

dr hab. n. med. Olga Koper-Lenkiewicz  
Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Waszyngtona 15A, 15-269 Białystok  
Tel./Fax: +48 85 831 8584  
e-mail: olga.koper-lenkiewicz@umb.edu.pl

**Recenzja pracy doktorskiej pt.**  
**„Ocena wpływu ekspresji oraz roli wybranych polimorfizmów genów**  
**kodujących białka z rodziny SMAD**  
**w rozwoju raka jelita grubego”**

**Praca realizowana w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej**  
**Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**  
**Promotor – prof. dr hab. n. farm. Ewa Balcerczak**

Według Światowej Organizacji Zdrowia rak jelita grubego jest trzecim najczęstszym nowotworem na świecie, częściej diagnozowanym u mężczyzn niż u kobiet. Ponad 50% pacjentów otrzymuje diagnozę z przerzutami, gdy nowotwór jest w zaawansowanym stadium. Ze względu na miejscowe nawroty i odległe przerzuty wskaźnik śmiertelności w przypadku pacjentów z rakiem jelita grubego jest bardzo wysoki i wynosi 30% u kobiet i 40% u mężczyzn. Patomechanizm raka jelita grubego jest skomplikowany i zależy od wielu czynników genetycznych, molekularnych i środowiskowych. Rak jelita grubego często zaczyna się od mutacji w genach, które kontrolują wzrost i podział komórek. Najważniejszymi genami związanymi z rakiem jelita grubego są geny supresorowe guza (np. *APC*, *p53*, *SMAD4*) oraz geny naprawy DNA (np. *MSH2*, *MLH1*). Mutacje tych genów prowadzą do utraty zdolności komórek do kontrolowania swojego wzrostu i podziału. Mimo że jesteśmy już dobrze zaznajomieni z molekularnymi podstawami raka jelita grubego, nadal prowadzi się badania w celu pełniejszego zrozumienia mechanizmów prowadzących do powstawania tego

nowotworu oraz poprzedzających go zmian prekursorowych, czyli gruczolaków jelita grubego. Wobec tego, cel i założenia przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej stanowią istotny aspekt, który doskonale wpisuje się w obecne ogólnoswiatowe trendy naukowe i kliniczne.

Przedstawione do recenzji badania zostały wykonane i opisane przez mgr Agnieszkę Wosiak pod kierownictwem prof. dr hab. n. farm. Ewy Balcerczak. Podstawę przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej stanowi cykl trzech ściśle ze sobą powiązanych publikacji oryginalnych, napisanych w języku angielskim oraz opublikowanych w latach 2017-2023 w czasopiśmie z listy filadelfijskiej: *Pathology – Research and Practice, Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, oraz *Bioengineering*. Sumaryczny współczynnik oddziaływania tych prac wynosi 9,118 zaś liczba punktów ministerialnych 140. We wszystkich pracach mgr Agnieszka Wosiak jest pierwszym autorem, a swój udział w przygotowaniu poszczególnych publikacji ocenia na 50%, 50% i 50%.

Rozprawa liczy łącznie 74 strony, poprzedzona jest spisem treści, wykazem publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej oraz wykazem skrótów. Treść właściwej rozprawy doktorskiej rozpoczyna zwięzłe uzasadnienie tematyki badawczej, które syntetycznie i wszechstronnie omawia kwestie związane z tematem dysertacji. Doktorantka rozprawę rozpoczyna od przedstawienia epidemiologii raka jelita grubego. Następnie skupia się na genetycznym podłożu rozwoju raka jelita grubego, omawiając znaczenie mutacji genów oraz ich wpływ na rozwój tego nowotworu. Doktorantka podkreśla, że molekularny patomechanizm rozwoju raka jelita grubego jest wyjątkowo skomplikowany, co wymaga dokładnej analizy. W dalszej części swojej rozprawy, badaczka koncentruje się na roli szlaku sygnałowego transformującego czynnika wzrostu beta (TGF $\beta$ ) w patogenezie raka jelita grubego. Szczegółowo wyjaśnia, jak ten szlak sygnałowy reguluje procesy wzrostu, różnicowania i apoptozy komórek w jelitach. Kluczowymi mediatorami w tym kontekście są białka z rodziny SMAD, które przekazują sygnały TGF $\beta$  do jądra komórkowego, wpływając na ekspresję genów związanych z rozwojem raka jelita grubego. Na kolejnych stronach pracy zostały przedstawione założenia oraz cele naukowe tej rozprawy, a także szczegółowy opis części doświadczalnej, z podziałem na poszczególne prace zawarte w rozprawie. W tym obszarze Autorka zawarła prezentację materiału biologicznego wykorzystanego do prowadzenia badań oraz szczegółową metodologię eksperymentalną. Kolejnym etapem była analiza uzyskanych wyników i ich dyskusja przez Doktorantkę, a na zakończenie pracy dokonano podsumowania osiągniętych rezultatów, przedstawiając również przyszłe perspektywy i plany badawcze. Rozprawę kończy streszczenie w języku polskim i angielskim, podziękowania, piśmiennictwo, obejmujące 60 pozycji literatury, załącznik w postaci wydruku publikacji wchodzących w skład rozprawy

doktorskiej, oraz oświadczenia Autorki i współautorów. Całkowity dorobek naukowy Pani mgr Agnieszki Wosiak to autorstwo lub współautorstwo 10. oryginalnych prac naukowych oraz 2. prac przeglądowych o łącznym współczynniku IF 43,453 i punktacji MEiN 844.

Zasadniczy układ rozdziałów oraz opracowanie graficzne rozprawy doktorskiej są przejrzyste i starannie zredagowane, co zasługuje na wyróżnienie. Treść pracy doskonale koresponduje z jej tytułem, zaś rozdziały są spójne z ich nagłówkami. Rozprawę doktorską charakteryzuje naukowy pragmatyzm, manifestujący się w logicznie ułożonym ciągu rozdziałów. W mojej ocenie przedstawiona mi do recenzji dysertacja spełnia standardy stawiane rozprawom doktorskim.

Za cel pracy Doktorantka postawiła sobie ocenę wpływu poziomu ekspresji i występowania wybranych wariantów polimorficznych genów *SMAD* na rozwój i przebieg raka jelita grubego oraz ocenę zależności między ekspresją genu *SMAD4* a efektem zastosowanego leczenia z użyciem 5-fluorouracylu. Zaburzenia ekspresji genu *SMAD4* mają znaczący udział w rozwoju raka trzustki, piersi, czy jajnika. Udowodniono również, że utracenie funkcji, jaką pełni gen *SMAD4* u pacjentów z rakiem jelita grubego wiąże się z gorszym rokowaniem, cięższym przebiegiem choroby i niższą przeżywalnością, ze względu na zdolność komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów, szybszą proliferację i zaburzenia apoptozy. Zmiany genetyczne prowadzące do inaktywacji lub utraty genu *SMAD4* prawdopodobnie są związane z późniejszym stadium rozwoju nowotworu.

W publikacji pierwszej Autorka podjęła się analizy względnego poziomu ekspresji genu *SMAD4* w grupie 76. pacjentów z rakiem jelita grubego oraz oceny porównującej poziom ekspresji genu *SMAD4* względem wybranych parametrów kliniczno-patologicznych raka jelita grubego. Analizę względnego poziomu ekspresji genu *SMAD4* przeprowadzono metodą Real-time PCR na próbach RNA, pozyskanych z fragmentów tkanek pobranych podczas zabiegu chirurgicznego wycięcia guza od pacjentów z rakiem jelita grubego. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania wykazały, że u ponad połowy pacjentów stwierdzono niższy poziom mRNA genu *SMAD4* względem genu referencyjnego. Ponadto analiza wykazała, że poziom ekspresji genu *SMAD4* nie różnił się istotnie w zależności od cech kliniczno-patologicznych pacjentów z rakiem jelita grubego. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wyciąga wniosek, że brak istotnej statystycznie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji genu *SMAD4* a ocenianymi parametrami patologicznymi może wynikać ze stosunkowo małej liczby analizowanych przypadków w grupie badanej i niewielką różnorodnością względem ocenianych cech w grupie, zwłaszcza dotyczących głębokości naciekania nowotworu czy obecności ognisk przerzutowych. Wykazując się dużą dojrzałością i krytycyzmem naukowym

Doktorantka zauważyła także, że rozszerzenie zaprezentowanej analizy oceniającej poziom ekspresji genu *SMAD4* w raku jelita grubego na bardziej zróżnicowanej grupie pacjentów pod względem stopnia zaawansowania nowotworu być może dałoby bardziej miarodajne wyniki potwierdzające lub wykluczające udział ekspresji tego genu w rozwoju badanej jednostki chorobowej.

W publikacji drugiej Autorka podjęła się analizy porównawczej częstości występowania 3. wariantów polimorficznych genu *SMAD4* oraz 1 wariantu polimorficznego genu *SMAD3* w grupie pacjentów z rakiem jelita grubego względem grupy kontrolnej. Ponadto oceniła częstość występowania określonych genotypów dla wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu względem ocenianych parametrów kliniczno-patologicznych pacjentów z rakiem jelita grubego. Analizę jakościową wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w obrębie genów *SMAD3* i *SMAD4* wykonano przy pomocy metody PCR-RFLP w 80. próbkach DNA, pozyskanych z tych samych skrawków tkanek raka jelita grubego jak również próby DNA wyizolowane z krwi obwodowej pozyskane od 60. osób zdrowych. Dla wszystkich polimorfizmów pojedynczego nukleotydu rozkład częstości występowania genotypów był zgodny z równowagą Hardy'ego-Weinberga. Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów w grupach, co może sugerować że żaden z ocenianych polimorficznych wariantów badanych genów nie predysponuje do zwiększonego ryzyka zachorowania na raka jelita grubego. Ponadto nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy występowaniem określonego genotypu genów *SMAD* a danym parametrem kliniczno-patologicznym. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wysnuwa wniosek, że brak tejże zależności może wynikać z małej różnorodności pod względem niektórych cech patologicznych w grupie badanej, w której większość pacjentów nie wykazywała obecności przerzutów odległych.

W publikacji trzeciej Doktorantka podjęła się oceny wpływu 5-fluorouracylu na poziom ekspresji genu *SMAD4* a także na żywotność, indukcję apoptozy i uszkodzeń DNA w komórkach raka jelita grubego pochodzących z ludzkich linii komórkowych CACO-2, SW480 oraz SW620. W tym celu wykorzystwała metodę Real-time PCR, kolorymetryczny test żywotności komórek MTT oraz cytometrię przepływową. Przeprowadzone badania wykazały nieznaczny udział 5-fluorouracylu w inicjowaniu zmian zachodzących w komórkach linii CACO-2 i prowadzących do śmierci komórkowej. Możliwy jest związek tej obserwacji z pierwotnie obniżonym poziomem genu *SMAD4* w tych komórkach, co jednak nie zostało potwierdzone. Ponadto 5-fluorouracyl w zależności od użytego stężenia może regulować

ekspresję genu *SMAD4*. Jednak jak sama Doktorantka podkreśla, uzyskane wyniki badań wstępnych należałoby potwierdzić na innych liniach komórkowych raka jelita grubego.

O dużej dojrzałości naukowej Doktorantki świadczy podrozdział pt. *Perspektywy i plany na przyszłość*, w którym prezentuje swoje zamiary pogłębienia badań naukowych o wykonanie analiz oceniających transdukcję sygnałów komórkowych poprzez szlak TGF $\beta$  w sposób niezależny od *SMAD4* w raku jelita grubego. Jej zamiar kontynuacji badań jest dowodem na jej głęboką wiedzę, zdolność do krytycznego myślenia i zaangażowanie w rozwijanie wiedzy naukowej. To także pokazuje, że Doktorantka jest gotowa na wyzwania związane z badaniami i ma jasno sprecyzowane cele, które mogą przynieść istotne korzyści dla dziedziny medycyny i nauk biologicznych. Jej prace w tym zakresie mogą przyczynić się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych i zwiększenia naszego zrozumienia molekularnych mechanizmów związanych z rakiem jelita grubego. Dodatkowo, należy podkreślić fakt dokładnego przedstawienia przez Doktorantkę części metodologicznej przeprowadzonych badań. Szczegółowy opis tej sekcji nie tylko dowodzi wiarygodności i rzetelności wyników, ale także umożliwia innym badaczom powtórzenie eksperymentu, wykorzystując te same metody i procedury. Skupianie się na publikowaniu wyników jedynie istotnych statystycznie może prowadzić do niewłaściwej reprezentacji rzeczywistości naukowej. Dlatego warto podkreślić, że Doktorantka w swojej dysertacji skupiła się także na prezentacji wyników nieistotnych statystycznie, co świadczy o jej rzetelności naukowej i pomaga w uniknięciu tzw. "publikacyjnego przekłamania" a także oszczędza czas, zasoby i ogranicza marnotrawstwo w badaniach naukowych.

Reasumując, stwierdzam, że badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej Autorki stanowią znaczący wkład w dziedzinę nauki. Doktorantka wykazała się nie tylko doskonałą wiedzą w swojej dziedzinie, ale także umiejętnością wyboru aktualnego tematu badawczego. Jej praca opiera się na solidnej metodologii, a jej badania są owocem staranności, dokładności i szerokiego zakresu eksperymentów przeprowadzonych przy użyciu wystandaryzowanych metod badawczych. Wyniki uzyskane w ramach tych badań są istotne i mogą przyczynić się do dalszego rozwoju wiedzy naukowej w dziedzinie molekularnych podstaw rozwoju raka jelita grubego. Wnioski pracy są klarowne, logiczne i oparte na dostarczonych danych, co świadczy o głębokim zrozumieniu tematu oraz umiejętności syntezy i interpretacji wyników.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Wosiak pt.: *"Ocena wpływu ekspresji oraz roli wybranych polimorfizmów genów kodujących białka z rodziny SMAD w rozwoju raka jelita grubego"* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia

wszystkie wymogi zwyczajowe i ustawowe, stawiane rozprawom doktorskim w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych, określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Wosiak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. **Jednocześnie proszę Radę Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o uznanie dysertacji za wyróżniająca się.**

09744 dr hab. n. med. Olga Martyna Koper-Lenkiewicz  
DIAGNOSTA LABORATORYJNY  
*O. Koper-Lenkiewicz*  
specjalista laboratoryjnej  
diagnostyki medycznej

dr hab. n. med. Olga Koper-Lenkiewicz