



Prof. dr hab. Teresa Olczak  
Tel. 71 3752 612  
E-mail: Teresa.Olczak@uwr.edu.pl

Wrocław, 18.01.2016 r.

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Ireny Małgorzaty Duś pt. „Karcinogeneza w błonie śluzowej jamy ustnej w oparciu o badania immunoreaktywności białka SPARC i analizy obecności DNA *Candida albicans*”**

Rozprawa doktorska mgr Ireny Duś została zrealizowana w Zakładzie Patologii Jamy Ustnej Katedry Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem prof. Małgorzaty Radwan-Oczko oraz prof. Agnieszki Hałoń. Tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez Doktorantkę dotyczy jednego z głównych problemów zdrowia człowieka, gdyż nowotwory zaliczane są do powszechnych chorób, a ich diagnostyka jest nadal niewystarczająca. W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej Doktorantka wpisuje się w nurt takich badań, podejmując próbę modyfikacji już istniejących metod lub opracowanie nowych metod diagnostycznych, mających na celu różnicowanie zmian nowotworowych i identyfikację stadium zaawansowania choroby nowotworowej, ale także wykrywanie zmian przednowotworowych w jamie ustnej.

Rozprawa doktorska liczy 106 stron i zawiera wszystkie elementy wymagane dla tego typu prac. Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę swojej pracy spisem treści oraz szczegółowym spisem stosowanych skrótów. Zdaniem Recenzenta zamieszczone na końcu pracy streszczenie w języku polskim i angielskim powinno się raczej znaleźć na początku pracy. Obszerny wstęp stanowi dobre wprowadzenie do tematyki pracy badawczej, zwłaszcza dla osób, które na co dzień nie zajmują się tą problematyką. Doktorantka przedstawia w nim opis leukoplakii oraz raka płaskonabłonkowego. Duża część wstępu została poświęcona porównaniu systemów histopatologicznej oceny zmian błony śluzowej jamy ustnej. W dalszej części wstępu przedstawiono informacje dotyczące białka SPARC oraz znaczenie *Candida albicans* w rozwoju zmian nowotworowych w obrębie jamy ustnej.

Doktorantka w swojej pracy doktorskiej przedstawiła 5 głównych celów badawczych, które zdaniem Recenzenta zostały zasadniczo zrealizowane. Zastosowanie oceny klinicznej osób badanych i metod diagnostyki laboratoryjnej opartych na technikach immunohistochemicznych i biologii molekularnej pozwoliło na porównanie systemów klasyfikacji histopatologicznej oceny zmian nabłonkowych jamy ustnej, ocenę immunopatologiczną ekspresji białka SPARC w różnych stadiach zmian patologicznych nabłonka jamy ustnej, modyfikację izolacji DNA ze skrawków parafinowych oraz opracowanie metody detekcji DNA *Candida albicans* w materiale wyizolowanym ze skrawków parafinowych.

W rozdziale Materiały i metody zostały szczegółowo przedstawione odczynniki, materiały, sprzęt oraz techniki i metody zastosowane w pracy doktorskiej, a także metody analizy statystycznej. Do realizacji założonych celów badawczych Doktorantka zastosowała nie tylko metody immunohistochemiczne, ale także wybrane metody biologii molekularnej.

W tej części pracy przedstawiono także opis pobranego materiału biologicznego oraz parametry oceny badanych osób. Pomimo dobrego opisu metod badawczych, niektóre techniki zostały opisane zbyt ogólnie. Na str. 28 w rozdziale 3.3.1. brak jest opisu etapu blokowania lub stwierdzenia, że jest on niepotrzebny oraz opisu zasady reakcji barwnej. W tym drugim przypadku podano jedynie handlową nazwę gotowego zestawu. Nie ma też opisu kontroli negatywnej. W rozdziale 3.3.2. zdanie „W ocenie ekspresji uwzględniono łącznie dwa parametry reakcji immunohistochemicznej: odsetek komórek wykazujących dodatnią reakcję cytoplazmatyczną oraz intensywność nasilenia reakcji barwnej.” (str. 28) nie jest precyzyjne. Co to znaczy dodatnia reakcja cytoplazmatyczna, jaki kolor uznawany jest za pozytywny, w jaki sposób ocenia się intensywność reakcji? W rozdziale 3.3.2. stwierdzono, że „...w pojedynczych komórkach warstwy podstawnej nabłonka (stratum basale, SB) (str. 29)...”, ale na rysunkach nie ma wskazania, gdzie znajduje się ta warstwa. Bardziej szczegółowy opis rysunków byłby pomocny nie tylko dla Recenzenta, który na co dzień nie pracuje w tej dziedzinie, ale przede wszystkim dla studentów, dla których praca doktorska powinna być w przyszłości szczegółową instrukcją do wykonywanych doświadczeń i analizy uzyskanych wyników.

Do izolacji DNA ze skrawków parafinowych wykorzystano dwa komercyjne zestawy oparte o złoża umieszczone w kolumnkach. Głównym problemem przy tego typu izolacji jest wytrącanie się parafiny na złożu. Czy w pracach wstępnych wykorzystano metody bezkolumnkowe (np. metoda opisana w pracy Pikor i wsp., *Journal of Visualized Experiments* (49) e2763, doi:10.3791/2763, 2011)? Czy podjęto próbę przeprowadzenia reakcji PCR bezpośrednio na skrawkach pozbawionych parafiny, bez uprzedniej izolacji DNA (np. tak, jak to opisano w pracy Shibata i wsp., *Journal of Experimental Medicine*, 167 (1), 225-230, 1988)?

W rozdziale 3.4.4. (str. 33) w opisie elektroforezy znajdują się dane (opis i Rycina 2), które powinny znaleźć się raczej w rozdziale Wyniki, gdyż są to etapy modyfikacji lub opracowanie metod. Zastanawiające jest, w przypadku przedstawionych tutaj wyników oraz niektórych wyników w dalszej części pracy, dlaczego wykazano brak produktów reakcji PCR dla niektórych skrawków, chociaż do reakcji PCR pobrano DNA wyizolowany z tych skrawków w znaczącym stężeniu? Przykładem może być skrawek nr 5, z którego wyizolowano DNA w dość dużym stężeniu, co powinno teoretycznie skutkować też mniejszą jego degradacją. Wydaje się, że tłumaczenie tego tylko degradacją DNA nie jest do końca słuszne. Należy uwzględnić także modyfikacje DNA, jakie mogą zachodzić podczas utrwalania i przechowywania próbek. Także wyniki zamieszczone na Rycinach 3, 4 i 5 powinny znaleźć się w rozdziale Wyniki, a nie Materiały i Metody.

Na podstawie przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej Recenzent wnioskuje, że mgr Irena Duś do realizacji prowadzonych badań wykorzystwała nowoczesne metody badawcze, dobrze dobrane do rozwiązania postawionych problemów badawczych. Doktorantka korzysta także ze specjalistycznej pomocy innych osób przy wykorzystaniu niektórych technik, co zostało jednoznacznie zaznaczone w rozprawie doktorskiej. Uzyskane wyniki są interesujące nie tylko z punktu widzenia badań podstawowych, ale mogą one także dostarczyć informacji dla badaczy poszukujących nowych metod diagnostycznych. Chociaż wyniki uzyskane w pracy doktorskiej nie pozwoliły na ostateczne opracowanie nowej, efektywnej metody diagnostycznej, to stanowią one dobrą podstawę do dalszych badań.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki pokazujące ocenę immunohistochemiczną pobranych tkanek zdaniem Recenzenta są zbyt ogólne. Na przedstawionych Rycinach nie ma szczegółowego opisu części tkanek, nie ma wskazanych miejsc z pozytywną reakcją immunochemiczną oraz brak jest przedstawienia jako kontroli porównawczej wybarwionej zdrowej tkanki. W przypadku barwienia z wykorzystaniem przeciwciał brak jest reakcji kontrolnej bez wykorzystania przeciwciał. Także w części dotyczącej wyników uzyskanych

przy zastosowaniu technik biologii molekularnej ryciny nie są dokładnie opisane. Brak jest opisu próbek nanoszonych na żel do elektroforezy, a jakość techniczna zdjęć żeli nie jest dobra, co utrudnia ich ocenę. Nie wydaje się także, aby stężenie DNA preparatów uzyskanych po izolacji ze skrawków powinno być analizowane przy użyciu metod statystycznych.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka krytycznie ocenia swoje wyniki i ich potencjalne znaczenie oraz odnosi się do wiedzy dostępnej w literaturze. Pomimo kilku wątpliwości, przedstawionych poniżej, dyskusja jest dość wyczerpująca. Dyskusję zamykają wnioski końcowe, bardzo dobrze podsumowujące efekty uzyskane w pracy doktorskiej.

Pomimo obszernej i dobrej dyskusji zamieszczonej w pracy doktorskiej, Recenzent prosi o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktorantki do pytań, nasuwających się po lekturze ocenianej pracy:

- 1) Doktorantka sugeruje, że głównym czynnikiem prowadzącym do braku produktów reakcji PCR jest degradacja DNA i wymienia alternatywne metody analizy DNA pochodzącego ze skrawków z wykorzystaniem techniki PCR: „... polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP), analiza mikrosatelitarna czy metylacja DNA.” Czy są to najbardziej właściwe metody, zwłaszcza w świetle potencjalnych modyfikacji DNA ?
- 2) Doktorantka dalej sugeruje „... aby w dalszych badaniach przeprowadzić reakcję real-time PCR pozwalającą na uzyskanie wyników również w przypadku pojedynczej kopii genu.”, ale nie dyskutuje zastosowania w niej także innych, dodatkowych par starterów. Czy jakie próby były przeprowadzone ?
- 3) Które z uzyskanych wyników zdaniem Doktorantki są całkowicie nowe w porównaniu z danymi literaturowymi ?

Piśmiennictwo obejmuje 74 prace, z czego większość to doniesienia z ostatnich lat. Jest to lista, która pozwala na dobre przedstawienie badanego problemu. Nie znalazło się jednak na tej liście kilka istotnych prac, m.in. prace wskazane przez Recenzenta powyżej. Pracę kończy spis tabel i rycin oraz aneks.

Pod względem edytorskim praca jest napisana dość dobrze, a dostrzeżone błędy interpunkcyjne lub gramatyczne nie miały istotnego znaczenia i nie zostały wzięte pod uwagę przez Recenzenta w merytorycznej ocenie rozprawy. Z obowiązku Recenzent pragnie jednak zwrócić uwagę na dosłowne tłumaczenie wyrazów z języka angielskiego (str. 11 „...lub molekularnych czynników predykcyjnych...”) lub stosowanie nazw angielskich „... przeprowadzić reakcję real-time PCR...”, co jest istotne nie tyle z punktu widzenia czytanej pracy, ale dla przyszłości młodego badacza, który może być wkrótce nauczycielem akademickim. W pracy znaleziono także niecisłe sformułowania typu „Po izolacji DNA przeprowadzono detekcję ludzkiej beta globiny..... W tym celu zastosowano technikę PCR w kierunku ludzkiej beta globiny.” W tym przypadku technika PCR wykorzystywana jest do detekcji sekwencji genu kodującego ludzką beta globinę, a użyte zdanie jest skrótem myślowym. Dziwne wydaje się także sformułowanie na str. 69 „ Statystycznie istotnie większe stężenie DNA, ze współczynnikiem  $p=0,0000,...$ ”. Zamiast symbolu „x” stosowana jest litera „x”, „Lublana” i „Ljulbjana” stosowane są zamiennie, na str. 77 w drugim paragrafie brak jest odnośnika do cytowanej pracy Zsikla i wsp., nazwy genów *SAP1* i *SAP4* czasami nie są pisane kursywą, brak jest odnośników literaturowych na początku paragrafu na str. 82. Nie są to liczne niedoskonałości, ale Recenzent zwraca na nie uwagę ze względu na zachowanie poprawności pisania prac naukowych i ma nadzieję, że powyższe uwagi będą uwzględnione przez młodego badacza w pracach wykonywanych i pisanych w przyszłości.

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Ireny Duś nie można jednak pominąć pozostałego dorobku naukowego, który obejmuje 2 prace, opublikowane w czasopiśmie „Virulence” oraz „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej”. Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej mgr Ireny Duś oraz pozostały dorobek naukowy Doktorantki, niezwiązany z tematyką rozprawy doktorskiej i przedstawiony w opublikowanych pracach, oceniam bardzo dobrze. Zdaniem Recenzenta wyniki przedstawione w opublikowanej pracy eksperymentalnej oraz część pracy przeglądowej mogłyby wchodzić w skład rozprawy doktorskiej, co pozwoliłoby na skoncentrowanie się na wybranych, bardziej jednolitych aspektach badawczych, a w efekcie być może na bardziej efektywne opracowanie proponowanych metod diagnostycznych opartych na technikach biologii molekularnej.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Ireny Duś pod względem naukowym spełnia zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Także pod względem formalnym rozprawa ta spełnia wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r., z późniejszymi zmianami z dnia 30 października 2015 r. Dlatego też, wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*T. Olach*