



dr hab. n. med. Agnieszka Woźniak-Kosek

Warszawa, 28. sierpnia 2023r

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ W OPARCIU O CYKL PUBLIKACJI
NAUKOWYCH**

**mgr anal. med. Agnieszki Wosiak pt.: „ Ocena wpływu ekspresji oraz
roli wybranych polimorfizmów genów kodujących białka z rodziny SMAD
w rozwoju raka jelita grubego”.**

**Przygotowanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. n. farm. Ewy
Balcerczak**

**w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.**

Podjęta w rozprawie tematyka dotycząca diagnostyki raka jelita grubego na poziomie molekularnym stanowi ważny i aktualny problem badawczy oraz posiada walory o znaczeniu praktycznym dla rutynowej diagnostyki tego schorzenia. Nowotwory jelita grubego i odbytnicy pozostają jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Fakt, że nowotworzenie przebiega wieloetapowo, znany był już od połowy XX wieku, jednak dopiero rozwój technik biologii molekularnej w latach 80-tych ubiegłego wieku pozwolił na zidentyfikowanie zmian molekularnych, które stoją za inicjacją oraz progresją guzów. Białka z rodziny SMAD są unikalną grupą białek uczestniczącą w przekazywaniu sygnału do wnętrza komórki po pobudzeniu receptora TGF- β . Wyniki opublikowanych badań wskazują na dużą zależność między ekspresją białek z rodziny SMAD, a stopniem zaawansowania i rokowaniem w nowotworach złośliwych m. in. w raku jelita grubego, trzustki i ostrej białaczki szpikowej. Poszukiwanie nowych, swoistych markerów molekularnych może w przyszłości pełnić rolę zarówno diagnostyczną jak i predykcyjną dla zastosowanego leczenia oraz może przyczynić się do szybszej kwalifikacji chorych na raka jelita grubego do określonych schematów terapeutycznych.

Ocena części metodologicznej.

Dysertacja składa się z liczącego 28 stron autoreferatu i trzech prac oryginalnych stanowiących jej podstawę:

1. Wosiak A, Wodziński D, Kolasa M, Sałagacka-Kubiak A, Balcerczak E. SMAD-4 gene expression in human colorectal cancer: Comparison with some clinical and pathological parameters. *Pathol Res Pract*. 2017 Jan;213(1):45-49, doi: 10.1016/j.prp.2016.10.013. Epub 2016 Oct 26. PMID: 27914767.
2. Wosiak A, Wodziński D, Michalska K, Pietrzak J, Kordek R, Balcerczak E. Assessment of the Role of Selected SMAD3 and SMAD4 Genes Polymorphisms in the Development of Colorectal Cancer: Preliminary Research. *Pharmgenomics Pers Med*. 2021 Jan 29;14:167-178, doi: 10.2147/PGPM.S281958. PMID: 33542644; PMCID: PMC7853629.
3. Wosiak A, Szmajda-Krygier D, Pietrzak J, Boncela J, Balcerczak E. Assessment of the Influence of 5-Fluorouracil on SMAD4 and TGFB1 Gene Expression, Apoptosis Induction and DNA Damage in Human Cell Lines. *Bioengineering*. 2023; 10(5):570.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering10050570>

Dla przedstawionego cyklu publikacji sumaryczny IF (ISI Journal Citation Reports) zgodny z rokiem publikacji wynosi 9,118, zaś punktacja MNISW jest równa 140.

Prawidłowość układu pracy i struktury podziału treści oceniam wysoko

Układ autoreferatu ma klasyczny charakter: spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie, cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej, część doświadczalną z podaniem stosowanych materiałów i metod, podsumowaniem wyników badań i wnioski streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo. Konstrukcję pracy należy uznać za logiczną i podkreślającą kolejność zagadnień, którymi zajmowała się Doktorantka.

Do dysertacji dołączono oświadczenia Doktorantki i współautorów określające ich wkład w powstanie w/w publikacji. We wszystkich trzech pracach oryginalnych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej udział Autorki stanowił 50%. Udział na poziomie 50% w tworzeniu prac jest zadawalający, ale moim zdaniem powinien być zdecydowanie wyższy, zwłaszcza, że

doktorantka te prace wybrała spośród swojego dorobku naukowego na te stanowiące podstawę rozprawy naukowej na stopień doktora n. medycznych.

Dobór piśmiennictwa naukowego i wykorzystania źródeł oceniam wysoko. Piśmiennictwo obejmuje 60 pozycji z lat 1996-2021. Stwierdzam, że cytowane piśmiennictwo jest bezpośrednio związane z tematyką pracy i jest aktualne.

Formułowanie problemów i założeń badawczych jest poprawne.

Celem naukowym rozprawy doktorskiej była ocena wpływu poziomu ekspresji i występowania wariantów polimorficznych genów SMAD na rozwój i przebieg raka jelita grubego oraz ocena zależności między ekspresją genu SMAD3 i SMAD 4, a efektem zastosowanego leczenia z użyciem 5-fluorouracylu (5-FU). Badania przeprowadzone zostały z użyciem 3 linii komórkowych jelita grubego oceniając ich żywotność, apoptozę i stopień uszkodzenia DNA komórek.

Cele naukowe zostały przedstawione w autoreferacie i zostały również opisane w dołączonych do dysertacji 3 publikacjach naukowych. Wszystkie wyszczególnione przez doktorantkę cele są spójne i były realizowane w oparciu o badania na które uzyskano zgodę lokalnej komisji bioetyki.

Trafność doboru materiałów, metod i narzędzi badawczych wraz z umiejętnością ich zastosowania jest prawidłowe.

Badania przeprowadzono w grupie 76 pacjentów z rakiem jelita grubego, w większości byli to pacjenci z lokalizacją guza w okrężnicy rzadziej w odbytnicy. Częściej z naciekiem naczyń krwionośnych przez nowotwór. Analizę względnego poziomu ekspresji genu SMAD 4 przeprowadzono na próbkach RNA pozyskanych z fragmentów tkanek pobranych podczas zabiegu chirurgicznego wycięcia guza od pacjentów z rakiem guza jelita grubego. Do przeprowadzenia analizy jakościowej wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w obrębie genów SMAD3 i SMAD 4 wykorzystano próby DNA pozyskane z w/w skrawków pobranych podczas zabiegu chirurgicznego usunięcia guza oraz z krwi obwodowej pozyskanej od zdrowych dawców z banku krwi. Badania oceniające wpływ 5-FU na poziom ekspresji genu SMAD 4 przeprowadzono na RNA wyizolowanym z komórek jelita grubego ludzkich linii komórkowych CACO-2, SW480 i SW620 z kolekcji ECACC.

Doktorantka na kilku stronach swojego autoreferatu opisuje szczegółowo metodykę badań i narzędzi badawczych wskazując publikacje dołączone do rozprawy, które to dokładnie opisują metodykę i schemat postępowania. Autorka opracowała warsztat służący do opracowań statystycznych, który jest szczegółowo przedstawiony w załączonych pracach stanowiących podstawę dysertacji. Mgr A. Wosiak podkreśla praktyczne implikacje wyników swojej pracy

choć są one w kilku miejscach niejednoznaczne i wymagają rozszerzenia badań potwierdzający w tym zakresie.

Narzędzia badawcze są dobrane prawidłowo, co pozwoliło zrealizować zadania badawcze na najwyższym z możliwych poziomie naukowym, czego dowodem są publikacje naukowe będące tematem tej dysertacji.

Ocena części merytorycznej.

Temat pracy i trafność podjętej problematyki badawczej jest oryginalny co skłania mnie do wysokiej oceny tych parametrów.

Molekularne mechanizmy prowadzące do kancerogenezy w obrębie jelita grubego są złożone i jeszcze nie w pełni poznane stąd praca podjęta przez Doktorantkę jest bardzo cenna. Wprawdzie nie wszystkie cele i hipotezy badawcze udało się potwierdzić, niemniej jednak przy tak złożonym problemie nowotworów jelita grubego takie informacje również są ważne, ponieważ wskazują że tego typu badania nie zawsze przekładają się na efekt terapeutyczny i należy szukać innych rozwiązań.

Uzyskane rezultaty w przedstawionej mi do oceny dysertacji mają znaczenie kliniczne.

Wyniki uzyskane w tej dysertacji nie potwierdziły wszystkich hipotez badawczych, jednak dostarczyły cennych informacji na temat znaczenia genów SMAD w patogenezie raka jelita grubego oraz w odpowiedzi komórkowej na zastosowane leczenie. Znaczenie genu SMAD4 w kancerogenezie jelita grubego jest potwierdzone naukowo, jednak na podstawie uzyskanych danych nie stwierdzono związku między poziomem ekspresji genu SMAD4, a stadium zaawansowania klinicznego raka jelita grubego. Autorka wskazuje że brak takiej zależności może wynikać z małej różnorodności względem ocenianych parametrów w grupie badanej.

Nie potwierdziła się również hipoteza dotycząca zależności pomiędzy częstością występowania określonych genotypów dla analizowanych SNPs, a ryzykiem rozwoju raka jelita grubego lub nasileniem stadium zaawansowania choroby.

Kończącym etapem pracy była analiza wpływu działania cytotoksycznego 5-FU na procesy komórkowe oraz na poziom ekspresji genu SMAD4. Tego typu chemioterapia jest wykorzystywana jako leczenie uzupełniające u pacjentów chorych na raka jelita grubego. Autorka dysertacji przedstawia wyniki, które wskazują, że przy zastosowaniu 5-FU w wyższych stężeniach i znacznie dłuższym czasie ekspozycji znacząco wzrasta ekspresja genu SMAD4, co prawdopodobnie przekłada się na lepszą efektywność terapii z użyciem tego związku.

Wobec uzyskanych wyników autorka przedstawia perspektywy i plany na przyszłość aby poszerzyć zakres badań.

Analiza ekspresji najważniejszych genów biorących udział w szlaku TGF- β w grupie pacjentów z rakiem jelita grubego i powiązanie otrzymanych danych z parametrami kliniczno-patologicznymi może dostarczyć cennych informacji na temat nowych czynników odgrywających rolę w etiopatogenezie raka jelita grubego na różnych jego etapach.

Pani mgr anal. A. Wosiak udowodniła w ten sposób swoje szerokie kompetencje, skrupulatność i wielokierunkowe zdolności badawcze, niezbędne w naukach farmaceutycznych.

Pytania, na które warto byłoby poznać odpowiedź to:

- ✓ Jakie inne linie komórkowe mogły by być optymalnie użyte w dalszych badaniach nad regulacją ekspresji genu SMAD4 zależną od stężenia chemioterapeutyku ?
- ✓ Jak powinna zostać z charakteryzowana grupa badana pod względem parametrów patologicznych aby sprawdzić predyspozycje do narażenia na raka jelita grubego?
- ✓ W jakich procesach komórkowych ważnych w patogenezie raka jelita grubego odgrywa szlak sygnałowy TGF- β ?
- ✓ Jakie mogą być efekty uboczne stosowania 5-FU w dużych dawkach i wydłużonym czasie dla pacjentów z różnym zaawansowaniem choroby nowotworowej – rak jelita grubego?

Poprawność językowa, stylistyczna i interpunkcyjna.

Rozprawa została przygotowana w sposób poprawny językowo z wykorzystaniem właściwych form stylistycznych. Niemniej jednak z obowiązku Recenzenta muszę wskazać, iż w autoreferacie występują błędy interpunkcyjne i stylistyczne, co nie wpływa w znaczący sposób na zrozumienie tekstu i nie umniejsza wartości rozprawy. Zdania są formułowane poprawnie, choć moim zdaniem mogłyby być mniej rozbudowane, co spowodowałoby, że tekst byłby bardziej przejrzysty i zrozumiały dla czytelnika. Doktorantka ma tendencję do stosowania skrótów myślowych, które dla czytelnika nie związanego z biologią molekularną i w/w tematyką mogą być trudne do zrozumienia. Edycja pracy jest staranna i prawidłowa.

Wniosek końcowy.

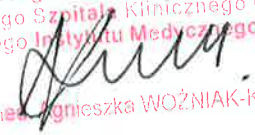
Doktorantka wykazuje się umiejętnością korzystania z piśmiennictwa naukowego, które jest trafnie cytowane w całej dysertacji. Potrafi przygotować prace naukowe, czego dowodem są przedłożone w dysertacji 3 opublikowane w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym prace dotyczące omawianego tematu pt. „Ocena wpływu ekspresji oraz roli wybranych

polimorfizmów genów kodujących białka z rodziny SMAD w rozwoju raka jelita grubego". Podsumowując recenzję należy podkreślić, że jest ona opracowaniem naukowym, które wzbogaca wiedzę z tego zakresu. Może być również praktyczną wskazówką dla klinicyстів o celowości włączanej terapii antynowotworowej w raku jelita grubego. Dokonując oceny całościowej dysertacji stwierdzam, że stanowi ona oryginalne rozwiązanie przedstawionego problemu naukowego, choć nie do końca udało się potwierdzić wszystkie hipotezy badawcze, jednak wskazuje to na wysoki poziom wiedzy teoretycznej, która pozwoliła na podjęcie tak trudnych w interpretacji badań. Stwierdzam, że recenzowana praca odpowiada warunkom stawianym tego typu opracowaniom i wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi panią mgr anal. Agnieszka Wosiak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Analizując dobór tematu rozprawy, postawione cele i pytania badawcze, strukturę i układ pracy wraz z wykorzystywanymi narzędziami badawczymi, wartością naukową oraz spełnieniem przesłanek formalnych stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr anal. med. Agnieszki Wosiak pt. : „ Ocena wpływu ekspresji oraz roli wybranych polimorfizmów genów kodujących białka z rodziny SMAD w rozwoju raka jelita grubego”. Spełnia wymogi określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule zakresie sztuki .

Do takiego stanowiska upoważniają mnie następujące argumenty:

1. Właściwe przygotowanie pod względem formalnym dysertacji w oparciu o cykl publikacji naukowych.
2. Spójna i logiczna struktura autoreferatu i przedstawionych prac
3. Prawidłowo określone cele badawcze w autoreferacie i dołączonym cyklu publikacji naukowych.
4. Właściwy dobór narzędzi badawczych do przeprowadzenia badań
5. Walor kliniczny przedstawianych wyników dla pacjentów cierpiących na raka jelita grubego.

KIEROWNIK
Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej
Centralnego Szpitala Klinicznego MON
Wojskowego Instytutu Medycznego-PIB

dr hab. n. med. Agnieszka WOŹNIAK-KOSEK