju między innymi raka żołądka. Chciałabym podkreślić, że Doktorantka zadeklarowała kontynuowanie badań na większej grupie pacjentów biorąc pod uwagę inne czynniki związane z kancerogenezą żołądka. Prosiłabym o sprecyzowanie o jakie konkretnie czynniki Doktorantka zamierza rozszerzyć dalsze prace badawcze.

4. Podsumowanie i konkluzja końcowa

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr Magdaleny Dzikowiec uważam, że uzyskane wyniki należy uznać za wartościowe. Stanowią one nie tylko wartość poznawczą, ale są również podstawą do planowania i prowadzenia dalszych doświadczeń naukowych. Przedstawione, powyższe spostrzeżenia nie umniejszają wartości naukowej rozprawy doktorskiej. Pytania opisane powyżej, które nasunęły mi się po lekturze monografii wydają się być dobrym punktem do rozpoczęcia dyskusji podczas obrony dysertacji. W mojej ocenie

przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest dowodem dojrzałości naukowej Pani mgr Magdaleny Dzikowicz oraz Jej przygotowania merytorycznego i warsztatowego.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani 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” spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. *o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*.

W związku z powyższym, przedkładam Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Dzikowicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.



Dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. uczelni