



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Toksykologii

Kierownik: prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. farmacji Lias Saed
pt. "Ocena znaczenia prognostycznego ekspresji genu HMGA1 w raku płuca"
na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu,
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Przedstawiony cykl publikacji przedłożony do recenzji poświęcony jest ocenie prognostycznego znaczenia ekspresji genu *HMGA1* kodującego białko HMGA1 w raku płuca, zwłaszcza u chorych z rakiem niedrobnokomórkowym płuc (NDRP), który stanowi ponad 80% wszystkich przypadków raka płuca.

Praca została wykonana w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej, Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem Pani dr hab. n farm. Aleksandry Sałagackiej-Kubiak.

Założenia pracy wpisują się bardzo dobrze w aktualny nurt badań naukowych, skupiający się na poszukiwaniu nowych czy też nowym wykorzystaniu znanych już parametrów, wskaźników biochemicznych, o potencjalnym zastosowaniu w diagnozowaniu, a zwłaszcza prognozowaniu przebiegu choroby, ocenie skuteczności zastosowanego leczenia oraz czasu przeżycia chorych z rakiem płuca. Podjęty temat badawczy jest aktualny i ważny, gdyż rak płuca nadal jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych w Polsce (drugi co do częstości zachorowań nowotwór złośliwy u kobiet i pierwszy wśród mężczyzn).

Podstawę ubiegania się przez Pana mgr Lias Saed o stopień doktora nauk farmaceutycznych stanowi cykl 3 spójnych tematycznie publikacji opublikowanych w ostatnich dwóch latach (2021–2022), w czasopiśmie z listy MEiN oraz Journal Citation Reports, w tym dwóch ze współczynnikiem wpływu. Łączny współczynnik wpływu IF wynosi 9,188, a punktacja MEiN to 320 punkty. Pierwsza publikacja jest pracą o charakterze poglądowym, druga publikacja jest oparta o analizę bioinformatyczną ogólnodostępnych danych wielkoskalowych, a trzecia jest publikacją eksperymentalną zrealizowaną w oparciu o badania przeprowadzone w materiale biologicznym pochodzącym od pacjentów, u których zdiagnozowano NDRP. We wszystkich tych pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a liczba wszystkich współautorów to odpowiednio 5, 4 i 5. Wiodący udział Doktoranta, oszacowany na 45 do 50% w ich powstawaniu, został potwierdzony oświadczeniami współautorów dołączonymi do rozprawy (załącznik nr 11) i polegał na: przeglądzie i wyborze piśmiennictwa oraz przygotowaniu i korygowaniu manuskryptu pracy (publikacja nr 1), opracowaniu koncepcji badań, wyborze narzędzi badawczych, wykonaniu analizy oraz przygotowaniu i korygowaniu manuskryptu pracy (publikacja nr

2), wykonaniu badania ekspresji genu *HMGAI* w tkance nowotworowej, analizie i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu i korygowaniu manuskryptu pracy (publikacja nr 3).

Przedłożona rozprawa doktorska składa się z 11 rozdziałów oraz zawiera listę zastosowanych skrótów, które dla ułatwienia czytającemu i większej przejrzystości powinny być ułożone w kolejności alfabetycznej. Oprócz cyklu 3 monotematycznych publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień dr n. farm, praca zawiera również informacje o pozostałych publikacjach nie wchodzących w zakres pracy doktorskiej oraz spis komunikatów zjazdowych, w których Pan magister brał udział. Ponadto jest On współautorem rozdziałów w monografiach oraz publikacji popularnonaukowej.

We Wstępie pracy Doktorant przedstawił po krótko epidemiologię raka płuca, czynniki ryzyka zachorowania (środowiskowe i molekularne), klasyfikację histopatologiczną nowotworów płuca oraz stosowane schematy terapeutyczne. Ponadto scharakteryzował gen *HMGAI* i białko HMGA1 i ich rolę w procesie powstawania i prognozowaniu przebiegu nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem ich udziału w patogenezie raka płuca, co było zasadniczym przedmiotem analiz i badań Pana mgr w przedłożonej rozprawie doktorskiej. Stanowi to wystarczające wprowadzenie do części eksperymentalnej, gdyż zagadnienia te szczegółowo i w szerokim zakresie zostały przedstawione w publikacjach nr 1 i 2.

W rozdziale „Założenia i cel pracy” Doktorant podaje, iż głównym celem pracy doktorskiej było poszukiwanie odpowiedzi na pytanie, czy poziom ekspresji genu *HMGAI* może być czynnikiem prognostycznym w raku płuca, oraz czy oznaczanie jego poziomu we krwi obwodowej u chorych z NDRP w czasie diagnozy i okresie pooperacyjnym może być czynnikiem użytecznym w przewidywaniu dalszego przebiegu choroby. W opinii Recenzenta część pierwsza tego rozdziału jest zbędnym powtórzeniem informacji przedstawionych we wcześniejszym rozdziale.

Celami szczegółowymi rozprawy doktorskiej była: i). ocena wartości prognostycznej ekspresji genu *HMGAI* w raku płuca w oparciu o wykorzystanie publicznie dostępnych danych zgromadzonych w bazach genomowych oraz ii). ocena wartości prognostycznej poziomu ekspresji genu *HMGAI* w tkance nowotworowej i krwi pozyskanych od chorych z NDRP.

Kolejny rozdział stanowi „Omówienie osiągnięć badawczych w pracach wchodzących w skład cyklu”, co stanowi dobry i syntetyczny opis wykonanych analiz i badań, które zostały przedstawione w opublikowanych pracach stanowiących podstawę ubiegania się o stopień dr n. farm. Należy podkreślić, iż rozdział ten zawiera również uzasadnienie połączenia publikacji w cykl, co jest bardzo pożądanym elementem dysertacji, gdyż wskazuje na dojrzałość naukową Doktoranta, umiejętność planowania i projektowania badań, formułowania celów badawczych, sposobu ich realizacji, oraz co najważniejsze pozwala na spójną analizę i wyciąganie wniosków, co zostało przedstawione w kolejnym rozdziale „Podsumowanie i wnioski”. W tej spójnej prezentacji zabrakło mi rozdziału dotyczącego syntetycznego opisu zastosowanych metod i technik badawczych, co byłoby dobrym uzupełnieniem przedłożonej rozprawy zwłaszcza z uwagi na specyfikę zastosowanych przez Doktoranta metod badawczych.

W pierwszej publikacji („**Znaczenie białek *HMGAI*, *HMGA2* i *HMGB1* oraz ich genów w raku płuca**”) o charakterze przeglądowym Doktorant przedstawił aktualny stan wiedzy na temat wybranych białek i kodujących je genów z rodziny *HMG* - *HMGAI*, *HMGA2* i *HMGB1*, oraz ich charakterystykę molekularną i biochemiczną, a także udział i znaczenie w procesie nowotworzenia, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w patogenezie i

progresji raka płuca. Doktorant skupił się zwłaszcza na analizie dostępnych informacji na temat ekspresji genu *HMGAI* w raku płuca z uwagi na stosunkowo niewielką ilość danych na ten temat oraz niejednoznaczne ich wyniki, co bardzo dobrze uzasadniło wybór dalszych kroków naukowych, które stały się podstawą do zaprojektowania i zrealizowania pozostałych dwóch prac składających się na przedłożony cykl. Ważną obserwacją jest wskazanie, iż przeważająca część przeanalizowanych danych pokazuje na wzrost ekspresji genów *HMGAI*, *HMGAI2* i *HMGB1*, jak również ilości kodowanych przez nie białek w tkance raka płuca w stosunku do prawidłowych tkanek tego narządu. Ponadto Doktorant zwrócił uwagę, iż dostępne nieliczne dane, dotyczące ww. związku z takimi cechami jak obecność przerzutów, stopień zaawansowania klinicznego, stopień zróżnicowania histologicznego, a także czasu przeżycia pacjentów, są niejednoznaczne. Stało się to uzasadnioną przesłanką do kontynuowania tej tematyki w dalszych badaniach.

Praca ta stanowi dobre wprowadzenie do drugiej publikacji (*„Prognostic Significance of HMGAI Expression in Lung Cancer Based on Bioinformatics Analysis”*) o charakterze analizy bioinformatycznej. Jest to bardzo obszerne i dogłębne opracowanie przedstawiające bardzo atrakcyjny i wielce obiecujący trend wykorzystywania informatycznych narzędzi badawczych do analizy dostępnych wielkoskalowych baz danych. W publikacji w oparciu o kilka publicznie dostępnych baz danych dotyczących ekspresji genu *HMGAI* w raku płuca, z innowacyjnym wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych Doktorant przeprowadził analizy porównawcze i wykazał, że gen *HMGAI* ulega nadekspresji w obydwu typach raka (DRP i NDRP) w stosunku do tkanek prawidłowych, a stopień nadekspresji wiąże się z krótszym czasem przeżycia pacjentów z gruczolakorakiem płuc, ale nie u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym płuc. Jest to niezwykle istotna obserwacja dla skutecznej terapii i efektywnej opieki nad pacjentem z nowotworem płuc. Ponadto Doktorant zaobserwował związek ekspresji *HMGAI* z poziomem metylacji tego genu w raku płuca, co może stać się celem przyszłych działań terapeutycznych w tym obszarze.

Ostatnia z cyklu prac, praca o charakterze eksperymentalnym (*„HMGAI gene expression level in cancer tissue and blood samples of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: preliminary report”*), jest naturalną konsekwencją wieńczącą logicznie zaplanowany schemat badawczy i publikacyjny. Przedmiotem badań w tej publikacji była ocena ekspresji genu *HMGAI* równolegle w pozyskanej śródoperacyjnie tkance nowotworowej i krwi obwodowej pobranej od pacjentów z NDRP, co jest niezwykle cennym badaniem z uwagi na ograniczoną liczbę danych w tym zakresie. Na docenienie zasługuje wysiłek, który został włożony w stronę techniczną organizacji badania związany z równoczesnym pozyskaniem śródoperacyjnego materiału badanego, dostępnego jedynie w trakcie zabiegu i krwi obwodowej, która jest stosunkowo najłatwiej dostępnym materiałem biologicznym do badań. Zasadniczym celem pracy była ocena potencjalnej użyteczności oznaczania ekspresji genu *HMGAI*, szczególnie we krwi, w prognozowaniu przebiegu NDRP i ocenie przeżycia chorych, co ma ogromną wartość poznawczą, a również potencjalną aplikacyjną, co jest warte podkreślenia.

Badania ekspresji genu *HMGAI* zostały dokonane w pobranej śródoperacyjnie tkance nowotworowej, jak i krwi obwodowej pobranej w czasie diagnozy oraz 100 dni i 1 rok po operacji usunięcia guza pierwotnego, a wyniki odniesiono również do narażenia na dym tytoniowy, jako znaczącego czynnika ryzyka rozwoju raka płuca. W opinii Recenzenta warto byłoby doprecyzować co oznacza określenie „w czasie diagnozy”. Wart podkreślenia jest fakt, iż w dostępnym piśmiennictwie naukowym brak jest danych tego typu, co tym bardziej czyni pracę nowatorską, a uzyskane wyniki interesującymi. Jako wartą podkreślenia obserwację należy wskazać

zaobserwowany przez Doktoranta systematyczny spadek ekspresji *HMGAI* do 1 roku po operacji oraz tendencję do krótszego całkowitego czasu przeżycia pacjentów, u których ekspresja *HMGAI* mierzona we krwi 100 dni po operacji była wysoka. Mimo braku wyraźnego związku ekspresji genu w tkance guza nowotworowego z cechami klinicznymi czy z całkowitym czasem przeżycia pacjentów z NDRP, to poziom mRNA *HMGAI* we krwi może być obiecującym czynnikiem użytecznym w prognozowaniu przebiegu choroby w chorych z NDRP.

Uzyskane wyniki i poczynione obserwacje zostały przez Doktoranta dodatkowo zebrane w rozdziale 6 – „Podsumowanie i wnioski” w postaci 7 punktów, które syntetycznie podsumowują poczynione obserwacje i uzyskane wyniki. Zostały one również przedyskutowane w odniesieniu do aktualnego piśmiennictwa. We wszystkich pracach cyklu Doktorant zwrócił uwagę na najważniejsze aspekty podjętego tematu badawczego, zarówno dotyczące podłoża teoretycznego (publikacja 1) jak i wyników z prac badawczych (praca 2 i 3) i przekonująco omówił wyniki wypływające z własnych badań w odniesieniu do danych dostępnych w piśmiennictwie światowym, co wskazuje na dojrzałość naukową i doświadczenie badawcze Pana magistra.

Jedynie drobne uwagi Recenzenta dotyczą strony stylistycznej i gramatycznej pracy, co czasami zaburza odbiór pracy, ale jest to wytłumaczalne i nie wpływa na wartość merytoryczną przedłożonego do recenzji cyklu prac. Jednak wydaje się, iż bardziej właściwym byłoby formułowanie stwierdzeń w pierwszej osobie liczby pojedynczej, a nie trzeciej, gdyż dysertacja doktorska jest opracowaniem napisanym przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia dr n. farm, więc w taki sposób treści powinny być przedstawiane.

Podsumowując, Pan mgr Lias Saed w sposób prawidłowy zaplanował, zaprojektował i przeprowadził analizy i badania, których wyniki z powodzeniem zostały opublikowane i zaprezentowane w postaci cyklu publikacji składających się na recenzowaną pracę doktorską. Poczynione obserwacje i uzyskane wyniki mają dużą wartość naukową, a oprócz aspektów poznawczych, również potencjał aplikacyjny. Zachęcam Doktoranta do kontynuowania badań i obserwacji w dłuższej perspektywie czasowej, co z pewnością wzmocni aspekt aplikacyjny przeprowadzonych badań.

W oparciu o powyższe, z przyjemnością mogę stwierdzić, iż przedłożona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ww. Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, o dopuszczenie Pana mgr Lias Saed do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również do Rady Nauk Farmaceutycznych o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana magistra Lias Saed zatytułowanej „Ocena znaczenia prognostycznego ekspresji genu *HMGAI* w raku płuca” stosowną nagrodą ze względu na wysoką punktację i IF cyklu prac składających się na rozprawę doktorską oraz wysoką wartość naukową, zastosowany warsztat badawczy oraz potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Agnieszka Piwowar
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA i ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
kierownik
prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

Wrocław, 20.05.2023r.