

**Ocena rozprawy doktorskiej  
lek. dent. Magdaleny Sawczuk-Siemieniuk  
zatytułowanej**

**„Ocena częstości występowania wirusa Epsteina – Barr  
oraz wirusa brodawczaka ludzkiego w komórkach  
raka płaskonabłonkowego jamy ustnej”**

**Promotor dr hab. n. med. Izabela Szarmach**

Nowotwory złośliwe jamy ustnej stanowią około 1/3 wszystkich nowotworów w obrębie głowy i szyi. Wywodzący się z komórek nierogowaciejącego nabłonka wielowarstwowego płaskiego rak płaskonabłonkowy jest najczęściej występującym nowotworem jamy ustnej. Stanowi on około 90% zmian nowotworowych tego obszaru, pozostałe 10% to między innymi gruczolaki, chłoniaki, mięsaki, czerniaki czy nowotwory małych gruczołów ślinowych. Występuje 2 – 3 razy częściej u mężczyzn niż u kobiet i dotyczy głównie pacjentów w grupie wiekowej 50 – 70 lat, chociaż może rozwinąć się także u osób młodszych. Najczęściej obserwuje się raka płaskonabłonkowego języka i dna jamy ustnej, rzadziej dziąseł, policzków, okolicy zatrzonowcowej i podniebienia. Do czynników etiologicznych zalicza się nałóg palenia tytoniu i picia alkoholu, złą higienę jamy ustnej, przewlekłe urazy błony śluzowej jamy ustnej, zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) i wirusa Epsteina – Barr (EBV) oraz czynniki genetyczne. Rak może rozwijać się na podłożu zmian przedrakowych, takich jak leukoplakia, erytroplakia czy hiperkeratoza. Wcześniej wykryty daje 90% szans na wyleczenie, jednak większość pacjentów zgłasza się do leczenia już w zaawansowanym stadium rozwoju choroby, wskutek czego 20% chorych żyje przez 5 lat od momentu usłyszenia diagnozy.

Temat rozprawy doktorskiej lek. dent. Magdaleny Sawczuk-Siemieniuk jest więc bardzo istotny i wpisuje się w nurt badań nad przyczynami rozwoju raka

płaskonabłonkowego jamy ustnej, co przekłada się bezpośrednio na jego leczenie i rokowanie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 118 stron i ma układ typowy dla pracy badawczej: zawiera czytelny spis treści: wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody badań, wyniki badań, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, spis tabel, spis rycin i załącznik – zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, nr R-I-002/114/2016. Praca została wykonana pod kierunkiem promotora, Pani dr hab. n. med. Izabeli Szarmach.

W liczącym 17 stron wstępie Doktorantka przedstawiła aktualne poglądy na temat nowotworów jamy ustnej i ich epidemiologii, dokonała charakterystyki raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, jego lokalizacji, częstości występowania, objawów, stadiów zaawansowania i klasyfikacji TNM. Scharakteryzowała czynniki onkogenne, w tym właściwości onkogenne wirusa Epsteina – Barra i brodawczaka ludzkiego oraz przedstawiła współczesne metody terapii onkologicznej. Uzasadniła także wybór tematu swoich badań, których głównym celem była ocena częstości występowania wirusów EBV i HPV u pacjentów chorujących na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej oraz ocena ekspresji białka wirusowego LMP1 w kierunku infekcji EBV i białka p16 w kierunku infekcji HPV.

Za cele szczegółowe Doktorantka uznała ocenę:

1. Korelacji między wiekiem a występowaniem infekcji wirusowej u pacjentów chorujących na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.
2. Zależności między płcią badanych pacjentów a występowaniem infekcji wirusami EBV lub HPV.
3. Zależności między paleniem tytoniu u pacjentów chorujących na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, a występowaniem infekcji wirusami EBV lub HPV.
4. Zależności między spożyciem alkoholu a występowaniem infekcji wirusami EBV lub HPV.
5. Zależności między higieną jamy ustnej a możliwością infekcji EBV, lub HPV, bądź koinfekcją obydwoma wirusami.

6. Zależności między infekcją EBV lub HPV, a miejscem zamieszkania badanych pacjentów.
7. Zależności między infekcją EBV lub HPV, a lokalizacją raka płaskonabłonkowego w jamie ustnej.
8. Zależności między czynnikami ryzyka rozwoju nowotworu a występowaniem białek LMP1 i p16 u pacjentów chorujących na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.

Materiał do badań stanowiły tkanki guza pobrane od 51 pacjentów w wieku od 37 do 90 lat, leczonych w latach 2013 – 2017 w Klinice Chirurgii Szczerkowo-Twarzowej i Plastycznej UMB. Grupę kontrolną stanowiły tkanki pobrane od 55 pacjentów, w wieku od 18 do 34 lat, którzy nie chorowali na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, a operowani byli w tej samej Klinice z powodu morfologicznych wad twarzowej części czaszki.

Dane dotyczące wieku, płci, miejsca zamieszkania, kontaktu z potencjalnymi czynnikami etiologicznymi nowotworu, jego lokalizacji w jamie ustnej, stopniu zaawansowania, występowania przerzutów – uzyskano z dokumentacji medycznej.

Częstość występowania wirusa EBV i wirusa HPV oceniono przy pomocy łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR). Ekspresję białek LMP1 i p16 uwidoczniło przy pomocy metody immunohistochemicznej z przeciwciałami specyficznymi anty-LMP i anty-p16. Ocena ekspresji obu białek została przeprowadzona pod mikroskopem świetlnym przy powiększeniu 100X. Za wynik pozytywny dla p16 uznano, gdy więcej niż 75% komórek wykazywało silną ekspresję błonowo – cytoplazmatyczną w komórkach nowotworowych. Za wynik pozytywny dla LMP1 uznano, gdy więcej niż 10% komórek nowotworowych wykazywało silną błonową ekspresję białka.

Analiza statystyczna wyników badań została przeprowadzona przy pomocy oprogramowania statystycznego IBM SPSS Statistics w wersji 26.0, z założonym poziomem istotności na poziomie 0,05.

Wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań nie wykazały jednoznacznej zależności między wiekiem pacjentów, a wzrostem wrażliwości na infekcję wirusową. Uzyskano wyższy wynik zakażeń w grupie mężczyzn w przypadku wirusa HPV, natomiast infekcja EBV częściej występowała u kobiet. Rak płaskonabłonkowy u

pacjentów niepalących był w większości inicjowany przez wirusy HPV i EBV, natomiast u pacjentów palących w niskim odsetku – uzyskane wyniki były istotne statystycznie. Pacjenci chorzy na raka i pijący w nadmiarze alkohol w większości byli zainfekowani wirusami. Wykazano wzrost ryzyka zachorowania na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej u pacjentów ze złą higieną jamy ustnej i to niezależnie od infekcji wirusami HPV i EBV. Nie stwierdzono przypadków infekcji wirusowej u pacjentów mieszkających w małym mieście, zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej. Większość pacjentów z miasta średnie wielkości była zainfekowana wirusami brodawczaka ludzkiego i Epsteina – Barr. Najczęstszą lokalizacją raka płaskonabłonkowego u badanych pacjentów był język i dno jamy ustnej. Wykazano, że białko p16 może być ważnym markerem w ocenie wystąpienia HPV, a białko LMP1 w przypadku obecności EBV. Wynikami istotnymi statystycznie była też zależność między obecnością białek p16 i LMP1 a paleniem wyrobów tytoniowych oraz miejscem zamieszkania. Nie stwierdzono natomiast związku między obecnością obu białek a lokalizacją nowotworu w jamie ustnej.

Podrozdziały poświęcone charakterystyce grup badanych i metodyce badań oraz rozdział dotyczący wyników badań zostały zilustrowane za pomocą 41 tabel i 17 rycin.

W liczącej 16 stron dyskusji Doktorantka odniosła się do wyników badań przeprowadzonych i opisanych przez innych autorów. Wykorzystała przy tym odpowiednie pozycje piśmiennictwa i wykazała się bardzo dobrą znajomością tematu. Stwierdziła, że niejednoznaczność wyników badań (jakkolwiek wyniki badań własnych potwierdziły wiele hipotez i rezultatów badań innych autorów) wskazuje na konieczność ich kontynuacji.

Ze swoich badań Doktorantka wysnuła następujące wnioski:

1. Wirusy EBV i HPV pretendują do ważnego czynnika patogenetycznego w procesie kancerogenezy.
2. Białka LMP1 i p16 mogą stanowić marker obecności infekcji wirusowej EBV i HPV u pacjentów chorujących na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.
3. Wiek, zwłaszcza poniżej 5. dekady życia oraz płeć męska są kluczowe w infekcji HPV u chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Wirus EBV może przyczynić się do rozwoju nowotworu w grupie pacjentów po

45 roku życia, występując nieznacznie częściej u chorych na raka kobiet.

4. Częstość zakażenia wirusem EBV lub HPV jest większa u chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej niepalących, w porównaniu z grupą palaczy.
5. Prawdopodobieństwo rozwoju nowotworu oraz ryzyko infekcji wirusami onkogennymi są większe u pacjentów nadużywających alkoholu.
6. Utrata zębów lub zaawansowana choroba próchnicowa jako następstwo niedostatecznej higieny może spowodować drażnienie błony śluzowej jamy ustnej i przyspieszać proces nowotworowy. Dobra higiena chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej wskazuje, że to zakażenie wirusami EBV lub HPV może być czynnikiem inicjującym onkogenezę.
7. Dynamika rozprzestrzeniania się wirusa, związana ze stylem życia w średnich i dużych aglomeracjach, może podwyższać ryzyko infekcji EBV i HPV.
8. Język i dno jamy ustnej stanowią najczęściej występującą lokalizację raka płaskonabłonkowego i jednocześnie największe skupisko wirusów EBV i HPV.
9. Obecność białek onkogennych LMP1 i p16 stanowi potwierdzenie infekcji wirusowej, zwłaszcza u pacjentów niepalących chorujących na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Nie wykazano zależności pomiędzy obecnością białek, a pozostałymi badanymi cechami.

Piśmiennictwo jest obszerne, zawiera 130 pozycji z lat 1981 – 2021, w tym 116 w języku angielskim.

Doktorantka wykazała się dużą wiedzą i umiejętnością samodzielnej pracy naukowej. Tytuł rozprawy jest adekwatny do jej treści. Cele badań zostały jasno sformułowane. Do ich realizacji zostały zastosowane nowoczesne metody badawcze, a do analizy wyników – odpowiednio dobrane metody statystyczne. Wnioski są odpowiedzią na postawione cele badań. Jej dysertacja ma walory poznawcze i kliniczne, oceniam ją wysoko. Moja jedyna uwaga dotyczy doboru grupy badawczej i kontrolnej pod względem wieku pacjentów (średni wiek pacjentów w grupie badanej to 60,2 a w grupie kontrolnej – 24,6 roku).

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na kilka drobnych usterek, do uwzględnienia przed oddaniem pracy do druku Proponuję:

1. Termin „częstotliwość występowania” zamienić na „częstość”. Są to wyrazy bliskoznaczne, ale częstość – to pojęcie opisujące stosunek wystąpień danego zjawiska lub przedmiotu w czasie czy w przestrzeni, a częstotliwość określa liczbę cykli zjawiska okresowego występującego w jednostce czasu (str. 82, 88, 98).
2. „Ilość zachorowań” i „ilość badań” zamienić na „liczbę zachorowań” i „liczbę badań” – są to zjawiska policzalne (np. str. 8, 93).
3. Uzupełnić wykaz skrótów na str. 5.
4. Poprawić błędy ortograficzne, stylistyczne i interpunkcyjne (np. str. 14, 15, 18, 26, 83, 88).

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska zatytułowana „Ocena częstości występowania wirusa Epsteina – Barr oraz wirusa brodawczaka ludzkiego w komórkach raka płaskonabłonkowego jamy ustnej” odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim w myśl Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.; Dz. U. z 2018 r. poz.1669 z późn. zm). W związku z tym zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie lek. dent. Magdaleny Sawczuk-Siemieniuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

prof. dr hab. n. med. *M. Zadura*  
MALGORZATA ZADURSKA  
specjalista ortodonta, pedodonta  
4190172