

*Klinika Chirurgii Nowotworów Głowy i Szyi  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Oddział Laryngologii Onkologicznej  
Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii*

**Kierownik: prof.zw.dr hab. n.med. Alina Morawiec-Sztandera**

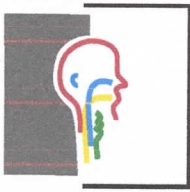
## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej  
mgr Moniki Lesickiej**

**pt.: „Analiza profilu metylacji i ekspresji kluczowych genów rytmu okołodobowego w raku piersi”**

Profilatyka pierwotna raka piersi, poprzez kontrolowanie czynników ryzyka, jest kluczowa. Do poznanych, modyfikowalnych lub nie-modyfikowalnych czynników ryzyka tego nowotworu zaliczamy: płeć żeńską, wzrastający wiek, przebyty rak piersi, przebyte patologie wysokiego ryzyka gruczołu piersiowego, przebytą radioterapię klatki piersiowej, szczególnie w młodym wieku, np. z powodu chłoniaka Hodgkina, wzorce prokreacyjno-hormonalne egzo- i endogenne (tj. wiek podczas pierwszej i ostatniej miesiączki, ciąży, menopauzalna terapia hormonalna, antykoncepcja, etc), czynniki genetyczne: mutacje BRCA1, 2, TP53, STK11, PTEN, ATM, PALB2, CHEK2, styl życia: aktywność fizyczną, dietę, alkohol, tytoń, etc. Niektóre czynniki ryzyka pozostają nieznane. Dlatego też praca Doktorantki, dotycząca szczegółowej analizy kluczowych genów rytmu okołodobowego u Chorych na raka piersi, doskonale wpisuje się w powyższą tendencję identyfikacji nowych czynników ryzyka oraz nowych genów. Przedstawiona mi do recenzji dysertacja obejmuje cykl 3 prac monotematycznych, o łącznym, imponującym wskaźniku wpływu (impact factor IF) = 9,521, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Szczegółowy spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej przedstawia się następująco:

1. **Lesicka M.**, Jabłońska E., Wieczorek E., Seroczyńska B., Siewkierzycka A., Skokowski J., Kalinowski L., Wąsowicz W., Reszka E. Altered circadian genes expression in breast cancer tissue according to the clinical characteristics PLoS ONE 13(6): e0199622; 2018; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199622>



*Klinika Chirurgii Nowotworów Głowy i Szyi  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Oddział Laryngologii Onkologicznej  
Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii*

**Kierownik: prof.zw.dr hab. n.med. Alina Morawiec-Sztandera**

Praca oryginalna

IF=2,7

1.2. **Lesicka M.**, Jabłońska E., Wieczorek E., Seroczyńska B., Skokowski J., Kalinowski L., Reszka E. A different methylation profile of circadian genes promoter in breast cancer patients according to clinicopathological features, *Chronobiology International*, 36:8, 1103-1114, 2019; DOI: 10.1080/07420528.2019.1617732

Praca oryginalna

IF=2,562

1.3 **Lesicka M.**, Jabłońska E., Wieczorek E., Pepłońska B., Gromadzinska J., Seroczyńska B., Kalinowski L., Skokowski J., Reszka E. Circadian gene polymorphisms associated with breast cancer susceptibility.

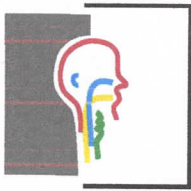
*International Journal of Molecular Sciences*  
2019, 20(22), 5704; <https://doi.org/10.3390/ijms20225704>

Praca oryginalna

IF=4,183

Cykl publikacji w języku angielskim, poprzedzony jest w dysertacji w języku polskim oraz angielskim analizą bibliometryczną, wstępem, celami pracy, materiałem i metodami, wynikami badań i podsumowaniem, wnioskami, piśmiennictwem oraz oświadczeniami współautorów publikacji.

**Wstęp** zawarty jest na 6 stronach. Jest napisany przejrzyście, stanowi syntezę poglądów dotyczących wieloczynnikowej etiopatogenezy raka piersi, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów molekularnych, a także rozkładu wariantów polimorficznych głównych genów zegarowych. Rozwinięcie wstępu znajdujemy w cyklu 3 załączonych prac

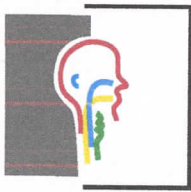


**Kierownik: prof.zw.dr hab. n.med. Alina Morawiec-Sztandera**  
monotematycznych, stanowiących dysertację. Ta część pracy świadczy o umiejętności  
**Doktorantki korzystania z piśmiennictwa i wielopłaszczyznowego zrozumienia  
badanego zagadnienia.**

**Cel i założenia pracy sprecyzowano jednoznacznie, rzeczowo na jednej stronie  
maszynopisu. Doktorantka postawiła sobie za zadanie badawcze:**

1. Zbadanie, czy istnieje różnica pomiędzy ekspresją genów *CLOCK*, *BMAL1*, *NPAS2* oraz *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *TIMELESS*, *CSNK1ε* w tkance guza piersi o różnej charakterystyce histopatologicznej i klinicznej w odniesieniu do tkanki otaczającej guz, wolnej od komórek nowotworowych?  
**(publikacja 1.1)**
2. Zbadanie, czy istnieje zależność pomiędzy określonymi parametrami klinicznymi: klasyfikacja TNM (guz, węzły chłonne, przerzuty) i G (zróżnicowanie guza), typ histopatologiczny (rak przewodowy, rak zrazikowy), charakterystyka pod względem obecności receptorów ER i PR u pacjentek z rakiem piersi a ekspresją genów zegarowych *CLOCK*, *BMAL1*, *NPAS2* oraz *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *TIMELESS*, *CSNK1ε*?  
**(publikacja 1.1)**
3. Zbadanie, czy istnieje różnica pomiędzy profilem metylacji genów *CLOCK*, *BMAL1* oraz *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *TIMELESS* w tkance guza piersi o różnej charakterystyce histopatologicznej i klinicznej w odniesieniu do tkanki otaczającej guz, wolnej od komórek nowotworowych?  
**(publikacja 1.2)**
4. Zbadanie, czy istnieje zależność pomiędzy określonymi parametrami klinicznymi: klasyfikacja TNM (guz, węzły chłonne, przerzuty) oraz G (zróżnicowanie guza), typ histopatologiczny (rak przewodowy, rak zrazikowy), charakterystyka pod względem obecności receptorów dla ER, PR, liczba i rozmiar guzów u pacjentek z rakiem piersi a profilem metylacji regionów promotorowych genów zegarowych





**Kierownik: prof.zw.dr hab. n.med. Alina Morawiec-Sztandera**  
*CLOCK, BMAL1* oraz *PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2*?

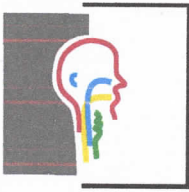
**(publikacja 1.2)**

5. Zbadanie, czy istnieje zależność pomiędzy metylacją a ekspresją genów *CLOCK, BMAL1* oraz *PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2* w tkance guza oraz w tkance otaczającej guz? **(publikacja 1.2)**
6. Zbadanie, czy istnieje zależność pomiędzy polimorfizmem genetycznym (SNP) wybranych genów zegarowych a ryzykiem zachorowania na raka piersi? **(publikacja 1.3)**
7. Zbadanie, czy istnieje zależność pomiędzy polimorfizmem genetycznym a poziomem ekspresji wybranych genów zegarowych u pacjentek chorych na raka piersi – poszukiwanie funkcjonalności SNPs. **(publikacja 1.3)**

Rozdział dotyczący **materiału i metod** użytych w badaniach obejmuje 5 stron i opisuje szczegółowo badaną grupę 321 chorych na raka piersi oraz 364 zdrowych ochotniczek. U 107 Chorych pobrano 107 próbek par tkanek: z raka oraz tkanki otaczającej guz, izolowano DNA i RNA, dokonano analizy ekspresji 9 genów zegarowych (publikacje 1.1, 1.2, 1.3), analizy metylacji 8 genów zegarowych (publikacja 1.2), genotypowano 16 SNP głównych genów zegarowych (publikacja 1.3). Ponadto u dodatkowych 214 Chorych oraz 364 zdrowych kobiet genotypowano 16 SNP głównych genów zegarowych (publikacja 1.3).

Na kolejnych 6 stronach Doktorantka relacjonuje **wyniki badań, niezwykle skrupulatnie**, nawiązując do czytelnych wykresów i tabel bardzo dobrze ilustrujących uzyskane dane oraz pełnego tekstu wyników zawartych w poszczególnych publikacjach. **Jest to dowód rzetelnej analizy najważniejszych parametrów klinicznych. Do najważniejszych wyników pracy doktorskiej należą:**

1. Tkanki nowotworowe charakteryzowały się istotnie wyższym poziomem ekspresji dla genów *CLOCK* oraz *TIMELESS* w odniesieniu do tkanki okołonowotworowej. Natomiast geny *PER1, PER2, PER3, CRY2* charakteryzowały się istotnie obniżonym poziomem ekspresji w tkance guza w odniesieniu do tkanki otaczającej guz. **(publikacja 1.1)**



**Kierownik: prof.zw.dr hab. n.med. Alina Morawiec-Sztandera**

2. Stopień zaawansowania (TNM) choroby wpływa na poziom ekspresji genu *CRY2* w tkance nowotworowej. Stopień złośliwości histologicznej (G) oraz status hormonalny guza wpływa na poziom ekspresji wybranych genów zegarowych *CRY2*, *PER1*, *PER2*, *PER3* w tkance guza. **(publikacja 1.1)**

3. Zaobserwowano istotnie obniżony poziom metylacji regionów promotorowych dla genów *BMAL1*, *CLOCK*, *CRY2* w tkance nowotworowej w odniesieniu do tkanki otaczającej guz. Odwrotną zależność wykazano dla genów *PER1*, *PER2*, *PER3*, gdzie tkanki guza charakteryzowały się istotnie wyższym poziomem metylacji regionów promotorowych w odniesieniu do tkanki okołonowotworowej. **(publikacja 1.2)**

4. Istotne zmiany we wzorze metylacji regionów promotorowych zaobserwowano dla genów *PER1*, *PER2*, *PER3* w odniesieniu do tkanek nowotworowych o wyższej złośliwości histologicznej (G) jak i hormonalnej (ER-/PR-). **(publikacja 1.2)**

5. Nadekspresja genu *CLOCK* może być związana z hipometylacją regionu promotorowego wskazanego genu. Hipermetylacja regionów promotorowych genów supresorowych z grupy PERIOD może wpływać na obniżoną ekspresję tych genów i zaburzenie ich supresorowej funkcji. **(publikacja 1.2)**

6. Polimorfizm genetyczny genów zegarowych może wpływać na ryzyko zachorowania na raka piersi w populacji polskich kobiet. Prawdopodobny efekt ochronny można wskazać dla polimorfizmu genu *BMAL1* rs2279287. Natomiast polimorfizmy genów *CRY2* rs10838524, *PER1* rs2735611, *PER2* rs934945 charakteryzują się prawdopodobnie podwyższonym ryzykiem zachorowania raka piersi w badanej populacji. **(publikacja 1.3)**



**Kierownik: prof.zw.dr hab. n.med. Alina Morawiec-Sztandera**

7. Polimorfizm genetyczny badanych genów zegarowych może wpływać na poziom transkrypcji genów zarówno w tkance otaczającej guz (*PER1, PER2*), jak i w tkance guza (*BMALI, CRY2, PER3*).  
**(publikacja 1.3)**

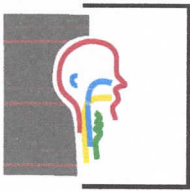
**Dyskusja** zawarta jest w tekście poszczególnych publikacji. Oparta jest o dobrze wyselekcjonowane piśmiennictwo, merytoryczna. Akcentuje własne poglądy Autorki w kontekście diskutowanych wyników innych badaczy.

W oparciu o przeprowadzone badania oraz analizę biostatystyczną, zawarte w cyklu 3 prac monotematycznych, po przedstawieniu wyników, Autorka dysertacji sformułowała 7 wniosków będących jednoznaczną odpowiedzią na ustalone cele pracy. Wnioski są wyważone i wynikają z przeprowadzonych badań i ich dogłębnej analizy. Przedstawione wnioski to:

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować iż kluczowe geny zegarowe mogą pełnić rolę w procesie nowotworzenia w gruczole piersiowym.

1. Istnieje różnica w poziomie transkrypcji wybranych genów zegarowych w tkance guza w odniesieniu do tkanki otaczającej guz, co może świadczyć o ich wpływie na proces kancerogenezy w gruczole piersiowym.
2. Istnieje zależność pomiędzy poziomem transkrypcji genów zegarowych a określonymi parametrami klinicznymi pacjentek z rakiem piersi.
3. Istnieje zmieniony wzorzec metylacji regionów promotorowych wybranych genów zegarowych w tkance guza w odniesieniu do tkanki otaczającej guz, co może świadczyć o jego wpływie na proces transformacji nowotworowej w gruczole piersiowym.





**Klinika Chirurgii Nowotworów Głowy i Szyi  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Oddział Laryngologii Onkologicznej  
Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii**

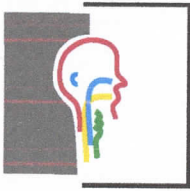
**Kierownik: prof.zw.dr hab. n.med. Alina Morawiec-Sztandera**

4. Zmiany na poziomie epigenetycznym w regionach promotorowych badanych genów zegarowych w tkance guza korespondują ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej w gruczole piersiowym.
5. Metylacja regionów promotorowych genów zegarowych może wpływać na poziom ekspresji tych genów w tkankach pochodzących z gruczołu piersiowego pacjentek z rakiem piersi.
6. Polimorfizm genetyczny pojedynczych nukleotydów badanych genów zegarowych może modulować ryzyko zachorowania na raka piersi.
7. Polimorfizm genetyczny badanych genów zegarowych może wpływać na poziom transkrypcji tych genów zarówno w tkance otaczającej guz, jak i tkance guza.

Stwierdzenia te są ważne i dlatego też znalazły rozwinięcie w postaci 3 publikacji w recenzowanych periodykach medycznych.

**Wnikliwa lektura rozprawy pozwoliła wykryć drobne uchybienia, które w żaden jednak sposób nie umniejszają wartości merytorycznej pracy:**

1. hormonalna terapia zastępcza, prestiżowe czasopismo Lancet w roku 2019, rekomenduje użycie nazewnictwa menopauzalna terapia hormonalna (*menopausal hormone therapy* MHT)
2. str. 12, 13, 15, 23 rak sutka, proszę poprawić. Tak jak w pozostałej części dysertacji powinno być użyte: rak piersi
3. str. 9, „do najczęstszych czynników ryzyka można zaliczyć wiek kobiet poniżej 50 roku życia”. Należy to stwierdzenie poprawić i uzupełnić, gdyż wzrastający wiek jest czynnikiem ryzyka zachorowania na raka piersi: Europejskie



*Klinika Chirurgii Nowotworów Głowy i Szyi  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Oddział Laryngologii Onkologicznej  
Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii*

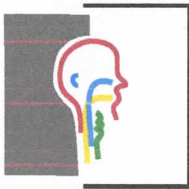
Kierownik: prof.zw.dr hab. n.med. Alina Morawiec-Sztandera  
Towarzystwo Chirurgii Onkologicznej, grupa Raka piersi, podaje, iż 10-letnie ryzyko rozwoju raka piersi dla kobiety 20-letniej to 1:1732; dla kobiety 40-letniej w ciągu 10 lat to 1:69; a dla kobiety 70-letniej 1:26. Jedna spośród ośmiu kobiet w ciągu całego swojego życia zachoruje na raka piersi. Kobiety poniżej 50 czy 40 roku życia, istotnie statystycznie częściej chorują np. na raka piersi związanego z mutacją BRCA.

Po dokładnej lekturze dysertacji Pani mgr Moniki Lesickiej oceniam ją wysoko. Jest to wieloaspektowe opracowanie materiału badawczego, posiadające wymiar praktyczny, zwłaszcza w aspekcie genetyki, epigenetyki i prewencji raka piersi np. poprzez modyfikację stylu życia, pracy zawodowej zmianowej, nawyków socjalnych, higieny snu, z precyzyjnym uwzględnieniem rytmu dobowego w aspekcie czynników genetycznych i epigenetycznych „zegarowych”.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że oceniana praca mgr Moniki Lesickiej pt. „Analiza profilu metylacji i ekspresji kluczowych genów rytmu okołodobowego w raku piersi” spełnia kryteria przypisane rozprawom na stopień naukowy doktora określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668). Dlatego też zwracam się z pełnym przekonaniem do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Moniki Lesickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Kołacińska-Voytkuv  
specjalista chirurg  
Ex-member of the Board of Directors of the European Society of Surgical Oncology  
Hon. European Board of Surgery Qualification in Breast Surgery  
Hon. European Board of Surgery Qualification in Surgical Oncology





**Klinika Chirurgii Nowotworów Głowy i Szyi  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Oddział Laryngologii Onkologicznej  
Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii**

**Kierownik: prof.zw.dr hab. n.med. Alina Morawiec-Sztandera**

Breast Cancer Unit  
Klinika Chirurgii Nowotworów Głowy i Szyi  
Oddział Chirurgii Onkologicznej  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Centrum Onkologii w Łodzi  
ul.Paderewskiego 4  
93-509 Łódź  
tel. 42 689 54 61  
email: agnieszka.kolacinska@umed.lodz.pl

Łódź, 2020/3/3