

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

mgr Darii Haręza

pt. „Zakażenie ludzkim wirusem brodawczaka typu 16 i polimorfizm genów kodujących receptory Toll-podobne jako czynniki ryzyka raka jajnika”

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem **prof. dr hab. Edyty Paradowskiej** oraz promotora pomocniczego – **dr Katarzyny Kani**, w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej BioMedChem Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutów PAN w Łodzi.

Badania przeprowadzono w Pracowni Wirusologii Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki nr 2019/33/B/NZ7/02872 (OPUS-17) pt. „Badania mechanizmów molekularnych związanych z zakażeniami HPV i CMV w patogenezie raka jajnika”.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska oparta jest na cyklu następujących publikacji:

1. **Haręza, D. A.**, Wilczyński, J. R., Paradowska, E. (2022). Human papillomaviruses as infectious agents in gynecological cancers. Oncogenic properties of viral proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1818.
2. Paradowska, E.*, **Haręza, D. A.***, Kania, K. D., Jarych, D., Wilczyński, M., Malinowski, A., Kawecka, M., Nowak, M., Wilczyński, J. R. (2024). Human papillomavirus infection of the fallopian tube as a potential risk factor for epithelial ovarian cancer. *Scientific Reports*, 14(1), 21602.
3. Kania, K. D., **Haręza, D.**, Wilczyński, J. R., Wilczyński, M., Jarych, D., Malinowski, A., Paradowska, E. (2022). The Toll-like receptor 4 polymorphism Asp299Gly is associated with an increased risk of ovarian cancer. *Cells*, 11(19), 3137.
4. **Haręza, D.A.**, Kania, K.D., Jarych, D., Wilczyński, J.R., Wilczyński, M., Malinowski, A., Paradowska, E. (2025). *TLR8* and *TLR9* gene polymorphisms and the risk of high-grade serous ovarian cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 313:144259.

Ogromnym wyzwaniem zdrowia publicznego zarówno w Polsce jak i na świecie w XXI wieku jest systematyczny wzrost zachorowalności na nowotwory, na co wskazują analizy epidemiologiczne WHO, Międzynarodowej Agencji Badań Nad Rakiem (IARCC) oraz Międzynarodowej Unii Przeciwrakowej (UICC).

W Europie rocznie chorobę nowotworową rozpoznaje się u 1,7 mln osób, zaś 962 000 chorych umiera. Przewiduje się dalszy systematyczny wzrost zarówno zachorowalności jak i umieralności z tego powodu. Szacuje się, że w 2045 roku liczba nowych przypadków nowotworów sięgnie 32,6 mln. W Polsce rocznie rozpoznaje się 160 000 nowych przypadków zachorowań i ponad 90 000 zgonów. Przyczynami tego zjawiska są zmiany w strukturze demograficznej populacji (starzenie się populacji), narażenie na karcinogeny oraz przewlekłe zakażenia. Niekorzystna sytuacja epidemiologiczna powoduje, że wiele ośrodków naukowych prowadzi badania nad czynnikami sprzyjającymi onkogenezie.

Onkogeneza jest procesem wieloetapowym z długim okresem utajenia, kiedy to komórka prawidłowa zmienia swój fenotyp na nowotworowy. Wskutek gromadzenia się zmian genetycznych komórki nowotworowe uzyskują zdolność do niekontrolowanych podziałów, zatrzymania procesów apoptozy, stymulacji angiogenezy czy wreszcie naciekania i tworzenia przerzutów. Oprócz czynników środowiskowych i stylu życia do rozwoju nowotworów przyczyniają się zakażenia wirusami onkogennymi, w tym także wirus brodawczaka ludzkiego Human Papillomavirus (HPV).

Do zakażenia wirusem dochodzi poprzez kontakt z naskórkiem lub drogą płciową. Do zakażenia noworodków może dojść podczas porodu. Ocenia się, że nawet 50% populacji ludzkiej przechodzi zakażenie HPV w ciągu całego życia. Najczęściej do kontaktu z wirusem dochodzi w wieku 16-26 lat, czyli w okresie rozpoczęcia aktywności płciowej. Zakażenie może przebiegać bezobjawowo, a wirus może przetrwać w organizmie w fazie latencji. Większość infekcji zwalczana jest przez układ immunologiczny. Natomiast przewlekłe, zakażenie, szczególnie u osób z obniżoną odpornością, może prowadzić do rozwoju nowotworu.

Wirus wykazuje tropizm do komórek nabłonkowych skóry i błon śluzowych. Dotychczas opisano ponad 200 typów HPV. Ze względu na potencjał onkogenny wyróżniono dwie grupy wirusów, tj. niskiego ryzyka onkogenego oraz wysokiego ryzyka onkogenego. Wirusy niskiego ryzyka onkogenego powodują zmiany łagodne, takie jak: brodawki na skórze, kurzajki czy kłykciny kończyste. Wirusy wysoce onkogenne biorą udział w patogenezie raka szyjki macicy, raka prącia, pochwy, penisa, jelita grubego i raka ustnej części gardła.

Rak jajnika jest również poważnym problemem zdrowia publicznego, gdyż jest siódmym najczęściej występującym nowotworem u kobiet oraz szóstą przyczyną zgonów na świecie. Zachorowalność na raka jajnika wzrasta, zwłaszcza w krajach wysoko rozwiniętych. Nieswoiste objawy w początkowym okresie powodują, że większość przypadków (około 80%) rozpoznawana jest w zaawansowanym stadium klinicznym stąd rokowanie jest niekorzystne.

Z grupy HPV o wysokim potencjale onkogennym najczęściej występują i mają udowodniony związek z rozwojem nowotworów złośliwych dwa typy, tj. HPV 16 i HPV 18.

Główną rolę w procesie transformacji nowotworowej odgrywają dwa geny HPV, tj. *E6* i *E7*. Produkty białkowe tych genów, tzw. onkoproteiny poprzez wiązanie się z białkami supresorowymi, zaburzają cykl komórkowy, apoptozę oraz odpowiedź immunologiczną. Mianowicie białko *E6* wiąże się z białkiem supresorowym p53, Natomiast białko *E7* wiąże się z białkiem retinoblastoma (pRB). W wyniku tych procesów dochodzi do zahamowania apoptozy, deregulacji cyklu komórkowego i zwiększenia genomowej niestabilności.

We współczesnej onkologii coraz większą rolę odgrywa terapia celowana. Pomimo klasyfikacji klinicznej i oceny patologicznej potrzebne są dokładne narzędzia do identyfikacji określonych podgrup pacjentów. Dlatego stale poszukuje się nowych biomarkerów nowotworowych o dodatniej wartości predykcyjnej.

Wybór tematu przez Doktorantkę jest zatem uzasadniony i wpisuje się w światowy trend badań nad rolą wirusów w onkogenezie.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 131 stron wydruku komputerowego. Układ pracy i kolejność rozdziałów są typowe dla prac doktorskich (Wstęp, Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki badań, Omówienie wyników i dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo). Do pracy dołączono streszczenie w języku polskim i angielskim, spis rycin i tabel oraz wykaz skrótów używanych w pracy.

We Wstępie zawartym na 25 stronach Autorka omówiła budowę i funkcje jajnika. Następnie scharakteryzowała nowotwór jajnika, jego epidemiologię, klasyfikację histopatologiczną, czynniki ryzyka rozwoju raka jajnika. Kolejny podrozdział poświęcony jest HPV i jego roli w rozwoju nowotworów.

Główny cel pracy (rozdział 2) oraz cele pośrednie zostały sformułowane w sposób jasny i precyzyjny.

Rozdział 5 Materiały i metody zawiera opisy stosowanych w doświadczeniach własnych odczynników, hodowli komórkowych, zestawów do izolacji, amplifikacji i detekcji materiału genetycznego wirusa. W części Metody opisano szczegółowo procedury hodowli komórek, izolacji DNA, RNA metodą PCR i RT PCR oraz badań serologicznych. Doktorantka posługiwała się także komercyjnie dostępnymi zestawami diagnostycznymi a wszystkie badania doświadczalne zostały wykonane zgodnie z instrukcją producentów testów.

Każdy nowotwór rozwija się w pewnym mikrośrodku złożonym z komórek prawidłowych i nowotworowych, umożliwiającym komórkom nowotworowym ucieczkę przed mechanizmami obronnymi gospodarza, z drugiej zaś strony sprzyja angiogenezie, czyli powstawaniu nowych naczyń.

Głównym założeniem Doktorantki była ocena częstości występowania zakażeń HPV o wysokim potencjale onkogennym u kobiet z rakiem jajnika oraz identyfikacja genetycznych czynników ryzyka rozwoju choroby związanych z polimorfizmem w genach kodujących wybrane receptory Toll-podobne. Aby osiągnąć zamierzony cel Autorka sformułowała kilka celów pośrednich, tj. ocenę

1. częstości występowania typów HPV16 i HPV18 w guzach jajnika i strzępkach jajowodu u kobiet z pierwotnym rakiem jajnika (w tym typu HGSOE), przerzutami do jajnika z innych narządów i guzami łagodnymi oraz określenie wpływu zakażenia HPV na ryzyko występowania raka jajnika.
2. poziomu ekspresji wybranych genów gospodarza uczestniczących w szlakach sygnałowych związanych z karcynogenezą (m.in. *TP53*, *RB1*, *CDKN2A*, *c-MYC*, *NFKB1*, *MDM2* i *E2F*) w klonach komórkowych z nadekspresją genów *E5*, *E6* i *E7* HPV16 oraz w materiałach tkankowych z przypadków raka jajnika.
3. częstości występowania wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w genach *TLR4*, *TLR8* i *TLR9* oraz ryzyka występowania raka jajnika.

Publikacja nr 1 jest pracą przeglądową na temat patogenyzy nowotworów ginekologicznych związanych z HPV i możliwego udziału HPV w rozwoju raka jajnika. Omówiono także morfologiczne i genetyczne aspekty biologii wirusa HPV, onkogenne właściwości białek wirusowych i ich wpływ na szlaki sygnałowe.

W badaniach doświadczalnych (Publikacje 2 – 4) wykorzystano materiały kliniczne, tj. wycinki guzów, strzępek jajowodów oraz krew pełną otrzymane od kobiet z podejrzeniem raka jajnika lub innymi nienowotworowymi chorobami dróg rodnych, a także hodowle komórek nabłonkowych raka jajnika (SK-OC-3, OVCAR-3) i raka szyjki macicy (Ca Ski, HeLa) oraz hodowlę pierwotną raka jajnika.

Wyniki badań zostały bardzo szczegółowo opisane oraz przedstawione graficznie na 25 rycinach. Piśmiennictwo liczy 361 pozycji, w zasadzie literatury anglojęzycznej i jest prawidłowo cytowane w pracy.

Dyskusję Doktorantka zawarła na 10 stronach maszynopisu, gdzie przeprowadziła szczegółową analizę wyników badań własnych na tle wyników uzyskanych przez innych autorów. Krytyczna ocena piśmiennictwa świadczy o dużej znajomości tematu i bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Autorki.

Wyniki badań Doktorantki wykazały, że zakażenie HPV16/18 występowało u około 50% badanych kobiet z rakiem jajnika, zarówno w guzach, jak również w strzępkach jajowodów. HPV16 był najczęściej wykrywanym typem wirusa i wykryto go w ponad 30% badanych materiałów.

Ponadto Doktorantka wykazała istnienie silnego związku między występowaniem polimorfizmu *TLR8* -129C>G a zwiększonym ryzykiem EOC, szczególnie typu HGSOE. Obecność mutacji wiązała się również ze zwiększoną ekspresją mRNA *TLR8*, co potencjalnie może aktywować szlak MyD88/NF- κ B a tym samym wpływać na odpowiedź immunologiczną w mikrośrodowisku nowotworu (TME).

Nie stwierdzono związku polimorfizmów z obecnością HPV16, HPV18, co wskazuje, że rozwój nowotworu jest związany z zaburzeniami funkcji TLRs i nie zależy od zakażenia wirusowego. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują na polimorfizmy *TLR4* Asp299Gly i *TLR8* -129C>G jako potencjalne biomarkery podatności zachorowania na raka jajnika.

Ponadto Autorka wykazała, że wysokie stężenia IL-6, IL-10 i TNF- α w surowicy są związane z występowaniem guzów złośliwych jajnika, natomiast stężenia IFN wykazują słabą dodatnią korelację z wiramią HR-HPV.

Z obowiązku recenzenta chcę zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia, które jednak nie umniejszają wartości pracy.

1. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska zawiera liczne powtórzenia, co utrudnia analizę tekstu. Prawdopodobnie wynika to z próby połączenia klasycznego doktoratu z rozprawą opartą na cyklu publikacji.
2. Doktorantka analizowała poziom cytokin w surowicy badanych kobiet, ale nie uwzględniła tego w celach badawczych.
3. Rozdział 3 i 6 zawierają przedstawienie wyników badań i powinny stanowić jeden logicznie powiązany rozdział.

4. Brak jest jasno wypunktowanych wniosków z przeprowadzonych badań, które zastąpiono opisowym podsumowaniem.

Reasumując stwierdzam, że Kandydatka wykazuje dużą wiedzę teoretyczną w zakresie omawianego tematu. Do rozwiązania postawionych celów wykorzystała szeroki wachlarz metod badawczych co potwierdza Jej umiejętność do samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Otrzymane przez Doktorantkę wyniki badań mają nie tylko wartość poznawczą, ale i znaczenie praktyczne w ewentualnym opracowaniu postępowania diagnostycznego i terapeutycznego, zwłaszcza w immunoterapii. Jednak, jak słusznie zauważa Autorka, badania powinny być kontynuowane na większych grupach pacjentek, aby potwierdzić własne obserwacje.

Uważam, że praca mgr Darii Haręza pt. ***Zakażenie ludzkim wirusem brodawczaka typu 16 i polimorfizm genów kodujących receptory Toll-podobne jako czynniki ryzyka raka jajnika***” stanowi Jej oryginalny dorobek i spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce.

Przeto mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej IBN PAN w Łodzi wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Darii Haręza do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. Jednocześnie, z uwagi na wagę problemu, dużą pracowitość badań oraz zastosowane nowoczesne techniki badawcze, stawiam wniosek o wyróżnienie w/w rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK
Zakładu Wirusologii
z Pracownią Diagnostyki Wirusologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Prof. dr hab. n.med. Małgorzata Polz-Dacewicz