

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII****ZAKŁAD PATOLOGII KOMÓRKI**ul. Joliot-Curie 14a  
50-383 Wrocław

www.biotech.uni.wroc.pl

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	11-03-2021
L. dz. RN-BM/	360

Wrocław 01.03.2021

dr hab. Antonina J. Mazur  
antonina.mazur@uwr.edu.pl**Recenzja****rozprawy doktorskiej lek. Jakuba Andrzeja Marczuka****pt.: „Znaczenie prognostyczne ekspresji polimerazy poli(ADP-rybozy)1 (PARP1) u pacjentów z czerniakiem skóry.”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy ustalenia, czy poziom enzymu polimerazy poli(ADP-rybozy)1 (PARP1) w tkance guza pierwotnego czerniaka może być czynnikiem prognostycznym. Czerniak należy do nowotworów złośliwych, które charakteryzują się wysoką inwazyjnością. Pomimo opracowywania kolejnych preparatów nadal brakuje skutecznego leku o szerokim spektrum działania na wszystkie podtypy czerniaka skóry. Szybka diagnoza i wycięcie ogniska pierwotnego przed pojawieniem się przerzutów do węzłów chłonnych, daje największe szanse na wyzdrowienie. W związku z tym zasadnym jest dalsze poznawanie mechanizmów prowadzących do transformacji prawidłowych melanocytów w komórki czerniaka oraz szukanie markerów prognostycznych, które w dalszej perspektywie pozwolą na opracowanie skuteczniejszych schematów diagnostycznych oraz terapeutycznych.

Rozprawa doktorska, obejmująca 93 strony, ma typowy układ dla tego typu prac. Jest ona podzielona na następujące rozdziały: wstęp, cele i założenia pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz piśmiennictwo. W pracy znajdują się ponadto streszczenia w językach polskim oraz angielskim, spis tabel, spis mikrofotografii, skanów i wykresów, a także wykaz skrótów. Ten ostatni moim zdaniem powinien znaleźć się na początku pracy.

We wstępie Doktorant bardzo wyczerpująco porusza kwestie dotyczące czerniaka oraz białka PARP1. Ta część pracy jest bardzo dobrze napisana. Dowiadujemy się tutaj o podłożu czerniaka, jego podrodzajach, głównych konstytutywnie aktywnych w tym nowotworze szlakach sygnałowych oraz sposobach leczenia tego schorzenia. Ciekawym aspektem poruszonym w tym rozdziale jest genetyczna odmienność czerniaka skóry w odniesieniu do czerniaków występujących poza tym narządem. W wytłumaczeniu tego fenomenu Autor podpira się teorią, zakładającą, że może to być spowodowane różnym pochodzeniem melanocytów skórnych i komórek pigmentowych w innych lokalizacjach. Czy Doktorant mógłby ten temat zgłębić podczas obrony? Pochodzenie melanoblastów jest bardzo ciekawe. Faktycznie ostatnie prace pokazują, że melanocyty skórne w bardzo dużej części powstają z prekursorów komórek Schwanna, a nie tylko bezpośrednio z komórek grzebienia nerwowego. Z lektury tej części pracy dowiadujemy się także bardzo wiele na temat białka PARP1, szczególnie jego budowa oraz pełnione w komórce funkcje są wnikliwie omówione. Brakuje jednak pewnych ogólnych, ale istotnych informacji na temat PARP1. Nie dowiadujemy się np., jaką ma masę cząsteczkową oraz na którym chromosomie leży gen kodujący PARP1. W tym rozdziale rozprawy część informacji mogła zostać przedstawiona również w postaci graficznej. Dotyczy to m.in. szlaków sygnałowych RAS/RAF/MEK/ERK oraz PTEN/PI3K/AKT/mTOR, członków rodziny białek PARP, a także budowy domenowej PARP1. Byłoby to znaczne ułatwienie w analizie przedstawionych tutaj zagadnień przez osoby, które przyswajają wiedzę głównie poprzez jej graficzne przedstawienie. Na stronie 14 Autor wymienia białko KIT, ale Doktorant nie tłumaczy w tym miejscu, czym jest to białko, a powinien, szczególnie że jest jeszcze o nim mowa w dalszej części pracy. Brakuje tutaj także informacji, jakie są całkowita odpowiedź na leczenie i pięcioletnie przeżycie po zastosowaniu najczęściej używanych leków w terapii czerniaka skóry.

W kolejnym rozdziale pracy Autor jasno nakreśla, jakie cele i założenia przyświecały jego pracy. Powołuje się tutaj na niewystarczającą liczbę badań nad rolą PARP1 w transformacji nowotworowej melanocytów. Celem Doktoranta było ustalenie, czy istnieje korelacja pomiędzy poziomem PARP1 w tkankach od pacjentów z czerniakiem skóry a parametrami kliniczno-patologicznymi i histopatologicznymi, a także czasami przeżycia specyficznego dla choroby nowotworowej (*ang. CSOS*) oraz wolnego od nawrotu choroby nowotworowej (*ang. DFS*).

W rozdziale „materiał i metody”, który poprawnie powinien nazywać się „materiały i metody” prawidłowo przytoczone są charakterystyki kliniczno-patologiczna grupy badawczej oraz histopatologiczna guzów. Na przedstawione w tej rozprawie badania Autor uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. W podrozdziale 3.3 należało powołać się na pozycję literaturową, która była podstawą do przeprowadzenia opisanego w tym miejscu barwienia immunohistochemicznego, gdyż procedura ta została zbyt skrótowo opisana. Sposób analizy intensywności reakcji immunohistochemicznej jest opisany poprawnie. Pewną wątpliwość budzi zakres wartości (0-300) przypisany intensywności sygnału po barwieniu immunohistochemicznym (str. 44), a następnie przypisanie H-score  $\leq 280$  i  $\geq 280$  odpowiednio niskiemu oraz wysokiemu poziomowi PARP1 (str. 51). Czy Autor mógłby podczas obrony wytłumaczyć, dlaczego takie wartości przypisał niskiej i wysokiej „ekspresji” PARP1? Natomiast analiza statystyczna uzyskanych wyników nie budzi zastrzeżeń. Kolejna uwaga do tej części rozprawy dotyczy specyficzności użytych przeciwciał. Cała praca Doktoranta polegała na analizie poziomu białka PARP1 w guzach w oparciu o analizę immunohistochemiczną z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko białku PARP1 wyprodukowanych przez firmę Santa Cruz Biotechnology Inc. z U.S.A. Czy Doktorant mógłby podczas obrony odnieść się do kwestii specyficzności tych przeciwciał? PARP1 jest członkiem większej rodziny białek PARP. Czy użyte w tej pracy przeciwciała rozpoznają tylko i wyłącznie PARP1? Czy znane są jakieś badania przeprowadzone na np. komórkach z nokautem *PARP1*, udowadniające wybiórczość tych przeciwciał? Drobną uwagę odnosi się do braku skali na mikrofotografiach. Chociaż zastosowane podczas obrazowania powiększenie zostało podane w legendzie do każdej z tych figur, naniesiona skala na zdjęcie mikroskopowe pozwala na lepszą interpretację wyników.

W części „wyniki” Autor właściwie przedstawia rezultaty swoich badań i pokazuje korelacje pomiędzy poziomem białka PARP1 w tkance guza a ocenianymi parametrami oraz czasami CSOS i DFS. Wyniki badań zostały przedstawione w formie sześciu tabel oraz sześciu wykresów. Szczególnie interesujące są wyniki uzyskane dla grupy pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych i tylko do ich omówienia ograniczę się w tym miejscu. Otóż okazuje się, że wysoki poziom PARP1 w guzach pierwotnych był dodatnio skorelowany z preferencyjną lokalizacją guza w obrębie głowy i szyi, zaawansowaniem choroby oraz nawrotem choroby. Ponadto w tej samej grupie pacjentów wysoki poziom PARP1 był dodatnio skorelowany z grubością nacieku wg Breslowa, wskaźnikiem mitotycznym oraz owrzodzeniem. Dodatkowo

przeprowadzona analiza estymatorów Kaplana-Meiera dla czasu przeżycia specyficznego dla choroby nowotworowej (*ang. CSOS*) oraz czasu wolnego od nawrotu choroby nowotworowej (*ang. DFS*) wykazały, że oba czasy są krótsze, gdy poziom PARP1 jest wysoki. Poza kwestiami formalno-edytorskimi, które omawiam poniżej, nie mam zastrzeżeń do tej części pracy.

W dyskusji Autor rozprawy krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników i porównuje je z rezultatami opisanymi w dostępnej literaturze. W tej części pracy podkreślone jest, że do momentu napisania niniejszej rozprawy doktorskiej badań o podobnym zakresie na guzach pacjentów z czerniakiem skóry w kontekście analizy poziomu PARP1 i jego korelacji z parametrami wymienionymi w ocenianej rozprawie oraz czasami CSOS i DFS nie przeprowadzono.

W następnym rozdziale Autor formułuje trzy wnioski, które zostały wysnute na podstawie uzyskanych wyników. Najciekawszy z nich mówi o tym, że analiza poziomu PARP1 w tkance nowotworowej pacjentów bez przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych może być wykorzystywana w rokowaniu u tych pacjentów. Jednocześnie Autor konstatuje, że ze względu na niedużą grupę badawczą (128 osób) wyniki przez niego uzyskane powinny być potwierdzone szerzej zakrojonymi badaniami.

Streszczenia w języku polskim oraz angielskim zostały prawidłowo zredagowane i zawierają wszystkie najważniejsze elementy rozprawy.

W tej części recenzji powinnam przejść do omówienia pracy pod kątem formalno-edytorskim. Jednak ten akapit będzie na pograniczu oceny pracy pod ww. kątem i jej analizy od strony merytorycznej. Razi użycie w tytule oraz wielokrotnie w całej pracy określeń: „ekspresja” i „nadekspresja”, zamiast których powinny być użyte sformułowania: „poziom” oraz „zwiększony poziom”. Autor błędnie używa wyrażen „ekspresja” i „nadekspresja”, mając na myśli białko. Jest to kalka z języka angielskiego. Sformułowania „ekspresja” i „nadekspresja” odnoszą się do genu. Możemy napisać ekspresja *PARP1*, ale w odniesieniu do białka PARP1 możemy rozważać jego poziom. Nawiasem mówiąc, należy tutaj zwrócić uwagę na fakt, że w tej rozprawie nazwy ludzkich genów nie są pisane kursywą, a powinny być. Autor używa także wielokrotnie pewnego skrótowego myślowego, który jest stosowany przez wiele osób. Wytlumaczę to na jednym przykładzie ze strony 13, gdzie znajduje się następujące zdanie. „Kluczowe mutacje tego szlaku dotyczą przede wszystkim białek RAF, najczęściej zaś BRAF (ok. 40-60%

przypadków czerniaka skóry), z czego najczęstsza mutacja to V600E (zamiana waliny na kwas glutaminowy), stanowiąca około 90% mutacji tego genu”. Przytoczone zdanie powinno być następująco sformułowane. „Kluczowe mutacje w genach, które kodują białka tego szlaku, dotyczą przede wszystkim genów *RAF*, najczęściej zaś *BRAF* (ok. 40-60% przypadków czerniaka skóry), z czego najczęstsza mutacja, stanowiąca około 90% mutacji tego genu, prowadzi do zamiany w białku waliny na kwas glutaminowy w pozycji 600 (V600E).” Mutacja nie zachodzi w białku, ale w DNA. Niestety Autor, bardzo często pisząc o jakimś białku, nadmienia o jego mutacji.

Przechodząc już do oceny rozprawy pod kątem formalno-edytorskim, należy zwrócić uwagę na fakt, że praca została napisana poprawnie pod kątem językowym. Pojawiło się w niej zaledwie kilkanaście literówek, drobnych błędów gramatycznych oraz interpunkcyjnych, a także powtórzeń. Chociaż praca została starannie przygotowana, mam tutaj pewne zastrzeżenia. Czasami Autor używa w pracy jednoliterowych skrótów dla oznaczenia aminokwasów, a czasami używa ich pełnych nazw. Jest to dosyć mylące, można było się zdecydować na jeden sposób nazewnictwa aminokwasów. Następną kwestią, jaką chcę poruszyć w tym akapicie, jest brak zaznaczenia przy nazwach pisanych w innym języku języka, z jakiego pochodzą. Fraza: „czas wolny od nawrotu choroby nowotworowej (*disease-free survival, DFS*)” (str. 38) powinna wyglądać następująco: „czas wolny od nawrotu choroby nowotworowej (*ang. disease-free survival, DFS*).” Zakładam, że w tym i wielu innych przypadkach chodzi o język angielski, w rozprawie powinno to być jednak jasno zaznaczone. Spośród drobnych błędów należy wymienić także sposób pisania PIP2 oraz PIP3, „2” i „3” w skrótach odnoszących się do 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu oraz 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu powinny być pisane w formie dolnego indeksu. Nie rozumiem, dlaczego Autor opisał wykresy w języku angielskim. Ponadto przy każdym wykresie dodatkową jego częścią jest przedstawienie wyników w formie tabeli, te fragmenty wykresów nie zostały jednak opisane w legendach. We wszystkich tabelach zamiast słowa „liczba” znajduje się jego angielski odpowiednik – „No.” Poprawnie powinnyśmy używać wyrazu „potranslacyjny” zamiast „posttranslacyjny” (str. 23). Ta druga wersja została w rozprawie parokrotnie użyta. Pojawia się też na stronie 28 sformułowanie „postreplikacyjna”, a powinno być „poreplikacyjna”. Autor używa też naprzemiennie „ubikwitynacja” (str. 23) oraz

„ubikwitynylacja” (str. 25), z czego ta pierwsza forma jest właściwa. Czy „carcinosarcoma” oraz „glioblastoma” nie mają swoich polskich nazw?

Autor wymienia 174 pozycji w części „piśmiennictwo”. Spośród nich 52 pozycje to odnośniki internetowe z podaną każdorazowo datą dostępu. Poza nimi 92 pozycje pochodzą z ostatnich 10 lat. W kilku przypadkach brakuje informacji o roku, w którym dany artykuł (poz. 46, 49, 90) został opublikowany. Pozycje literaturowe zostały prawidłowo dobrane, co świadczy o właściwym przygotowaniu teoretycznym Autora.

Wymienione błędy oraz uchybienia nie wpływają na merytoryczną wartość pracy, która jest wysoka. Do momentu wykonania przez lek. Jakuba Andrzeja Marczyka opisanych w niniejszej rozprawie badań, polegających na sprawdzeniu, czy poziom białka PARP1 w komórkach nowotworowych guzów pierwotnych może być czynnikiem prognostycznym w przypadku czerniaka skóry, brakowało takiego opracowania. Dlatego też ta rozprawa posiada dużą wartość poznawczą. Uzyskane przez Autora wyniki zostały częściowo w tym roku opublikowane w artykule pt.: *„PARP1 as a Marker of an Aggressive Clinical Phenotype in Cutaneous Melanoma—A Clinical and an In Vitro Study”* w czasopiśmie *Cells* (wydawnictwo MDPI z siedzibą w Szwajcarii) o współczynniku oddziaływania równym 4,37. Lek. Jakub Andrzej Marczyk jest jednym z trzech pierwszych autorów tego artykułu. Niniejsza rozprawa będzie zapewne przyczynkiem do zaplanowania kolejnych eksperymentów, mających na celu ustalenie roli PARP1 w melanomogenezie.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668).

Reasumując, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. Jakuba Andrzeja Marczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Antonina Mazur