



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 10 kwietnia 2025

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
Zakład Biofizyki i Biologii Nowotworów
Prof. dr hab. Martyna Elas

Recenzja pracy doktorskiej pani Olgi Kuźmycz pt. „Udział mikrobioty w nasilaniu zmian pronowotworowych w obrębie ludzkiego endometrium oraz potencjał nowych pochodnych niesterydowych leków przeciwzapalnych w zapobieganiu tym procesom”

Praca pani Olgi Kuźmycz została wykonana w Katedrze Mikrobiologii Molekularnej Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii pod opieką Prof. Pawła Stączka.

Rola mikrobioty w rozwoju nowotworów, ich biologii i odpowiedzi na terapię wywołuje w ostatnich latach ogromne zainteresowanie. Początkowo najwięcej badań dotyczyło raka jelita, ale w ostatnich latach pokazano, że w wielu typach nowotworów, nawet tych nie ekspozowanych bezpośrednio na zewnętrzne środowisko, mikroorganizmy są obecne i współtworzą mikrośrodowisko guza nowotworowego, odgrywając ważną rolę w jego wzroście, rozsiewie i odpowiedzi na terapię.

Praca pani Olgi Kuźmycz wpisuje się w tę aktualną tematykę. Jej celami były określenie wpływu wybranych drobnoustrojów na zmiany w obrębie ludzkich komórek endometrium oraz ocena aktywności biologicznej nowosyntetyzowanych renowych pochodnych niesterydowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) wobec komórek nowotworowych endometrium.

Rozprawa zawiera dużo istotnych wyników z dziedziny mikrośrodowiska guza nowotworowego i należy uznać, że wnosi ona wartościowy wkład w rozwój dyscypliny nauki biologicznej.

Chciałam jednak zwrócić uwagę na to, że tytuł rozprawy obiecuje nieco więcej niż praca zawiera – „nasilanie zmian pronowotworowych w obrębie ludzkiego endometrium”, sugeruje badania tkankowe, lub komórkowe demonstrujące to nasilenie zmian jako większą agresywność, lub badanie zmian przednowotworowych, czy procesu kancerogenezy. Sformułowano pięć celów szczegółowych pracy, które jednak sprawiają wrażenie słabo ze sobą powiązanych. W moim przekonaniu cel nr 1 nie powinien być wyróżniony jako oddzielny cel – znajomość literatury badanego zagadnienia jest niezbędną składową każdej pracy naukowej.

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48 (12) 664 6338
email: martyna.elas@uj.edu.pl

Struktura

Rozprawa została przygotowana w formie zbioru trzech opublikowanych artykułów oraz części zawierającej dane nieopublikowane. W skład pracy wchodzi Wstęp i cele pracy, skróty opublikowanych prac, oraz część IV, zawierająca wyniki dotąd nieopublikowane, a także dyskusję, podsumowanie i wnioski. W dalszej części rozprawy znajdują się także streszczenia w języku polskim i angielskim, oświadczenia współautorów prac i dane na temat dorobku naukowego.

Na rozprawę składają się trzy publikacje, jedna przeglądowa i dwie oryginalne, w których mgr Kuźmycz jest pierwszym autorem i – jak wynika z załączonych oświadczeń – Jej udział był dominujący, oceniony odpowiednio na 60, 70% i 40%:

- 1) Kuźmycz O, Stączek P. Prospects of NSAIDs administration as double-edged agents against endometrial cancer and pathological species of the uterine microbiome. *Cancer Biol Ther.* 2020; 21(6):486-494. (praca przeglądowa, IF = 4.4, MEiN = 100)
- 2) Kuźmycz O, Kowalczyk A, Stączek P. Biological Activity of fac-[Re(CO)₃(phen)(aspirin)], fac-[Re(CO)₃(phen)(indomethacin)] and Their Original Counterparts against Ishikawa and HEC-1A Endometrial Cancer Cells. *Int. J. Mol.Sci.* 2022; 23(19), 11568. (praca oryginalna, IF = 4.9, MEiN = 140)
- 3) Kuźmycz O, Kowalczyk A, Bolanowska A, Drozdowska A, Lach J, Wierzbińska W, Kluz T, Stączek P. A comprehensive analysis of the uterine microbiome in endometrial cancer patients – identification of *Anaerococcus* as a potential biomarker and carcinogenic cofactor. *Front Cell Infect Microbiol.* 2025 Jan 29;15:1511625. (praca oryginalna, IF = 4.6, MEiN = 100)

Łączny impact factor (IF) publikacji wynosi 13,9. Liczba punktów MNiSW wynosi natomiast 340. Warto podkreślić w tym miejscu, iż Pani Kuźmycz w swoim dorobku naukowym posiada, oprócz wymienionych publikacji, jeszcze jedną pracę z listy JCR w czasopiśmie *Chem Med. Chem.* i dwie z *Folia Biologica et Oecologica*.

Przeglądowa praca P1 omawia możliwości zastosowania NLPZ w raku endometrium i ich wpływ na mikrobiom. W publikacji P2 porównano działanie NLPZ i ich renowych pochodnych na komórki dwu linii raka błony śluzowej trzonu macicy. Ostatnia praca cyklu P3 zawiera analizę materiału od pacjentów, wraz ze wskazaniem *Anaerococcus* jako gatunku występującego jedynie u pacjentów nowotworowych.

Wstęp

Ten rozdział zawarty na ok 8 stronach opisuje przyczyny powstawania raka endometrium, mikrobiom prawidłowego endometrium, zmiany środowiska u pacjentów z nowotworem,

patogeny gatunek *Gardnerella vaginalis*, a także niesterydowe leki przeciwzapalne (NLPZ) w prewencji i terapii raka endometrium. Autorka omawia dane literaturowe, co zrozumiałe w świetle aktualności tematu, brakuje jednak trochę nieco szerszego opisu roli mikrobiomu i mechanizmów oddziaływań, np. nie tylko jakie gatunki bakterii znajdują się w macicy, ale także jak to środowisko różni się od innych lokalizacji związanych z infekcjami/nowotworami; czy mechanizmy oddziaływania z komórkami gospodarza są takie same, czy inne, itd.

Porównywanie liczby przypadków w krajach o różnej wielkości, jak USA i Polski nie bardzo ma sens, lepsze byłoby podanie standaryzowanych współczynników zachorowalności.

Na uwagę zasługują bardzo dobre ilustracje tekstu, wykonane przy pomocy programu Biorender.

Uwagi krytyczne do opisu Wyników nieopublikowanych, Dyskusji, Podsumowania oraz Wniosków

1. Cel tej części rozprawy (str 27) wydaje się zbyt szeroko zakrojony: „*Celem tego etapu pracy była weryfikacja hipotezy, dotyczącej związku pomiędzy obecnością *G. vaginalis* a patogenezą nowotworu endometrium, oraz **ocena wpływu tego szczepu na rozwój nowotworu endometrium***”. Można by się więc spodziewać badania wszystkich aspektów patogenezы raka endometrium, i oceny wpływu tego gatunku na proces karcynogenezy począwszy od komórek prawidłowych. Tymczasem Autorka przebadala szereg interesujących parametrów, a mianowicie adhezję szczepu do komórek endometrium, wpływ na RFT, aktywność metaboliczną, proliferację i stan zapalny. Jednak pojęcie „rozwój nowotworu” jest w tym kontekście zbyt szerokie.
2. Metody zostały opisane klarownie i szczegółowo.
3. Część VI Dyskusja na stronach 45-58 zyskałaby na przejrzystości po podzieleniu jej na podrozdziały. Nie było także dla mnie jasne, czy Dyskusja odnosi się tylko do wyników z części IV, czy obejmuje także prace opublikowane.
4. W podsumowaniu zawarto wnioski szczegółowe, co jest bardzo pomocne. W drugim z nich Autorka stwierdza, że obecność innych patogenów u kobiet z nowotworem endometrium może wskazywać na ich rolę w patogenezie – czy jednak ich obecność może być także skutkiem choroby, a nie przyczyną? Sformułowanie we Wnioskach: „Zmiany w składzie mikrobiomu endometrium u kobiet z nowotworem mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie raka endometrium, co wskazuje na potencjalny wpływ mikroflory bakteryjnej na rozwój choroby” oprócz podobnego co powyżej założenia przyczynowości zawiera także błąd logiczny (mogą odgrywać rolę w patogenezie, więc mają potencjalny wpływ na patogenezę).

Rozprawa w całości sprawia nieco chaotyczne wrażenie. Wspominam o tym dlatego, że porządek w przekazaniu nowych informacji jest kluczowy dla skutecznego przekazu i jest warunkiem koniecznym dla rozwoju nauki. Szczególnie w dzisiejszym chaosie informacyjnym doniesienia naukowe powinny wyróżniać się jasnością i klarownością. Sądzę, że skoro Doktorantka opisała część wyników nieopublikowanych w formie klasycznej, można się było pokusić o napisanie całości rozprawy w formie klasycznej, co zdecydowanie poprawiłoby spójność i przejrzystość przekazu.

Poważnym zaniedbaniem jest forma językowa rozprawy. Tekst zawiera wiele literówek, których nie wymieniam, a którym łatwo zapobiec stosując słownik elektroniczny, choćby w edytorze tekstu. Znalazłam także lapsusy językowe, np. w tytule punktu I.4 „Patogenne gatunki dróg rodnych *Gardnerella vaginalis*, oraz jego potencjalny wpływ na inicjację choroby nowotworowej”

Reasumując, mimo moich zarzutów co do formy rozprawy, Doktorantka zaprezentowała w pracy doktorskiej szeroką wiedzę teoretyczną, jaką powinien posiadać kandydat do stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Proszę o odniesienie się na obronie do poniższych uwag:

1. W pracy P2 nie znalazłam uzasadnienia wykorzystania renowych pochodnych NSAID. Skąd powstał pomysł i dlaczego akurat pochodne renowe, a nie innych metali? Czy znana jest stabilność tych związków *in vivo* (czy uwalniają jon Re), i ich toksyczność dla organizmu i tkanek prawidłowych? Czy Re wchodzi w reakcje redox, jak jest wydalany z organizmu? Jaka jest biodystrybucja związku *in vivo*? Jakie musiałyby być ich stężenie we krwi, aby te związki były skuteczne p bakterijne?
2. Str. 50: „zmniejszona dawka efektywna pochodnych renowych w porównaniu do oryginalnych NLPZ wskazuje na wyższą bioaktywność tych modyfikacji, co może mieć istotne znaczenie w leczeniu nowotworów endometrium” – jakie może być inne wytłumaczenie zmniejszenia dawki efektywnej, oprócz wyższej aktywności?
3. Jakie są ograniczenia metody badania poziomu RFT za pomocą DFHA?
4. Kilukrotnie w pracy przewija się wątek testu diagnostycznego w oparciu o mikrobiom (str 11, 12, 23), podobnie str 52: „Jednakże, pomimo licznych prac, brakuje wystarczających danych literaturowych dotyczących identyfikacji odrębnych taksonów w wymazach z kanału szyjki macicy u kobiet, które mogłyby stanowić narzędzie wstępnego wykrywania nowotworu endometrium”. Od prawidłowej identyfikacji gatunków bakterii, z uwzględnieniem onkobakterii, jeszcze daleka droga do opracowania testu na wczesne wykrywanie nowotworów. To wymaga bardzo szeroko zakrojonych badań epidemiologicznych, pokazujących bezpośredni związek między obecnością konkretnych gatunków, w określonych proporcjach a występowaniem zmian nowotworowych. Moim zdaniem jest to stwierdzenie mało

precyzyjne, idące nieco za daleko, i dające być może fałszywe nadzieje potencjalnym pacjentkom czytającym taki tekst, szczególnie w świetle informacji, że: „skład mikrobioty endometrium może być zróżnicowany w zależności od wieku kobiety, fazy cyklu miesięczkowego, indeksu masy ciała, diety, a nawet przynależności etnicznej” (str 11).

Uwagi tylko do wiadomości Doktorantki, bez konieczności ich komentowania w czasie obrony :

1. Streszczenie prac w języku polskim jest niestaranne i nieco mechaniczne. Np. zdanie rozpoczyna się od „Dodatkowo,...” – po polsku „ponadto” lub „co więcej”; „Zwrócono uwagę na ..” – czyją uwagę?
2. Wiele stwierdzeń jest nieprecyzyjnych, np. „Nadprodukcja białka COX-2, co jest charakterystycznym zjawiskiem dla tego typu nowotworu, wiąże się także z procesami zapalnymi, hamowaniem apoptozy, angiogenezą i przerzutowaniem”. Nie wiadomo jak się wiąże, wspomaga czy hamuje te procesy? Nie każdy czytelnik rozprawy musi to wiedzieć.
3. Str 23: „endometrium zarówno w stanie zdrowym, jak i w przypadku zmian nowotworowych” – prawidłowego endometrium, jak i w przypadku występowania zmian nowotworowych
4. Str 26, Ryc 5 jest nieczytelna
5. Str 45 Zdanie: „Porównanie wyników wskazuje, że odpowiedź komórek endometrium na bakterie patogenne *G. vaginalis* różni się istotnie od odpowiedzi na bakterie fizjologiczne *L. jensenii*, co może mieć kluczowe znaczenie w kontekście zrozumienia mechanizmów regulacji odpowiedzi immunologicznej w środowisku endometrium” – nie wnosi nic, gdyż wiadomo było że *G vaginalis* jest patogenem, a *L jensenii* nie, i że w związku z tym odpowiedź komórek będzie się różnić. Jak to pomaga zrozumieć mechanizmy regulacji odpowiedzi immunologicznej? Brak tu jakiegoś ogólnego wniosku, podsumowującego wyniki na Ryc 13. Można je znaleźć dopiero w Dyskusji i Podsumowaniu.
6. Ryc 12: Ocena zmian aktywności proliferacyjnej komórek linii HUF (A), Ishikawa (B) oraz HEC-1A (C). Na rys 12C nie rozumiem niezgodności między wartością słupka dla 0.5MOI *G. vaginalis*, a przebiegiem czasowym w insercie.
7. Wnioski:
„Obecność *G. vaginalis* wywołuje istotne zmiany w aktywności metabolicznej i potencjalnie aktywuje szlaki sygnalizacyjne związane z apoptozą komórek endometrium”
Oraz
„Zaobserwowano zmiany w tempie podziałów komórek endometrium po koinkubacji zarówno z *G. vaginalis*, jak i *L. jensenii*. Wyniki wskazują na istotne zmiany w

mechanizmach proliferacji komórek ludzkich endometrium zarówno po długim czasie ich ekspozycji na badane gatunki bakterii, jak i po 24-godzinnej inkubacji”

nie mówią nic o tym, czy te zmiany idą w górę, czy w dół, czy są pozytywne, czy też negatywne.

8. Sformułowanie „Przytoczone wyniki mają wysoki potencjał do dalszych badań” = np. dają podwaliny do dalszych badań

Podsumowanie

Rozprawa doktorska pani Olgi Kuźmycz obejmuje bardzo ciekawy temat, który jest wyzwaniem ze względu na ograniczone badania w dziedzinie mikrobiomu endometrium, oraz trudności w pobieraniu próbek od pacjentów. Plan pracy był nieco zbyt szeroki, zawiera zarówno badanie składu mikrobiomu w próbkach klinicznych, mechanizmy oddziaływań wybranych szczepów bakteryjnych na komórki in vitro, jak i testowanie skuteczności i badanie mechanizmów oddziaływań nowych pochodnych NLPZ. W rezultacie zbyt rozległego planu, opis uzyskanych wyników nie był łatwy, a układ pracy, dający duże pofragmentowanie wyników oraz pewne uchybienia językowe nie ułatwiały odbioru. Chciałam jednak podkreślić, że doceniam ilość wykonanej pracy, różnorodność zastosowanych metod, jak też ich wagę i znaczenie dla dziedziny. Doktorantka wykazała się biegłością w planowaniu i prowadzeniu pracy naukowej, w tym w prawidłowym kojarzeniu faktów i wyciąganiu na ich podstawie odpowiednich wniosków.

Mimo wymienionych wyżej uwag krytycznych, moja opinia o rozprawie jest pozytywna. Składające się na nią publikacje zostały już poddane ocenie anonimowych recenzentów, będących specjalistami w dziedzinie rozprawy. Nie doszukałam się w pracy doktorskiej poważnych problemów merytorycznych, a w recenzji podniosłam kilka uwag wynikających z niejasności oraz z mojego zaciekawienia tematyką rozprawy. Rozprawa zawiera wymagane elementy nowości naukowej potwierdzone wynikami naukowymi wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, jak również zwyczajowe standardy stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk przyrodniczych i ścisłych w dyscyplinie nauki biologiczne. Wnoszę zatem o dopuszczenie pani mgr Olgi Kuźmycz do dalszych etapów postępowania doktorskiego.