

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. Jolanty Chmieleckiej-Rutkowskiej

**pt.: „Warianty transkrypcyjne genów *PTGS1* i *PTGS2* u chorych z
brodawczakiem odwróconym nosa i zatok przynosowych”.**

Katedra i Klinika
Laryngologii
Wydział Nauk
Medycznych
w Katowicach

40-027 KATOWICE
ul. Francuska 20-24
laryngologia@spskm.katowice.pl

KIEROWNIK
prof. dr hab. n. med. J. Markowski
tel.: (+48 32) 25 91 460

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 25 91 460

laryngologia@spskm.katowice.pl



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Badania interdyscyplinarne łączące w sobie wiedzę i doświadczenie różnych dziedzin medycyny dają możliwość wykorzystania dorobku różnych specjalności i tym samym poznania istoty przebiegu schorzeń z wielu punktów widzenia. Badania takie stwarzają szansę nowego podejścia do zapobiegania i leczenia tych chorób z wykorzystaniem wiedzy z różnych dziedzin.

Rozprawa doktorska lek. Jolanty Chmieleckiej-Rutkowskiej jest właśnie takim przykładem badania schorzenia z wykorzystania wiedzy z różnych dziedzin, w tym przypadku z zakresu laryngologii, onkologii, biologii molekularnej i immunocytochemii w diagnozowaniu i prognozowaniu przebiegu jednego z istotnych problemów w praktyce laryngologicznej jakim jest brodawczak odwrócony. Tak więc temat pracy doktorskiej jest bardzo dobrze dobrany, gdyż jest aktualny i nowatorski oraz niesie aspekt nowości i innowacyjności, tak ważny w pracach młodych naukowców.

Istotną kwestią w diagnostyce brodawczaka odwróconego jest brak specyficznego biomarkera, który mógłby wskazywać na występowanie brodawczaka odwróconego a zwłaszcza na jego złośliwą transformację. Zidentyfikowanie takiego biomarkera pozwoliłoby przyspieszyć rozpoznanie choroby i podjęcie właściwego leczenia. W ocenie podłoża chorób nowotworowych podkreśla się ostatnio rolę cyklooksygenazy-1 i cyklooksygenazy-2. Dotychczas nie przeprowadzono badań polegających na próbie identyfikacji wariantów transkrypcyjnych genów cyklooksygenazy-1 (*PTGS1*) i cyklooksygenazy-2 (*PTGS2*) u pacjentów z brodawczakiem odwróconym.

Mimo postępów współczesnej biologii molekularnej brodawczak odwrócony nosa i zatok przynosowych jest nadal słabo zdefiniowanym nowotworem z punktu widzenia biologii molekularnej i genetyki. Być może zgodnie z koncepcją ocenianej dysertacji stosując modele ekspresji genowej, będzie można sklasyfikować chorych na brodawczaka odwróconego do poszczególnych podgrup, różniących się przebiegiem klinicznym choroby a przede wszystkim ocenić prawdopodobieństwo transformacji złośliwej.

Z tego powodu temat pracy doktorskiej podjęty przez Doktorantkę należy uznać za niezwykle ważny. W ostatnim czasie obserwujemy znaczny wzrost częstości występowania zachorowań na brodawczaka odwróconego zatok. Pomimo radykalnego leczenia operacyjnego pacjentów z brodawczakiem odwróconym wznovy są stosunkowo często a przede wszystkim obawiamy się wystąpienia transformacji złośliwej. Nasza obecna wiedza na temat tej choroby jest wciąż niewystarczająca.

Biorąc pod uwagę narastającą częstość występowania brodawczaka odwróconego rozprawa ta jest bardzo istotna z klinicznego i naukowego punktu widzenia. Stanowi bardzo nowoczesne podejście do problematyki diagnostyki schorzeń nosa i zatok przynosowych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została przygotowana pod opieką naukową prof. dr hab. n. med. Wioletty Pietruszewskiej – Kierownika Katedry i Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Głowy i Szyi Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Rozprawa doktorska lek. Jolanty Chmieleckiej-Rutkowskiej liczy 180 stron maszynopisu i jest zredagowana w typowym układzie przyjętym dla prac doktorskich. Składa się z 10 rozdziałów ułożonych logicznie z zachowaniem odpowiednich proporcji oraz posiada czytelną oprawę graficzną (zawiera 43 tabele i 91 rycin), ułatwiającą zapoznanie się z zawartością pracy i uzyskanymi wynikami.

Należy podkreślić bardzo dobrze opracowany 45 – stronicowy wstęp szczegółowo omawiający epidemiologię, etiopatogenezę, klasyfikację, objawy i leczenie brodawczaka odwróconego oraz wyjaśniający podłoże molekularne powstania tego nowotworu ze szczególnym uwzględnieniem roli metabolizmu kwasu arachidonowego, cyklooksygenazy 1 i 2 oraz genów PTSG1 i PTSG2. W dalszej części dysertacji – w rozdziale drugim – Doktorantka sformułowała 5 głównych celów pracy. Celami dysertacji była identyfikacja wariantów transkrypcyjnych genów cyklooksygenazy-1 (*PTGS1*) i cyklooksygenazy-2 (*PTGS2*) u pacjentów

z brodawczakiem odwróconym oraz u pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych, ocena ekspresji znanych wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* u pacjentów z brodawczakiem odwróconym w porównaniu do pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami nosa, ocena ekspresji nowych, dotychczas nieopisywanych wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* u pacjentów z brodawczakiem odwróconym w porównaniu do pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami nosa, analiza związku między obecnością znanych i nowych wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* a przebiegiem klinicznym brodawczaka odwróconego oraz próba wytypowania wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* odpowiedzialnych za powstanie fenotypu brodawczaka odwróconego.

W kolejnym – trzecim - rozdziale dysertacji Autorka przedstawiła materiał i metody zastosowane w swoich badaniach. Doktorantka swoimi badaniami objęła 2 grupy chorych: pierwszą z brodawczakiem odwróconym nosa i zatok przynosowych (80 pacjentów) i drugą z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami nosa (206 pacjentów).

Analizie poddano znane warianty transkrypcyjne genów *PTGS1* i *PTGS2* oraz nowe, hipotetycznie obecne u ludzi warianty transkrypcyjne. Wykorzystano dotychczas dostępne w bazach bioinformatycznych dane odnośnie opisanych izoform genów *PTGS1* i *PTGS2*. Analiza w czasie rzeczywistym znanych jak i nowych transkryptów genów *PTGS1* i *PTGS2* została przeprowadzona w genetycznym analizatorze 7900HT Real Time PCR. Analiza regionu kodującego genów *PTGS1* i *PTGS2* przeprowadzona została metodą bezpośredniego sekwencjonowania mRNA z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie nukleotydów z zastosowaniem jednego startera oligonukleotydowego. Badania laboratoryjne zostały wykonane w Pracowni Zakładu Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej UM w Łodzi.

Na przeprowadzenie badań Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na podstawie uchwały numer RNN/164/17/KE z dnia 16 maja 2017.

Dobór metod badawczych nie budzi zastrzeżeń, jest on adekwatny do postawionych celów, a ich opis świadczy o bardzo dobrym ich opanowaniu praktycznym przez Doktorantkę. Na uwagę zasługuje także bardzo staranny dobór metod statystycznych do analizy wyników

badania przy pomocy pakietu STATISTICA.PL wersja 13.3 (Statsoft, Kraków). Zwracają uwagę rygorystyczne kryteria doboru pacjentów.

Wyniki badań zostały przedstawione i omówione w odrębnym – czwartym - rozdziale w formie opisowej oraz przejrzystych tabel i rycin, przy których opracowaniu zastosowano właściwe metody analizy statystycznej. Wyniki badań i ich omówienie obejmują łącznie 17 podrozdziałów, w których oceniono uzyskane wyniki w zakresie wszystkich celów rozprawy.

Autorka dysertacji wykazała współwystępowanie wszystkich badanych wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* zarówno u pacjentów z brodawczakiem odwróconym jak i chorych z przewlekłym zapaleniem zatok z polipami nosa. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziła występowanie istotnych korelacji pomiędzy wszystkimi badanymi wariantami transkrypcyjnymi genów *PTGS1* i *PTGS2* u pacjentów w grupie z brodawczakiem odwróconym, szczególnie zaznaczoną pomiędzy wariantami COX2.1 i COX2.2. Również w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami nosa stwierdziła występowanie istotnych korelacji, jednak poziomy istotności były niższe a siła korelacji mniejsza. Ekspresja wszystkich wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* była niższa w brodawczaku odwróconym w porównaniu z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych.

Analiza dotycząca zależności pomiędzy badanymi wariantami transkrypcyjnymi genów *PTGS1* i *PTGS2* a cechami klinicznymi brodawczaka odwróconego wykazała istnienie zależności między ekspresją wariantów transkrypcyjnych genów *PTSG1* i *PTSG2* u pacjentów z brodawczakiem odwróconym: z paleniem tytoniu, stopniem zaawansowania nowotworu, wystąpieniem wznowy guza oraz z liczbą zabiegów związanych z obecnością wznowy lub guza resztkowego.

Doktorantka wykazała, że osoby palące charakteryzują się niższą ekspresją wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* oprócz wariantu COX1.2. Ekspresja badanych genów była istotnie niższa u pacjentów z wyższym stopniem zaawansowania brodawczaka odwróconego (T3 i T4) w porównaniu do guzów T1 i T2. Wykazała, że u pacjentów z niższą ekspresją wariantów transkrypcyjnych COX1.1, COX1.2 i COX2.1 istotnie częściej występowała wznowa. Ponadto u pacjentów z niższą ekspresją COX1.1, COX1.2, COX1.4 i COX2.3 czas przeżycia bez wznowy był istotnie krótszy a pacjenci z obecnymi wariantami COX1.1, COX1.2

mieli 4,5-krotnie a w przypadku COX2.3 4-krotnie większą szansę wystąpienia wznowy. Ekspresja wariantów transkrypcyjnych genów *PTSG1* i *PTSG2* była niższa u pacjentów, u których przeprowadzono dwa lub więcej zabiegów z powodu wznowy nowotworu. Zależności te były istotne statystycznie dla COX1.1 i COX 1.2.

Analiza własna wykazała brak istotnej korelacji pomiędzy ekspresją poszczególnych wariantów transkrypcyjnych genów *PTSG1* i *PTSG2* a płcią, wiekiem, nasileniem objawów w skali VAS oraz wystąpieniem transformacji złośliwej w obrębie brodawczaka odwróconego.

Wnioski odpowiadają ustalonym celom pracy. Autorka zidentyfikowała warianty transkrypcyjne genów cyklooksygenazy-1 (*PTGS1*) i cyklooksygenazy-2 (*PTGS2*) obecne u chorych z brodawczakiem odwróconym. Wykazała współwystępowanie znanych wariantów transkrypcyjne genów *PTGS1* i *PTGS2* u chorych z brodawczakiem odwróconym jak i w grupie kontrolnej z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami nosa, jak również współwystępowanie nowych, dotychczas nieopisywane wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* w obu badanych grupach pacjentów. Zarówno znane jak i nowe warianty genów *PTGS1* i *PTGS2* mają znaczenie w kształtowaniu się fenotypu brodawczaka odwróconego, jednak nieokreślona jest ich rola co do ochronnego charakteru czy promowania bardziej agresywnego przebiegu choroby. Obniżona ekspresja badanych wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* sprzyja występowaniu brodawczaka odwróconego, jego większemu zaawansowaniu klinicznemu w chwili rozpoznania oraz częstszemu występowaniu wznowy. Nie można jednak jednoznacznie określić ich ochronnego charakteru co wskazuje na konieczność kontynuacji badań w tym zakresie.

Rozprawa zawiera 233 pozycje piśmiennictwa obejmujące wszystkie aktualne pozycje literaturowe w zakresie będącym tematem dysertacji.

Przeprowadzona przez Doktorantkę w dysertacji dyskusja wykazała, iż Doktorantka posiada umiejętność krytycznej i wyważonej oceny uzyskanych wyników oraz formułowania wniosków końcowych, zwłaszcza w sytuacji braku możliwości skonfrontowania ich z danymi z piśmiennictwa. Kolejność prezentacji wyników jest jasna, logiczna i stanowi odpowiedź na założenia pracy. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż Doktorantka przeprowadziła badania w dziedzinie mającej dotąd niewielką liczbę opracowań dostępnych w literaturze. Należy

podkreślić trafność wyboru tematu. Rozprawa stanowi logiczną całość, świadczy o dobrym przygotowaniu Autorki do prowadzenia badań naukowych oraz ich prezentacji.

W podsumowaniu stwierdzam, iż przedłożona mi do oceny praca doktorska lek. Jolanty Chmieleckiej-Rutkowskiej pt.: „Warianty transkrypcyjne genów *PTSG1* i *PTSG2* u chorych z brodawczakiem odwróconym nosa i zatok przynosowych” jest bardzo cenną wskazówką dla wszystkich lekarzy laryngologów zajmujących się leczeniem schorzeń nosa i zatok przynosowych. Nie wnoszę żadnych uwag merytorycznych ani redakcyjnych.

W analizowanej dysertacji Doktorantka wykazała się umiejętnością wykorzystania dostępnej bibliografii, formułowania celów zaplanowanych badań naukowych i wyciągania wniosków z nich wypływających. Rozprawa przyczynia się do lepszego poznania biologii brodawczaka odwróconego, jego diagnostyki i leczenia. Praca ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tym zakresie. Po raz pierwszy w polskim piśmiennictwie tak szczegółowo dokonano analizy przebiegu brodawczaka odwróconego. Stanowi to istotny naukowo, oryginalny autorski wkład Autorki do problematyki badań nad tym nowotworem.

Unikalną wartością pracy są zastosowane przez Doktorantkę narzędzia badawcze w postaci oceny materiału pooperacyjnego z zastosowaniem najnowszych technik biologii molekularnej. Te nowoczesne metody badawcze pozwoliły Doktorantce na zrealizowanie ambitnego programu badawczego zmierzającego do poszukiwania genetycznych markerów predyspozycji do rozwoju brodawczaka odwróconego. Stanowi to bardzo nowoczesne podejście do metodyki badań współczesnej biologii molekularnej, twierdzącej, iż nowotwór wynika z postępu (akumulacji) zmian genetycznych.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. Jolanty Chmieleckiej-Rutkowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz jednoznacznie wskazuje na wiedzę teoretyczną Kandydatki w zakresie laryngologii oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Bardzo wysoko oceniam wartość naukową rozprawy doktorskiej lek. Jolanty Chmieleckiej-Rutkowskiej i w związku z tym mam zaszczyt wystąpić do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wobec bardzo wysokich walorów merytorycznych rozprawy doktorskiej i jej wysoką wartość naukową, biorąc pod uwagę pionierską w skali kraju koncepcję dysertacji lek. Jolanty

Chmieleckiej-Rutkowskiej, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022r., poz. 574 ze zm.)

Ponadto proponuję jako recenzent zgłoszenie rozprawy do Nagrody Naukowej im. Prof. Jana Miodońskiego – najwyższej nagrody naukowej Polskiego Towarzystwa Otorynolaryngologów – Chirurgów Głowy i Szyi, zgodnie z Regulaminem tej Nagrody.

KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Laryngologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
J. Markowski
prof. dr hab. n. med. Jarosław Markowski