Ocena dorobku naukowego, monotematycznego cyklu prac stanowiącego osiągnięcie naukowe pt.: „Mediatory reakcji zapalnej jako markery nowotworów przełyku", działalności dydaktycznej i organizacyjnej dr n. med. Marty Łukaszewicz-Zając w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego nauk medycznych w zakresie biologii medycznej

Dr n. med. Marta Łukaszewicz-Zając w 2006 r. ukończyła studia na Oddziale Medycyny Laboratoryjnej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, uzyskując dyplom magistra analityki medycznej. W tym samym roku podjęła studia doktoranckie na Uniwersytecie Medycznym, równocześnie pracując jako wolontariusz w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej Szpitala Klinicznego w Białymstoku. W 2009 r. podjęła pracę w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w latach 2009 – 2013 na stanowisku asystenta, a od października 2013 r. do chwili obecnej adiunkta naukowego. W 2010 r. Rada Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku nadała Jej na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Hematopoetyczne czynniki wzrostu (HGFs) jako markery nowotworowe raka trzustki" stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Od 2012 r. pracuje równocześnie w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej Szpitala Klinicznego w Białymstoku, początkowo na stanowisku asystenta, a następnie starszego asystenta. W 2012 r. dr n. med. M. Łukaszewicz-Zając uzyskała specjalizację w dziedzinie laboratoryjnej diagnostyki medycznej. W trakcie pracy w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej UMB odbyła szereg szkoleń krajowych, a także miesięczny (2008 r.) staż szkoleniowy w Royal Brompton Hospital w Londynie (Wlk. Brytania) oraz w 2013 r. uczestniczyła w konsultacjach związanych z uczestnictwem w projekcie badawczym JPND Research BiomarkAPD (Florencja, Włochy).

Ocena dorobku naukowego

Dr n. med. M. Łukaszewicz-Zając jest autorem/współautorem 30 prac naukowych (18 oryginalnych i 12 poglądowych). z których 15 było opublikowanych przed (10 oryginalnych i 5 poglądowych), a pozostałych 15 po uzyskaniu uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych (8 oryginalnych i 7 poglądowych). W 18 z tych 30 prac Habilitantka była pierwszym autorem. Łączny wskaźnik oddziaływania prac (Impact Factor – IF) wynosi 41,255 (przed uzyskaniem stopnia doktora – 15,170 i po uzyskaniu – 25,555), a punktacja MNiSzW - 567 punktów (przed – 229, po - 338), liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - 264, indeks Hirsha – 9. Ponadto dr n. med. M. Łukaszewicz-Zając jest autorem/współautorem 21 doniesień prezentowanych na krajowych i międzynarodowych

konferencjach i zjazdach naukowych, których streszczenia były opublikowane w suplementach czasopism (13) i materiałach zjazdowych (8).

Aktywność naukowa dr n. med. Marty Łukowicz-Zając koncentruje się wokół zagadnień dotyczących oceny wpływu wybranych wykładników stanu zapalnego na rozwój niektórych nowotworów przewodu pokarmowego, w aspekcie możliwości wykorzystania ich jako biomarkerów w diagnostyce i ocenie rokowania chorych. Przedmiotem badań były wybrane cytokiny hematopoetyczne: czynnik stymulujący kolonie granulocytarne (G-CSF), kolonie granulocytarno-makrofagowe (GM-CSF), kolonie makrofagowe (M-CSF) i czynnik Steel (SCF) oraz metaloproteinazy typu 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9), ich tkankowe inhibitory typu 1 i 2 (TIMP-1 i TIMP-2), a także interleukina 6 (IL-6) oraz białko C-reaktywne (CRP). Biorąc pod uwagę lokalizację narządową zmian nowotworowych w działalności naukowej Habilitantki można wyróżnić badania dotyczące:

- **raka żołądka** (7 prac oryginalnych). Badania przeprowadzone u chorych na raka żołądka, chorych z chorobą wrzodową żołądka i grupie referencyjnej osób zdrowych wykazały istotne zależności stężenia cytokin hematopoetycznych względem stadium zaawansowania nowotworu, potwierdzając potencjalną użyteczność diagnostyczną wyników oznaczeń tych cytokin, jednak przy braku możliwości ich wykorzystania w diagnostyce różnicowej raka i choroby wrzodowej żołądka. Badania MMP-9, MMP-2, tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP-1 i TIMP-2) oraz stężenia CEA i CA 19-9 wnoszą interesujące informacje odnośnie wartości TIMP-1 jako niezależnego czynnika prognostycznego u chorych na raka żołądka. Potwierdzenie użyteczności TIMP-1 w ocenie rokowania chorych przynoszą również badania metodami immunohistochemicznymi ekspresji inhibitora w komórkach nowotworowych jak i komórkach zapalnych podścieliska guza. Wyniki tych badań wskazują na istotną rolę komórek zapalnych podścieliska w rozwoju nowotworu. Natomiast pewne wątpliwości budzą badania dotyczące stężenia MMP-2 i jej inhibitora (TIMP-2). Znacząco niższe w porównaniu do grupy referencyjnej zdrowych osób stężenia MMP-2 i TIMP-2 u chorych na raka żołądka, a równocześnie stwierdzana w badaniach immunohistochemicznych wzmożona ekspresja tych wskaźników, wymagają wyjaśnienia i szerszego komentarza, powinny być przedmiotem dalszych, z pewnością interesujących badań. Ocena zależności pomiędzy rozwojem nowotworu, nasileniem procesów proliferacyjnych, zdolnością tworzenia przerzutów i obecnością stanu zapalnego, do którego wykładników należą IL-6 i CRP są przedmiotem obecnie bardzo wielu badań. Biorąc pod uwagę ograniczoną czułość i swoistość diagnostyczną wyników oznaczeń CEA i CA 19-9 u chorych na raka żołądka prezentowane w pracy wyniki badań IL-6 i CRP przynoszą jeszcze jedno potwierdzenie celowości postulowanego przez wielu badaczy wykonywania

komplementarnych do markerów nowotworowych badań podstawowych wykładników stanu zapalnego, a relatywnie dużą dostępność wyników ich oznaczeń zapewniają w pełni zautomatyzowane i wystandaryzowane metody pomiarowe.

- **raka trzustki** (2 prace oryginalne). Badania nad cytokinami hematopoetycznymi u chorych na raka trzustki były przedmiotem rozprawy doktorskiej dr M. Łukaszewicz-Zając, natomiast dwie, pochodzące z okresu przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych, prace oryginalne przynoszą informacje potwierdzające użyteczność diagnostyczną oznaczeń stężenia M-CSF, a także MMP-9 i TIMP-1 łącznie z CA 19.9, uznawanym od szeregu lat za marker z wyboru dla raka trzustki. Wyniki oznaczeń metaloproteinazy 9 i TIMP-1 mogą być pomocne zwłaszcza w diagnostyce różnicowej raka i przewlekłego zapalenia trzustki. Ponadto wykazano, że MMP-9 jest niezależnym czynnikiem prognostycznym u chorych na rak trzustki.
- **raka jelita grubego** (1 praca oryginalna). Badania przeprowadzone u chorych na raka jelita grubego wykazały, że stężenia IL-6 i CRP mogą być przydatne w diagnostyce różnicowej raka i polipów gruczolakorakowatych jelita grubego
- **raka przełyku** (3 prace oryginalne, nie uwzględnione w cyklu prac stanowiących osiągnięcie badawcze). Prace zaliczane do tej grupy pozostają w ścisłym związku z tematyką cyklu prac stanowiących osiągnięcie badawcze w rozumieniu art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 12 marca 2003 r. (Dz.U. Nr 65 poz. 595 z póź. zm) i dotyczą użyteczności diagnostycznej wyników badań stężenia MMP-9 i TIMP-1 oraz antygenu raka płaskonabłonkowego (SCC-Ag) i antygenu karcynoembrionalnego (CEA) u chorych na raka przełyku, a także ekspresji MMP-9 i TIMP-1 w komórkach nowotworowych i komórka zapalnych podścieliska guza.

Szczególnie wysoko oceniam grupę prac dotyczących wybranych cytokin hematopoetycznych, metaloproteinaz i ich inhibitorów, stężenia IL- 6 i CRP u chorych na raka żołądka. Diagnostyka laboratoryjna w odniesieniu do raka żołądka dysponuje nader ograniczonymi możliwościami, czułość i swoistość diagnostyczna wyników oznaczeń CEA i CA 19.9 jest niska, nawet u chorych w zaawansowanych stadiach choroby. Zasadniczo markerem z wyboru – o ile można użyć tego stwierdzenia w sytuacji raka żołądka – jest CA 72-4, jednak dostępność badań tego markera jest ograniczona. Stąd poszukiwania innych biomarkerów, których wyniki mogłyby poprawić efektywność diagnostyki laboratoryjnej w raku żołądka zasługują na słowa uznania, zwłaszcza ze względu na fakt, że u znacznego odsetka chorych nowotwór rozpoznawany jest w zaawansowanych stadiach, kiedy możliwości leczenia radykalnego są nader ograniczone.

W podsumowaniu dorobku naukowego dr M. Łukaszewicz-Zając należy podkreślić dobry i nowoczesny warsztat metodyczny, umiejętności wykorzystania szerokiego panelu metod statystycznych w opracowywaniu wyników badań, zwłaszcza z zakresu analizy jedno-

i wieloczynnikowej dla oceny wartości prognostycznej badanych wskaźników. Badania zostały przeprowadzone w liczebnościowo reprezentatywnych grupach chorych, co sprawia, że wnioski zamykające te prace cechuje relatywnie wysoka wiarygodność. Można wyrazić jedynie pewien żal, że większość prac oryginalnych Habilitantki pochodzi z okresu przed uzyskaniem stopnia doktora. W okresie późniejszym obok 5 prac oryginalnych, zaliczonych do monotematycznego cyklu, będącego podstawą wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego, zostały opublikowane tylko 3 prace oryginalne. Można, zatem odczuwać pewien niedosyt, wymaganego przepisami, elementu znaczącej intensyfikacji aktywności badawczej Kandydatki w okresie po doktoracie. W pewnej mierze ten niedostatek rekompensuje 7 prac poglądowych napisanych w tym okresie, które z pewnością potwierdzają dobrą znajomość współczesnego piśmiennictwa, dotyczącego zainteresowań naukowych Habilitantki, zwłaszcza, że 2 z tych prac były przygotowane na zaproszenie redakcji renomowanych czasopism.

Ocena monotematycznego cyklu prac

Osiągnięcie naukowe w rozumieniu przepisów art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 12 marca 2003 r. (Dz.U. Nr 65 poz. 595 z póź. zm) stanowi monotematyczny cykl 6 prac, w tym jednej poglądowej, pt.: „Mediatory reakcji zapalnej jako markery nowotworów przełyku". Łączny wskaźnik oddziaływania tych prac (IF) wynosi 12,298, a punktacja MNiSzW – 147. Dr n. med. Marta Łukowicz-Zając we wszystkich tych pracach jest pierwszym autorem, a swój udział w ich przygotowaniu oceniła na 70 – 90%.

Przedmiotem prac zaliczonych do tego cyklu jest analiza użyteczności diagnostycznej wyników oznaczeń stężenia w surowicy krwi: czynnika stymulującego kolonie makrofagów (M-CSF), czynnika komórek pnia (SCF), chemokiny CXCL12 i jej receptora CXCR4, interelukiny 6 (IL-6) oraz białka C-reaktywnego (CRP) w konfrontacji z wynikami oznaczeń antygenu raka płaskonabłonkowego (SCC-Ag) oraz antygenu karcynoembrionalnego (CEA), uwzględniająca szereg parametrów kliniczno-patologicznych takich jak: typ histologiczny nowotworu (rak płaskonabłonkowy i gruczolakorak), stadium zaawansowania, klasyfikacja zaawansowania TNM, stopień złośliwości histologicznej. Badania przeprowadzono w grupach liczących zasadniczo 49 – 56 chorych na raka przełyku, a wyjątkowo w pierwszej pracy w grupie liczącej 80 chorych oraz w grupie referencyjnej osób zdrowych.

Rak przełyku należy do nowotworów stosunkowo rzadko występujących, jednak u znacznego odsetka chorych rozpoznawany jest w stopniu III i IV zaawansowania, gdy możliwości wdrożenia radykalnej terapii są ograniczone. Nowotwór cechuje duża dynamika rozwoju, szerzy się miejscowo, naciekając okoliczne narządy oraz do regionalnych węzłów chłonnych w śródpiersiu lub nadbrzuszu. Wątroba i płuca stanowią najczęstszą lokalizację odległych przerzutów. Rokowanie w raku przełyku jest złe, znaczna część chorych umiera

już w pierwszym roku od rozpoznania nowotworu, a odsetki przeżyć 5-cio letnich kształtują się poniżej 20 %. O ile w Polsce dominuje rak płaskonabłonkowy (blisko 90 %), a znacznie rzadziej rak gruczołowy, głównie w dolnym odcinku i u młodszych chorych, to w Stanach Zjednoczonych i Europie częstość występowania obu typów histologicznych nie jest tak drastycznie różna. Diagnostyka raka przełyku opiera się na badaniach endoskopowych i radiologicznych, a w badaniach laboratoryjnych, ze względu na dominujący typ histologiczny, podstawowym markerem jest SCC-Ag, znacznie mniejszą użyteczność wykazują badania CEA lub CA 19-9. O ile czułość diagnostyczna SCC-Ag jest przeciętna, wahając się w zależności od stopnia zaawansowania procesu chorobowego w granicach 30 – 90 %, to podkreśla się wysoką swoistość wyników oznaczeń markera wynoszącą 89 – 97,5%. W ostatnich latach zwraca się uwagę na użyteczność badań pochodnej cytokeratyny 19, antygenu CYFRA 21-1, którego podwyższone stężenia spotyka się również u znacznego odsetka chorych z rakiem gruczołowym.

We współczesnej diagnostyce chorób nowotworowych duże zainteresowanie budzą możliwości wykorzystania różnych wykładników biochemicznych stanu zapalnego jako biomarkerów, zarówno dla poprawy efektywności wykrywania nowotworów we wczesnych stadiach zaawansowania jak i szczególnie w ocenie rokowania chorych. Koncepcja zespołu ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej (*Systemic Inflammatory Response Syndrome* – SIRS) przyciąga uwagę wielu zespołów badawczych. Jakkolwiek szereg badań koncentruje się na wykorzystaniu w ocenie nasilenia stanu zapalnego wyników badań prostych, podstawowych, powszechnie dostępnych, hematologicznych i biochemicznych wykładników reakcji ostrej fazy, to również dynamicznie rozwijają się badania dotyczące weryfikacji użyteczności w tym zakresie wielu czynników wzrostu, cytokin i chemokin, a także ich receptorów. Badania te mają na celu poszukiwanie czułych i swoistych biomarkerów dla poszczególnych rodzajów nowotworów złośliwych. Taki nadrzędny cel miały również badania dr n. med. Marty Łukaszewicz-Zając. Doświadczenia uzyskane w prowadzonych wcześniej badaniach hemopoetycznych czynników wzrostu (M-CSF, SCF) u chorych na nowotwory przewodu pokarmowego, ich udowodniony udział w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, czy stymulowaniu procesów proliferacji stanowią przesłankę uzasadniającą podjęcie badań ich stężenia u chorych na raka przełyku w porównaniu z szeregiem podstawowych parametrów kliniczno-patologicznych, a także użytecznością klasycznych markerów nowotworowych. Habilitantka wykazała, że komplementarne do SCC-Ag i CEA badania stężenia M-CSF i SCF mogą przyczynić się do istotnej poprawy efektywności diagnostyki biochemicznej tych chorych. Oznaczenia SCF mogą być ponadto wykorzystane w diagnostyce różnicowej płaskonabłonkowego i gruczołowego raka przełyku.

Badania stężenia IL-6 i CRP u chorych na nowotwory złośliwe, biorąc pod uwagę liczbę opublikowanych prac, stanowią w pewnym sensie już model klasyczny. Wyniki

przeprowadzonych u chorych na raka przełyku badań tych wykładników stanu zapalnego potwierdziły wcześniej obserwowane w innych nowotworach zależności ich poziomu względem szeregu parametrów klinicznych, możliwości uzyskania poprawy efektywności diagnostyki biochemicznej przez komplementarne do klasycznych markerów oznaczenia tych białek, a także zależności czasu przeżycia chorych względem wyjściowego stężenia CRP.

Badania stężenia CXCK12 oraz CXCR4 łącznie z IL-6 i CRP oraz SCC-Ag i CEA, jakkolwiek nie wykazały szczególnie wysokiej użyteczności diagnostycznej tej chemokiny i jej receptora, to jednak wysoka czułość diagnostyczna równoczesnych oznaczeń obu tych wskaźników może uzasadniać sugestię odnośnie celowości wykorzystania komplementarnych ich badań u chorych na raka przełyku.

Wyniki badań prezentowanych w cyklu prac przedstawionym do oceny wnoszą szereg istotnych informacji dotyczących udziału stanu zapalnego w procesach związanych z rozwojem nowotworu. Odnosząc się z uznaniem do charakteru poznawczego wykonanych badań, nie można pominąć ich wartości utylitarnej, jaką stanowi przedstawione w tych pracach potwierdzenie możliwości wykorzystania oznaczeń wybranych cytokin hematopoetycznych, chemokin, IL-6 i CRP jako potencjalnych biomarkerów w diagnostyce, a także w ocenie rokowania chorych na raka przełyku. Udział cytokin hematopoetycznych jak i chemokin w mechanizmach szeregu procesów związanych z różnicowaniem komórek, proliferacją, apoptozą, wydłużeniem czasu ich życia, migracją w znacznej mierze może determinować wysoką czułość diagnostyczną wyników oznaczeń ich stężenia w odniesieniu do określonego nowotworu, chociaż swoistość diagnostyczna jest zazwyczaj niska w związku z plejotropowym charakterem tych wskaźników. Z tego względu właśnie wyniki komplementarnych, w stosunku do SCC-Ag i CEA klasycznych w przypadku raka przełyku markerów nowotworowych, oznaczeń tych wskaźników stanu zapalnego mogą przyczynić się do poprawy efektywności diagnostyki laboratoryjnej chorych na raka przełyku.

W podsumowaniu mojej oceny monotematycznego cyklu prac, stanowiącego osiągnięcie naukowe jako podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, a także całokształtu dorobku naukowego Kandydatki chciałbym podkreślić dobry warsztat metodyczny, wysokiej jakości umiejętności statystycznego opracowania wyników badań, wnikliwą znajomość piśmiennictwa dotyczącego zagadnień, będących przedmiotem badań i nader cenną krytyczną postawę w odniesieniu do wyników własnych badań (patrz: autoreferat i wnioski podsumowujące ten cykl badań).

Działalność dydaktyczna, organizacyjna i jako eksperta

W związku z miejscem prac dr n. med. Marta Łukowicz-Zając wykazuje dużą aktywność dydaktyczną, prowadząc ćwiczenia, seminaria i wykłady, a także zajęcia

fakultatywne dla studentów III i IV roku studiów na kierunku Analityka Medyczna Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. W latach 2011 – 2014 była opiekunem 6 i recenzentem 8 prac magisterskich na kierunku Analityka Medyczna. Brała udział w opracowaniu materiałów dydaktycznych dla studentów nauczania w języku polskim oraz angielskim. Kandydatka prowadzi również ćwiczenia i wykłady na kursach organizowanych dla osób specjalizujących się w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej i immunologii medycznej.

W latach 2010 i 2012 była współorganizatorem dwóch konferencji naukowo-szkoleniowych.

Wyrazem uznania dla aktywności naukowej Habilitantki i reprezentowanej wiedzy w dziedzinie biomarkerów nowotworów przewodu pokarmowego były prośby szeregu renomowanych czasopism medycznych (7) o dokonanie recenzji nadsyłanych do redakcji prac badawczych. W 2015 r. została poproszona ponadto o recenzję międzynarodowego grantu Health Research Awards 2015 w ramach Health Research Board (Irlandia).

Dr n. med. Marta Łukaszewicz–Zając jest laureatem 4 zespołowych nagród naukowych I stopnia i 1 nagrody indywidualnej Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Kandydatka jest członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych i Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej.

Wniosek końcowy

Wniosek końcowy sformułowano w oparciu o kryteria oceny ujęte w rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 r. w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego (Dz. U. Nr 196, poz. 1165). Zarówno cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe, jak i cały dorobek naukowy dr n. med. Marty Łukaszewicz-Zając, a także kompetencje zawodowe oraz osiągnięcia organizacyjne i dydaktyczne spełniają wymogi stawiane w przewodzie habilitacyjnym. W związku z powyższym przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie dr n. med. Marty Łukaszewicz-Zając do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Zakład Analityki i Biochemii Klinicznej
Centrum Onkologii
Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie
Oddział w Krakowie

Prof. dr hab. n. med. Jan Kanty Kulpa

Kraków, 2016.08.01

prof. dr hab. n. med. Jan Kanty Kulpa