



Prof. dr hab. Michał Zmijewski,
Kierownik Katedry Histologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
ul. Dębinki 1a, Pokój 32
80-210 Gdańsk, Pomorskie
Polska
Tel: +48 583491455
Email: mzmijewski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 17.05.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana lek. Przemysława Stefaniaka

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej **lek. Przemysława Stefaniaka** jest: „Białko POLD1 jako czynnik prognostyczny w raku jelita grubego i w raku nerki”.

Promotorem pracy jest **Pan dr hab. n. med. Janusz Godlewski, Prof. UWM**, Katedra Histologii i Embriologii Człowieka, Wydział Lekarski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie. Promotorem pomocniczym jest **Pan dr Bartłomiej Emil Kraziński**, Katedra Histologii i Embriologii Człowieka, Wydział Lekarski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

1) Ocena merytoryczna

a) trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Choroby nowotworowe stanowią poważny problem zarówno medyczny, jak i społeczny. Według danych statystycznych Krajowego Rejestru Nowotworów z rakiem zmagają się ok. 1,17 mln osób (rok 2023), w tym około 170 tysięcy to nowe przypadki. Nowotwory są również odpowiedzialne za około 25% zgonów w kraju. Pomimo, znacznego postępu w diagnostyce i terapii, lepsze poznanie mechanizmów powstawania oraz progresji nowotworów oraz poszukiwanie nowych markerów wczesnego wykrywania oraz prognostycznych jest niezbędne.

Polimerazy DNA są odpowiedzialne za przebieg replikacji DNA, który to proces jest niezbędnym elementem przygotowującym komórki do podziału. Niestety zaburzenie tego procesu bardzo często prowadzi do powstawania mutacji, które są jedną z przyczyn powstawania nowotworów. Polimeraza DNA δ , nie tylko uczestniczy w replikacji DNA (syntezie nici opóźnionej), ale również wykazuje aktywność korektorską 3'-5' egzonukleazy, a więc umożliwia naprawę błędnie sparowanych nukleotydów. Tak więc, jej aktywność nie tylko warunkuje proces replikacji DNA, ale również zapobiega mutagenecie.

Głównym celem badawczym rozprawy doktorskiej **lek. Przemysława Stefaniaka** było zbadanie poziomu immunoreaktywności charakterystycznej dla jednostki katalitycznej polimerazy DNA δ - białka POLD1 w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką niezmienną chorobowo, w celu oceny potencjalnego zastosowania tego białka, jako markera

prognostycznego. Uważam, że zarówno wybór białka POLD1 jak i dwóch modeli badawczych - raka jelita grubego (CRC) oraz raka jasnokomórkowego nerki (ccRCC), jest jak najbardziej słuszne, gdyż jak dotąd tematyka ta była dość słabo zbadana, a dostępne dane literaturowe są często przeciwstawne.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przygotowana zastała w formie zbioru manuskryptów, opatrzonych wspólnym wstępem i omówieniem. Tak forma jest zgodna z Art. 179 ust. 6-9 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669 z późn. zm.). Praca zawiera, **75 stron, w tym, przedruki, aż czterech publikacji pełnotekstowych**, które są podstawą przedstawionej do oceny rozprawy. Manuskrypt rozprawy zawiera również oświadczenia współautorów ww. prac dotyczące ich udziału w prezentowanych badaniach oraz określających zaangażowanie doktoranta w powstanie tych prac. Manuskrypt składające się na rozprawę doktorską **lek. Przemysława Stefaniaka** to:

Praca 1.

Stefaniak P, Majewska H, Zadrożny D, Godlewski J. DNA Polymerase Delta 1 Catalytic Subunit (POLD1) as a Prognostic Factor in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients. *Prz Gastroenterol.* 2021;16(4):306-310. doi: 10.5114/pg.2021.111481.

Praca 2

Stefaniak P, Kraziński BE, Kieżun J, Majewska H, Godlewski J. Altered immunoexpression of DNA polymerase delta 1 catalytic subunit (POLD1) in colorectal cancer. *Contemp Oncol (Pozn).* 2023;27(3):147-154.

Praca 3

Prospects of POLD1 in Human Cancers: A Review. Gola M, Stefaniak P, Godlewski J, Jereczek-Fossa BA, Starzyńska A. *Cancers (Basel).* Prospects of POLD1 in Human Cancers: A review e2023 Mar 22;15(6):1905. doi: 10.3390/cancers15061905.

Praca 4

Godlewski J, Stefaniak P, Kieżun J, Krazinski BE. Cancer in a polyp of the large intestine - an interdisciplinary decision problem. *In Vivo.* 2022;36(3):1188-1194. doi: 10.21873/invivo.12818.

W dwóch pracach **lek. Przemysław Stafaniak jest pierwszym autorem**, w jednej jest wymieniony jako drugi autor (**Praca 1**), ale z adnotacją o równocennym udziale z pierwszym autorem. Natomiast w pracy 3 jest drugim autorem. Wszyscy autorzy prac wymienionych w cyklu wyrazili zgodę na przedłożenie w/w manuskryptów składających się na rozprawę doktorską lek. Stefaniaka. Oświadczenia te też jednoznacznie wskazują, że w pracach tych można wyodrębnić części wykazujące indywidualny wkład lekarza Przemysława Stefaniaka w ich powstanie. Warto podkreślić, że oprócz opracowania koncepcji badań, doktorant brał czynny udział w wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu manuskryptów. Natomiast, jeśli chodzi o prace przeglądowe oprócz przygotowania koncepcji pracy i napisania manuskryptu, lek. Przemysław Stefaniak również przygotował do nich tabele oraz wykonał dokumentację zdjęciową preparatów histologicznych. **Wydaje się, więc, że udział lek. Przemysława Stefaniaka w wykonaniu części doświadczalnej oraz przygotowaniu publikacji będących podstawą przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej był znaczący.**

b) opis uzyskanych wyników

Rozprawa doktorska Pana lek. Przemysława Stefaniaka składa się z dwóch publikacji, w których wykorzystano materiał archiwalny Zakładu Histologii i Embriologii Człowieka, Wydziału Lekarskiego, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Były to bloczki

parafinowe z fragmentami guzów ccRCC oraz tkanki potencjalnie niezmienione pochodzące od 56 pacjentów (**Praca 1**). Natomiast do wykonania badań opisanych w **Pracy 2** wykorzystano materiał pobrany od 78 pacjentów z CRC. Dodatkowym atutem przedstawionych prac była dobra dokumentacja kliniczna oparta na wieloletnie obserwacji pacjentów po resekcji guzów nowotworowych (ccRCC lub CRC). W obu pracach wykonano oznaczenie immunoreaktywności tylko jednego białka - POLD1 przy wykorzystaniu specyficznych przeciwciał.

W pierwszej pracy doświadczalnej (Praca 1) porównano immunoreaktywność jądrową POLD1 w komórkach ccRCC oraz komórkach nabłonka kanalików bliższych nerki (stosowanych jako niezmieniona nowotworowo kontrola). Wykorzystując 12 punktową skalę oceny immunoreaktywności wykazano, że względny poziom POLD1 był istotnie wyższy w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką potencjalnie zdrową. Co istotne, podwyższony poziom POLD1 w tkance nowotworowej pozytywnie korelował z całkowitą długością przeżycia pacjentów. Przedstawione wyniki, chociaż uzyskane na stosunkowo niewielkiej grupie pacjentów (56 osób), potwierdzają znaczenie prognostyczne POLD1, w tym nowotworze.

W drugiej pracy z cyklu, wykazano niewielkie obniżenie średniej immunoreaktywności POLD1 w jądrach komórek CRC w porównaniu do kontroli, którą stanowiły komórki prawidłowego nabłonka jelit. Niestety, uzyskane wyniki nie wykazywały korelacji z żadnym z analizowanych parametrów klinicznych. Ten nieco niespodziewany wynik został potwierdzony również przy wykorzystaniu dostępnych w bazie ACGT danych o ekspresji mRNA *POLD1* u 599 pacjentów z CRC. Podobnie jak w badaniach własnych, ekspresja genu *POLD1* nie wykazywała korelacji z parametrami klinicznymi, w tym z całkowitym czasem przeżycia, co wskazuje, że POLD1 nie jest dobrym markerem predykcyjnym w przypadku CRC.

Podsumowując, przedstawione dane wskazują na istotność oznaczania immunoreaktywności POLD1 jako potencjalnego czynnika rokowniczego w ccRCC, ale nie CRC, co sugeruje być może na specyfikę nowotworu, albo na niedostateczną ilość przeprowadzonych badań. Oceniając, artykuły doświadczalne lek. Stefaniaka należy zauważyć, że obie prace opierają się na badaniu tylko jednego markera i ograniczają się do jednej metody, jeśli nie liczyć wykorzystania danych ekspresyjnych z bazy ACGT. Szkoda, że nie określono poziomu immunofluorescencji innych podjednostek polimerazy DNA δ , czy wspomianej we rozprawie i w publikacjach polimerazy DNA ϵ (POLE). We wstępie do rozprawy, **lek. Przemysław Stefaniak** sporo miejsca poświęcił również na dyskusję dotyczącą potencjalnej roli mutacji w genie *POLD1*. Wydaje się, że wykazanie obecności specyficznych mutacji w badanych grupach pomogłoby w interpretacji wyników, zarówno pozytywnych w **Pracy 1**, jako i braku efektu, na który to wskazują dane przedstawione w **Pracy 2**.

Pierwsza z prac przeglądowych (**Praca 3**) jest bezpośrednio związana z tematyką prac doświadczalnych i jest świetnym podsumowaniem obecnego stanu wiedzy na temat potencjalnej roli POLD1 w rozwoju nowotworów oraz zastosowanie tej polimerazy DNA jako czynnika predykcyjnego. Przedstawione wyniki analizy danych literaturowych wydają się potwierdzać obserwacje z **pracy 2**, chociaż prezentowane dane w cytowanej publikacji (*Mol Genet Genomic Med.* 2020 Aug;8(8):e1368.) wskazują nie tylko na obniżony poziom POLD1 u pacjentów z CRC z obszaru Półwyspu Arabskiego, ale również korelują z wielkością guza oraz innymi parametrami klinicznymi. Stosunkowo niedawno ukazała się również, praca

Tian *et al.* (Int J Mol Sci. 2023 Apr 6;24(7):6849), która wydaje się potwierdzać prognostyczną rolę podwyższonej ekspresji POLD1 w ccRCC. Warto podkreślić, że nadal jest mało danych literaturowych dotyczących roli POLD1 w rozwoju nowotworów oraz wykorzystaniu tego genu/białka jako markera, a więc potrzebnych jest więcej badań przeprowadzonych na większych i bardziej zrandomizowanych grupach pacjentów. Taka konkluzja również zawarta jest w podsumowaniu **Pracy 3**. Autorzy wskazują na konieczność dalszych poszukiwań, w celu ustalenia przydatności POLD1 jako markera zaawansowania choroby nowotworowej oraz rokowania.

Ostatnia praca z cyklu (**Praca 4**), chociaż bezpośrednio nie odnosi się do badań nad POLD1, to przynosi ciekawe i potrzebne z klinicznego punktu widzenia omówienie problematyki oceny rozrostu komórek nowotworowych w obrębie polipów na błonie śluzowej jelita grubego. Celem tej pracy był przegląd literatury oraz przedstawienie racjonalnych podstaw naukowych oraz klinicznych, które ułatwiłyby postępowanie terapeutyczne (dalsza obserwacja kolonoskopowa czy resekcja odcinka jelita grubego w obrębie polipa) w przypadku stwierdzenia rozplenu komórek raka gruczołowego w obrębie polipa. Co istotne, praca uwzględnia również, czynniki ryzyka oraz ogólny stan pacjenta. Dodatkowo, praca jest wzbogacona o własną dokumentację mikrofotograficzną ilustrującą omawianą tematykę.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opiera się na spójnie tematycznym cyklu czterech publikacji, z jasno określonym znaczącym udziałem lekarza Przemysława Stefaniaka w pełni spełniającego wymagania ustawowe w przewodzie doktorskim.

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna, sposób prezentacji.

Rozprawa napisana jest poprawnie pod względem językowym, z niewielkimi tylko błędami powstałymi na etapie edycji, które w żadnej mierze nie utrudniają czytania pracy. W ramach uwag, nie do końca wydaje się trafne określenie natężenie proliferacji komórkowej.

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury

Sama treść rozprawy doktorskiej **Pana lek. Przemysława Stefaniaka** zawiera szereg dobrze dobranych odnośników literaturowych. Co ciekawe praca przeglądowa (**Praca 3**), zawiera ponad 100 cytacji, a **Praca 4**, również przeglądowa jedynie 10. Być może jednak niewielka liczba cytacji w **Pracy 4**, wynika z pewnych ograniczeń narzuconych przez redakcję.

b) poprawność formułowania problemów i hipotez (założeń badawczych).

Rozprawa doktorska **lek. Przemysława Stefaniaka**, wymienia aż 9 rozbudowanych celów badawczych, które bardzo słusznie uproszczone są do spójnej i trafnej hipotezy badawczej, wskazującej na potencjalny związek poziomu ekspresji POLD1 w komórkach nowotworowych (na modelu CRC i ccRCC) a proliferacją komórek oraz innymi wskaźnikami progresji choroby oraz przeżyciem pacjentów. Należy podkreślić, że przedstawione publikacje stanowią próbę potwierdzenia hipotezy, jednak jak to bywa z pracą naukową, uzyskane wyniki stanowią, dobrze rokujący wstęp do dalszych badań na większej grupie pacjentów. Natomiast prace przeglądowe stanowią z jednej strony omówienie uzyskanych badań w świetle dostępnej literatury (**Praca 3**), oraz ciekawy dodatek zawierający praktyczne wskazówki dla klinicystów (**Praca 4**).

c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania.

W przedstawionych badaniach lek. Przemysław Stefaniak wykorzystał dwa główne modele badawcze: **materiał archiwalny w postaci bloczków parafinowych pochodzących od pacjentów z CRC lub ccRCC**. W badaniach wykorzystano w zasadzie jedną technikę laboratoryjną, a więc oznaczenie immunohistochemiczne immunoreaktywności charakterystycznej dla białka POLD1. Z drugiej strony, istotną częścią przedstawionych prac jest analiza uzyskanych danych oraz próba wykazania korelacji między poziomem POLD1 a parametrami klinicznymi. Dodatkowo, przy wykorzystaniu danych z bazy ACGT dokonano również oceny wpływu ekspresji POLD1 na markery procesu nowotworzenia oraz śmiertelność. Ciekaw jestem czy autor sam wykonywał analizy statystyczne.

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.

Praca jest bardzo krótka i ograniczona do 29 stron po wyłączeniu przedruków dwóch publikacji oraz dodatku stanowiącego oświadczenia współautorów. Wydaje się to jednak optymalne dla tego typu opracowań. Układ pracy jest odpowiedni, gdyż rozprawa zawiera: spis treści; wykaz prac będących podstawą rozprawy doktorskiej; wykaz skrótów; streszczenie oraz słowa kluczowe (w języku polskim i angielskim); wstęp, hipotezę badawczą oraz cele szczegółowe. Rozprawa zawiera również wydzielony rozdział poświęcony zakresowi badań oraz metodyce. Kolejny rozdział, to omówienie poszczególnych prac, po którym następuje podsumowanie oraz pięć dobrze sformułowanych wniosków. Do pracy dołączono również publikacje będące podstawą rozprawy oraz oświadczenia współautorów. Szkoda tylko, że nie ma dyskusji, co jest bardzo częste w przypadku prac doktorskich opartych na publikacjach. Warto jednak podkreślić, że pierwsza z prac przeglądowych (Praca 3), stanowi zarówno dogłębną analizę literatury jak i właśnie dyskusję na temat potencjalnego wykorzystania POLD1 jako markera w onkologii.

3) wnioski końcowe.

Podsumowując, rozprawa doktorska lek. Przemysława Stefaniaka oparta jest na czterech publikacjach (dwóch pracach doświadczalnych i dwóch poglądowych), które ukazały się w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Cennym wnioskiem a zarazem zachętą do dalszych badań jest obserwacja, wskazująca na to, że poziom POLD1 może być wykorzystany jako marker w onkologii, jednak jego potencjalna użyteczność w dużej mierze zależy od typu nowotworu.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.), dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Medycznej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, wniosek o dopuszczenie Pana lek. Przemysława Stefaniaka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Katedra i Zakład Histologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
prof. dr hab. n. med. Michał Żmijewski



Kierownik

Gdańsk, dnia 17.05.2024

Prof. dr hab. Michał Żmijewski

