

## RECENZJA

Katedra i Zakład Chemii  
Klinicznej i Diagnostyki  
Laboratoryjnej

Wydział Nauk  
Farmaceutycznych  
w Sosnowcu

41-200 Sosnowiec  
ul. Jedności 8  
www.sum.edu.pl

Profesor SUM badawczo-dydaktyczny  
dr hab. n. med. Katarzyna Winsz-Szczotka  
winsz@sum.edu.pl

SEKRETARIAT  
tel.: (+48 32) 364 11 50  
fax: (+48 32) 364 11 57  
chem\_klin@sum.edu.pl

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu

**lek. Elżbieta Pawluczuk**

Zakład Diagnostyki Chorób Neurozwyrodnieniowych

Szkoła Doktorska

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Tytuł pracy: **Znaczenie wybranych chemokin i ich specyficznych receptorów  
w raku żołądka**

Promotor: **prof. dr hab. n. med. Barbara Mroczo**

Promotor pomocniczy: **dr n. med. Agnieszka Kulczyńska-Przybik**

Rak żołądka (GC, *gastric cancer*) jest jednym z najczęściej rozpoznawanych nowotworów złośliwych u ludzi, głównie u starszych mężczyzn. Występowanie GC, będącego chorobą złożoną i wieloczynnikową, o wysokim współczynniku umieralności, jest związane z wpływami czynników genetycznych, środowiskowych, dietą, infekcją *Helicobacter pylori* i udziałem innych czynników, w tym – palenia tytoniu, zakażenia wirusem Epsteina-Barr czy z występowaniem przewlekłego zanikowego zapalenia błony śluzowej żołądka związanego z chorobą Addisona-Biermera. Wydłużenie czasu przeżycia chorych oraz zmniejszenie umieralności na omawiany nowotwór zależy w dużym stopniu od zwiększenia jego wykrywalności we wczesnej postaci z następowym zastosowaniem odpowiedniego leczenia. Stąd też, badania, pod wspólną nazwą: „Znaczenie wybranych chemokin i ich specyficznych receptorów w raku żołądka”, prowadzone przez Panią lek. Elżbietę Pawluczuk, pod opieką Pani prof. dr hab. n. med. Barbary Mroczo oraz Pani dr n. med. Agnieszki Kulczyńskiej-Przybik, będące próbą wskazania potencjalnej przydatności oznaczeń krążącej chemokiny CXCL8 i jej receptora CXCR2 w diagnostyce GC, na wzór klasycznych markerów nowotworowych, tj. CA 19-9 (*cancer antigen 19-9*; antygen nowotworowy towarzyszący nowotworom przewodu pokarmowego) i CEA (*carcinoembryonic antygen*; antygen karcynoembrionalny), uważam za niezwykle interesujące, zarówno ze względów naukowych, jak i potencjalnie klinicznych.

Rozprawę doktorską lek. Elżbiety Pawluczuk stanowią dwie, powiązane tematycznie publikacje, z których jedna ma charakter pracy poglądowej, zaś druga jest pracą eksperymentalną. Artykuły te zostały opublikowane w latach odpowiednio 2020 oraz 2021, na łamach czasopismach naukowych, indeksowanych w interdyscyplinarnej bazie *Journal Citation Reports*, takich jak: *International Journal of Molecular Sciences* oraz *Cancers*. Ich łączny współczynnik oddziaływania (IF, *impact factor*) wynosi 12,499 (punkty MEiN = 280). Powyższe wskazuje, że przedmiotowe prace, będące podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora, zostały wcześniej poddane wysoce wymagającym procesom recenzowania przez międzynarodowy zespół ekspertów, spełniając jednocześnie wymagania stawiane w światowych czasopismach naukowych.

We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, zaś pozostali współautorzy wyrazili zgodę na przedłożenie tych prac, jako część Jej rozprawy doktorskiej, przygotowanej w formie spójnych tematycznych artykułów. Autorka wskazuje, że jej procentowy udział w powstaniu każdej z prac był wiodący (wynosił 55%), i wiązał się między innymi z opracowaniem ich koncepcji, zebraniem piśmiennictwa, przygotowaniem materiału biologicznego, wykonaniem oznaczeń, interpretacją i dyskusją wyników, po czym napisaniem pracy i przygotowaniem jej do druku.

Nadrzędny, wspomniany wyżej, cel pracy doktorskiej został osiągnięty przez Autorkę poprzez realizację kolejnych, logicznie powiązanych celów podrzędnych, obejmujących: • oznaczenie stężeń chemokiny CXCL8 i jej receptora CXCR2 we krwi osób zdrowych i pacjentów z GC o różnym stopniu zaawansowania choroby nowotworowej i cechach kliniczno-patologicznych raka żołądka; • ocenę związku CXCL8 i CXCR2 z wybranymi, rutynowo oznaczanymi w procesie diagnostycznym markerami nowotworowymi, tj. CA 19-9 i CEA oraz wskaźnikiem stanu zapalnego – białkiem C-reaktywnym (CRP, *C-reactive protein*); • ustalenie zależności między stężeniami wszystkich analizowanych biomarkerów a prawdopodobieństwem wystąpienia GC; • określenie wskaźników diagnostycznych CXCL8 i CXCR2, tj. czułości i swoistości diagnostycznej, wartości predykcyjnej wyniku dodatniego i ujemnego, mocy diagnostycznej w oparciu o pole powierzchni pod krzywą ROC.

Na przeprowadzenie badań, stanowiących powyższe cele pracy, wyraziła zgodę Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku (numer zgody KB R-I-002/65/20170), pismem z dnia 17.12.2020 r., którego kopię dołączyła do dysertacji.

Wprowadzeniem do omawianego zbioru publikacji jest kilkustronicowy wstęp, który nakreśla tematykę pracy doktorskiej. W rozdziale tym Autorka przedstawiła ogólną charakterystykę rodziny białek – chemokin, ich biologiczne funkcje, ze szczególnym uwzględnieniem chemokiny CXCL8 i jej receptorów [w tym fragmencie możemy znaleźć 2x powtórzone zdanie (str. 7, wers:12-14 oraz i wers: 27-28)]. Na kolejnych sześciu stronach znajdujemy opis patologii jaką jest rak żołądka, jego epidemiologię, etiopatogenezę, klasyfikację oraz diagnostykę obrazową i laboratoryjną (w tym fragmencie możemy znaleźć nieodpowiednie umiejscowienie tabeli nr 1). Z treścią powyższego fragmentu koresponduje jasno określony nadrzędny cel pracy i pięć celi podrzędnych. Następne rozdziały są związłymi opisami zarówno materiału biologicznego i metod badawczych stosowanych w pracy, jak i uzyskanych wyników i ich podsumowania z wnioskami. Jednakże wnioski te nie w pełni odpowiadają na wskazane w celu pracy zadania badawcze. Treść drugiego wniosku nasuwa pytanie o prawdopodobny mechanizm, poprzez który białko C-reaktywne, związane z CXCL8 i CXCR2, uczestniczy w patogenezie raka żołądka?

Opisana część dysertacji, poprzedza dwie publikacje, stanowiące jej podstawę. Pierwszy artykuł pt. „The role of chemokines in the development of gastric cancer – diagnostic and therapeutic implications” (Int J Mol Sci. 2020) o charakterze przeglądowym, stanowi doskonałe wprowadzenie do tematyki badań naukowych Pani lek. Elżbiety Pawluczuk, podjętych w pracy oryginalnej. Z uwagi na fakt, że GC jest często rozpoznawany w zaawansowanym, często „rozszianym” stadium choroby, istnieje – zdaniem Doktorantki – potrzeba opracowania bardziej czułych i swoistych markerów przydatnych we wczesnym wykrywaniu choroby, jeszcze w fazie bezobjawowej. Potencjalnymi biomarkerami powyższego procesu są przedstawiciele rodziny chemokin, bowiem związki te zaangażowane są w procesy proliferacji, migracji czy apoptozy komórek

nowotworowych, oraz regulują przebieg angiogenezy warunkującej wzrost guza, jak i tworzenie przerzutów. Autorka, w zwięzły sposób, w oparciu o dane z 59 pozycji literaturowych, w tym – 5 prac powstałych w macierzystej Jednostce Uczelni, opisała rolę wybranych chemokin i ich specyficznych receptorów w patogenezie chorób nowotworowych. W sposób szczególny Autorka skupiła się na charakterystyce chemokin z grup CXC, w tym – CXCL8, oraz CCL, w tym – CCL2 i CCL5, sugerując możliwość wykorzystania wybranych przedstawicieli tej heterogennej rodziny białek jako wskaźników rozwoju i progresji GC. Co więcej, związała przebieg omawianej choroby nowotworowej z ekspresją receptorów dla chemokin w błonach komórek nowotworowych, jak również opisała znaczenie interakcji chemokin i ich specyficznych receptorów w progresji GC.

Zdaniem Doktorantki wybrane chemokiny i ich specyficzne receptory odgrywają potencjalną rolę jako przyszłe biomarkery, które mogą być wykorzystane w procesie diagnozowania GC i doboru odpowiedniego leczenia osób chorych. Stąd też, badania podjęte w kolejnej pracy, noszącej tytuł: „Serum CXCL8 and its specific receptor (CXCR2) in gastric cancer” [Cancers (Basel). 2021], stanowią próbę potwierdzenia wcześniej sformułowanej tezy. Autorka oceniła przydatność kliniczną krążącej chemokiny CXCL8 i jej specyficznego receptora – CXCR2 w diagnostyce i prognozowaniu GC, w porównaniu z klasycznymi, rutynowo stosowanymi w procesie diagnostycznym omawianej patologii, markerami nowotworowymi, tj. CA 19-9 i CEA oraz wskaźnikiem procesu zapalnego, tj. CRP.

Ilościowej oceny CXCL8 i jego specyficznego receptora CXCR2 [metodą immunoenzymatyczną, (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*)], oraz stężenia uznanych markerów nowotworowych tj. CEA i CA19-9 [metodą immunochemiczną z użyciem mikrocząsteczek i znacznika chemiluminescencyjnego (CMIA, *chemiluminescence immunoassay*)], oraz CRP (metodą immunoturbidymetryczną) Doktorantka dokonała we krwi 34 zdrowych ochotników z ujemnym wywiadem w kierunku chorób zapalnych i nowotworowych, oraz we krwi 64 chorych na GC, o różnym stopniu zaawansowania klinicznego, leczonych II Klinice Chirurgii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Przeprowadzona przez Doktorantkę ocena statystyczna uzyskanych wyników pozwoliła na stwierdzenie znacząco wyższych – w stosunku do osób zdrowych – stężeń zarówno CXCL8 i CXCR2, jak również CA 19-9 i CRP we krwi pacjentów z nowotworem, co może sugerować, że komórki GC biorą udział w syntezie tych białek. Natomiast, surowicze stężenie CEA było porównywalne w obu analizowanych grupach osób. Co więcej, stopień zaawansowania nowotworu, wielkość guza (cecha T), obecność przerzutów w węzłach chłonnych (cecha N), obecność przerzutów odległych (cecha M) czy stopień zróżnicowania (G), nie wpływały na stężenia CXCL8 i CXCR2. I takiego wniosku zabrakło mi w niniejszej pracy. Doktorantka dowiodła ponadto, że stężenie CXCL8 we krwi osób chorych było istotnie związane ze stężeniem jego specyficznego receptora oraz stężeniami CA 19-9 i wskaźnika procesu zapalnego. Ze stężeniem tego ostatniego białka, tj. CRP korelowało także stężenie CXCR2. Ponadto, surowicze stężenia CXCL8 i CRP, jak wykazały kolejne wyniki badań, są istotnymi czynnikami ryzyka wystąpienia GC. Przeprowadzone przez Autorkę badania pozwoliły także na stwierdzenie wyższej czułości diagnostycznej oznaczeń CXCL8 niż CXCR2 i CEA, zaś porównywalnej z tą wykazaną dla CA 19-9. Połączone pomiary CXCL8 i CXCR2 z klasycznymi markerami nowotworowymi (szczególnie CA 19-9) oraz z CRP zwiększyły czułość diagnostyczną. Natomiast, swoistość diagnostyczna

oznaczeń CXCL8 i CXCR2 były wyższe niż CA 19-9, zaś niższe w stosunku do CRP i CEA. Połączenie pomiarów nie wpływało na poprawę ocenianej wielkości. Podobny, do opisanego w przypadku swoistości diagnostycznej, charakter zmian wykazano dla poziomów dodatniej wartości predykcyjnej oraz ujemnej wartości predykcyjnej (NPV, *negative predictive value*). Jednakże w przypadku tej ostatniej, wartości NPV dla CXCL8 i CXCR2 były wyższe w stosunku do CEA, zaś łączne pomiary sprzyjały nieznacznemu wzrostowi tego parametru. Ponadto, dokładność diagnostyczna (ACC, *accuracy*) CXCL8 była wyższa niż CXCR2 i klasycznych markerów nowotworowych, tj. CEA i CA19-9, ale niższa niż CRP, zaś wartości ACC połączonych pomiarów CXCL8 z CRP i CXCR2 z CA19-9 były najwyższe. Aby ocenić możliwość zastosowania oznaczeń CXCL8 i jego receptora jako na biomarkerów GC, Doktorantka poddała analizie obszary pod krzywymi ROC (AUC, *area under the ROC curve*). I tak, wykazała, że AUC dla CXCL8 było większe niż AUC dla jego receptora CXCR2 oraz CEA i CA19-9 oraz CRP. Ponadto połączona analiza CXCL8 i CRP znacząco zwiększyła AUC.

Po prezentacji wyników Autorka przeprowadziła ich dyskusję odnosząc się do dostępnych danych literaturowych, zarówno zawierających zbieżne jak i odmienne obserwacje. Jednakże zabrakło mi w tej części publikacji próby wyjaśnienia mechanizmów prowadzących do określonych rezultatów.

Całość pracy zamykają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo [nie w pełni opisane jednorodnie, np. pisanie z dużej litery wszystkich wyrazów tytułu danej pracy (poz. 3 czy 7)].

Podsumowując omówiony wyżej cykl prac współtworzących podstawę rozprawy doktorskiej pt. „Znaczenie wybranych chemokin i ich specyficznych receptorów w raku żołądka” stwierdzam, że wyniki badań Pani lek. Elżbiety Pawluczuk, stanowią oryginalny i znaczący wkład do współczesnej wiedzy na temat udziału chemokin i ich receptorów w patogenezie chorób nowotworowych, szczególnie GC, stwarzając jednocześnie przesłanki do wprowadzenia nowych biochemicznych wskaźników przydatnych w diagnostyce i monitorowaniu tych schorzeń. Rezultaty pracy poszerzają bowiem dotychczasową wiedzę na temat możliwości wykorzystania chemokiny CXCL8 i receptora CXCR2 jako biomarkerów GC. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą teoretyczną w podjętym temacie i umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Jednocześnie potwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2022 r. poz.574).

Z pełnym przekonaniem przedkładam Szanownym Członkom Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie lek. Elżbiety Pawluczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.