



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Kraków, dn. 12 lipca 2022 r.

Recenzja pracy doktorskiej lek. Marty Kołodziej-Rzepy, pt. „Porównanie ekspresji wybranych markerów nowotworowych komórek macierzystych między podgrupą chorych na nowotwory narządów głowy i szyi z infekcją HPV16 i podgrupą chorych na nowotwory narządów głowy i szyi bez infekcji HPV16”

Pracę wykonano w Zakładzie Patomorfologii Nowotworów, Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu badawczego Oddziału w Krakowie

Promotor: dr hab. Beata Biesaga, prof. NIO-PIB

Promotor pomocniczy: dr n. med. Anna Mucha-Malecka

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKORSKIEJ:

Praca doktorska przedłożona do recenzji składa się z cyklu trzech artykułów – sumaryczny współczynnik oddziaływania (*impact factor*) wynosi 5,414 (w oparciu o bazę Web of Science), zaś punktacja krajowa MEiN = 210 punktów. Cała rozprawa doktorska liczy w sumie 41 stron tekstu uzupełnionego o załączniki w postaci cyklu trzech artykułów oraz oświadczeń ich współautorów. Część opisowa pracy została skomponowana w sposób klasyczny dla tego typu opracowań, tj. spisu skrótów; streszczeń w języku polskim i angielskim; wykazu publikacji stanowiących pracę doktorską (tzw. cykl); wprowadzenia; celów pracy; materiałów i metod; wyników; omówienia wyników; wniosków; piśmiennictwa; artykułów prac cyklu; oświadczeń współautorów.

Doktorantka jest lekarzem o specjalności chirurgia ogólna oraz chirurgia onkologiczna i podjęła się przygotowania badań, na podstawie których przygotowała niniejszą rozprawę doktorską.

Tematyka pracy dotyczy ekspresji wybranych markerów nowotworowych (CD44, CD98, ALDH1/2, Nanog, Oct-3/4 i Sox-2), komórek macierzystych nowotworów głowy i szyi w kontekście zakażenia (lub nie) wirusem brodawczaka ludzkiego HPV typu 16.



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

HPV, to bezosłonkowe wirusy, o symetrii ikosaedralne, zawierające w kapsydzie podwójną nić DNA (dsDNA). Wirusy te wykazują tropizm do komórek skóry oraz błon śluzowych. Wirusy HPV przenoszą się drogą kontaktową, czyli musi nastąpić fizyczny kontakt skóry lub błon śluzowych z zakażoną tkanką (np. stosunek seksualny) czy powierzchnią skażoną.

W przypadku skóry, mamy do czynienia z powstawaniem brodawek, co jest problemem raczej natury kosmetycznej. HPV zakażające komórki błon śluzowych (drogi moczowo płciowe, odbytu, błona śluzowa jamy ustnej i gardła oraz krtani), zostały podzielone na trzy grupy, ze względu na ryzyko wywołania przez nie transformacji nowotworowej: grupa niskiego, średniego i wysokiego ryzyka. Do grupy wysokiego ryzyka zaliczają się m.in. następujące typy HPV: 16, 18, 31, 33, 45, 56, nazywane „typami onkogennymi”. Onkogenne typy wirusa są odpowiedzialne za wiele przypadków raków wywodzących się z błon śluzowych, z których najbardziej znane są raki szyjki macicy. Także przypadki raków głowy i szyi są związane z tymi zakażeniami, bowiem w próbkach tkanek nowotworowych często wykrywany jest materiał genetyczny HPV typów onkogennych. Te spostrzeżenia stanowiły impuls do opracowania szczepionek przeciw typom o wysokim potencjale onkogennym, celem postępowania profilaktycznego raków szyjki macicy, a ostatnio także raków głowy i szyi. Drugim ważnym problemem naukowym, ale też klinicznym, jest sprawdzenie w jaki sposób wcześniejsza infekcja HPV może wpływać na rokowania pacjenta z nowotworem, a także czy etiologia wirusowa raka może mieć wpływ na postępowanie terapeutyczne oraz diagnostyczne.

Doktorantka w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej, podjęła problem porównania wpływu infekcji wirusem HPV16 na ekspresję wyżej wymienionych markerów nowotworowych komórek macierzystych między podgrupą chorych na nowotwory narządów głowy i szyi w porównaniu do grupy pacjentów bez tej infekcji. Dodatkowo, przeprowadziła badania wpływu zakażenia na czas przeżycia wolny od choroby oraz całkowity czas przeżycia. Badani pacjenci pochodzili z regionu Małopolski w latach 1991-2014. W ramach prac badawczych, wykorzystano tkanki nowotworowe ze zarchiwizowanych blozków parafinowych.



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

SZCZEGÓŁOWA OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ:

Wprowadzenie liczy 3 strony i zawiera część wprowadzającą czytelnika w problematykę pracy doktorskiej. Charakteryzuje ogólnie nowotwory narządów głowy i szyi oraz ich epidemiologię, leczenie w kontekście statusu zakażenia wirusami HPV o potencjale onkogennym oraz biologicznych cech komórek nowotworowych. Ponadto, w tej części pracy został rozwinięty bardziej problem płaskonabłonkowych raków jamy ustnej i gardła (OPSCC) w kontekście zakażenia wirusem HPV16, deeskalacji leczenia i rokowania na których to skupiła się Doktorantka w swojej pracy doktorskiej.

Uwagi:

1. Jaka jest chorobotwórczość wirusów HPV, pomijając etiologię nowotworów okolic głowy i szyi?

Cel pracy został przedstawiony w postaci czterech punktów oraz uzupełniony o cztery hipotezy badawcze korespondujące z celami badania. Doktorantka wyróżniła też cel aplikacyjny pracy, którym ma być wskazanie potencjalnych czynników prognostycznych związanych z nowotworowymi komórkami macierzystymi w podgrupach chorych na raki głowy i szyi w zależności od statusu zakażenia przez HPV16.

Uwagi:

1. Dlaczego wybrano HPV16, a nie inne typy wirusa? Z czego wynikał taki wybór?

Materiały i metody zostały opisane na 5 stronach manuskryptu. Doktorantka opisuje w tym rozdziale kolejno: kwalifikację chorych do badań; materiał; ekstrakcję DNA; analizę obecności HPV16 metodą qPCR; ocenę ekspresji wybranych markerów komórek nowotworowych macierzystych na podstawie barwień immunohistochemicznych; ocenę barwień immunohistochemicznych; analizę statystyczną. Metodyka została wykorzystana w opublikowanych trzech pracach cyklu doktorskiego.

Katedra Mikrobiologii

31-121 Kraków, ul. Czysta 18, tel. +48 12 633 25 67, faks +48 12 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
W Krakowie

Wydział Lekarski

Uwagi:

1. W pracy wykorzystano bloczki parafinowe z tkankami pacjentów. Nie ma wzmianki o zgodzie Komisji Bioetycznej (KBET) na te badania, ponieważ wykorzystuje się materiał biologiczny pacjentów do pracy naukowej. Informację o udzielonej zgodzie odnalazłem jedynie w artykule nr 3 cyklu doktorskiego – czy ta zgoda obejmowała wszystkie badania, wchodzące w skład pracy doktorskiej? Czy Doktorantka posiada te zgody, albo może dysponuje opinią KBET, że nie była ona wymagana do tego typu badań?
2. Czasem brakuje wskazanych producentów stosowanych odczynników – opis metodyki laboratoryjnej wymaga tego, aby ktoś inny mógł odtworzyć te same badania w identycznych warunkach
3. Strona 17:
 - a. „Ilość i jakość DNA...”. Prawidłowo „stężenie”
 - b. „(stosunki A260/280 i A260/230)” – brakuje jednostek [nm]
 - c. Jaką minimalną wartość odcięcia przyjęto dla wyżej wymienionych stosunków absorbancji, aby uznać izolat DNA z wystarczająco czysty?
4. Strona 18 – opisano, że używano szeregów ksylenów i alkoholi o malejącym stężeniu. Ile było tych stężeń, w jakiej sekwencji stosowano alkohole i ksyleny, jakie to były „ksyleny i alkohole” pod względem chemicznym i kto był ich producentem? Jakie stężenie miał metanol używany w procesie blokowania aktywności endogennych peroksydaz?
5. Podrozdział 3.6 „Ocena barwień immunohistochemicznych”. Zastosowano ocenę półilościową opartą o subiektywną ocenę wzrokową intensywności zabarwienia cytoplazmy komórek. Bardzo proszę podczas obrony pracy odnieść się do problemu subiektywnej oceny i jej możliwego wpływu na uzyskane wyniki. Co Pani myśli o możliwości zastosowania metody oceny ekspresji badanych markerów CSCs białek markerowych przy zastosowaniu metody RT-qPCR (PCR ilościowego opartego na ocenie stężenia transkryptów informacyjnego RNA w badanych próbkach)?

Katedra Mikrobiologii

31-121 Kraków, ul. Czysta 18, tel. +48 12 633 25 67, faks +48 12 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

6. Strona 20: Podano, że „ $\alpha = 0,005$ ”. Czy jest to błąd pisarski, że przyjęto tak restrykcyjny próg istotności?

Wyniki zostały zebrane na 8 stronach manuskryptu. Ich opis pokrywa się z treścią trzech opublikowanych artykułów cyklu doktorskiego i składa się z 7 podrozdziałów. W tej sekcji znajduje się tabela nr 2, w której zostały zebrane dane epidemiologiczne, kliniczne i histopatologiczne włączonych do badania 152 pacjentów na płaskonabłonkowe raki narządów głowy i szyi w zależności od występowania infekcji HPV16 – daje ona obraz materiału, na podstawie którego powstała praca doktorska.

Uwagi:

1. Jak wyglądały wyniki pomiaru czystości i stężenia DNA w próbkach użytych do qPCR?
2. Strona 21: W tabeli 2 podano, że było 127 mężczyzn, a w tekście podrozdziału 4.1 133.
3. Strona 22: W tabeli 2 znajdują się indeksy górne „a, b, c”, jednak brak opisu w legendzie.
4. Dlaczego przyjęto granicę wieku dla 58 lat?

Omówienie wyników zajmuje 3 strony tekstu i naturalnie stanowi odzwierciedlenie tych opublikowanych w kolejnych 3 artykułach cyklu doktorskiego, a ponieważ były one recenzowane i ewaluowane przez recenzentów i redaktorów czasopism, jako recenzent pracy doktorskiej nie dostrzegam konieczności ponownej oceny rezultatów badań. Ta część pracy jest syntezą dyskusji w całego cyklu doktorskiego, ale być może warto by było oznaczać w treści, która część dyskusji dotyczy którego artykułu cyklu, co jest oczywiście jedynie subiektywnym poglądem recenzenta pracy doktorskiej.

Uwagi:

1. Rdzeń pracy doktorskiej opiera się na analizie 63 próbek, co nie jest dużą liczbą i może negatywnie wpływać na moc testów statystycznych, a co za tym idzie, zmniejszyć siłę wniosków. Z drugiej strony, publikowane są prace z mniejszą liczbą pacjentów/próbek. Bardzo proszę o ustosunkowanie się do tej kwestii podczas obrony pracy doktorskiej.



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Wnioski zajmują 2 strony tekstu i obejmują 7 punktów.

1. Wniosek III – Doktorantka podaje, że obecność DNA HPV16 w OPSCC istotnie częściej występowała u młodszych chorych, tymczasem w artykule nr 1 cyklu doktorskiego, w tabeli 1 czytamy, że u pacjentów w wieku > 58 lat odsetek ten wynosił 51,4%, a u młodszych 25,0%.

Piśmiennictwo składa się z 43 pozycji - najstarsza z roku 2003, zaś najnowsze z roku 2021 (zatem lista zawiera nowe i najnowsze pozycje).

Kolejną częścią opracowania, to reprodukcja 3 artykułów wchodzących w skład cyklu doktorskiego.

Ostatnią częścią opracowania są oświadczenia współautorów artykułów wchodzących w skład cyklu doktorskiego, gdzie poświadczono ich wkład oraz opisano wkład Doktorantki, który w j ocenie dowodzi Jej znaczącego nakładu pracy podczas prowadzenia badań będących podstawą opublikowanych prac.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny Praca doktorska lek. Marty Kołodziej-Rzepy stanowi spójne tematycznie dzieło naukowe. Przeprowadzone i opublikowane badania poza walorem poznawczym, mają także znaczenie dla dalszych aplikacyjnych badań, co jest pożądaną wartością dodaną. Doktorantka dowiodła, że zna metodologię pracy naukowej i potrafi ją skutecznie zastosować, czego dowodem jest cykl prac stanowiących kanwę pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam że, Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13. ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r, o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017, poz. 1789) i na tej podstawie wnioskuję do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie –

Katedra Mikrobiologii

31-121 Kraków, ul. Czysta 18, tel. +48 12 633 25 67, faks +48 12 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Państwowego Instytutu Badawczego, o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne, lek. Marcie Kołodziej-Rzepie.

Prof. dr hab. Tomasz Gosiewski

Katedra Mikrobiologii

31-121 Kraków, ul. Czysła 18, tel. +48 12 633 25 67, faks +48 12 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl