dr hab. n. med. Dariusz Nejc
Klinika Chirurgii Onkologicznej, Katedra Onkologii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź 15.03.2018r

# Recenzja

**rozprawy habilitacyjnej oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr n. med. w zakresie biologii medycznej Doroty Pastuszak-Lewandoskiej wydana na zlecenie Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów**

Recenzję napisałem na podstawie przekazanych mi dokumentów tj.: autoreferatu, rozprawy habilitacyjnej, wykazu publikacji i analizy bibliometrycznej.

## Dane biograficzne

Dr Dorota Pastuszak-Lewandoska ukończyła studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, na kierunku Biologia; uzyskała stopień magistra biologii w 1991roku. Pracę magisterską „Metody rozpoznawania aneuploidii chromosomu X i genopatii sprzężonych z płcią" Kandydatka wykonała w Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej Instytutu Nauk Podstawowych Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi. W latach 1991-1992 jako stypendystka w ramach programu TEMPUS odbyła staż w Instytucie Genetyki Człowieka Uniwersytetu w Getyndze w Niemczech (Institut für Humangenetik der Universität Göttingen), gdzie zdobywała umiejętności z zakresu najnowszych technik biologii molekularnej. W roku 1992 Kandydatka rozpoczęła pracę jako pracownik naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej Instytutu Nauk Podstawowych Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi. W roku 1995 rozpoczęła studia podyplomowe z translatoryki, specjalizacja - tłumaczenie pisemne z języka angielskiego i niemieckiego, w Ośrodku Badań i Studiów Przekładowych Uniwersytetu Łódzkiego; pracę dyplomową złożyła w 1999 roku. W 2001 roku Kandydatka rozpoczęła pracę w Klinice Endokrynologii i Chorób Metabolicznych Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi i podjęła współpracę z Pracownią Endokrynologii Molekularnej Akademii Medycznej w Łodzi; w latach 2006-2009, kontynuując współudział w pracach badawczych prowadzonych

w Pracowni Endokrynologii Molekularnej, rozpoczęła pracę w Klinice Endokrynologii i Chorób Metabolicznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – jako pracownik naukowo-dydaktyczny, a od 2008 roku na stanowisku naukowo-technicznym. Kandydatka podejmując pracę w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Kliniki Endokrynologii i Chorób Metabolicznych UM, poznawała i wdrażała kolejne techniki z zakresu biologii molekularnej: począwszy od standaryzacji różnych metod izolowania DNA i RNA z krwi i tkanek, rozdziału kwasów nukleinowych w żelu agarozowym i poliakrylamidowym, poprzez techniki PCR aż do metody sekwencjonowania genów czy techniki badania poziomu ekspresji genów w czasie rzeczywistym (real-time PCR, qPCR), za której wprowadzenie do Pracowni była odpowiedzialna; ponadto, poszerzyła warsztat pracy o metodę MSPCR (MSP) służącą do analizy metylacji sekwencji DNA czy allelotypowanie mające na celu identyfikację niestabilności genetycznej typu LOH/MSI.

Dr Pastuszak-Lewandoska od 2009 roku do chwili obecnej pracuje w Zakładzie Molekularnych Podstaw Medycyny, w zespole prof. Ewy Brzeziańskiej-Lasoty, od 2014 – na stanowisku adiunkta. Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny był nowo powstałą jednostką, Kandydatka współuczestniczyła w jego organizacji, a przede wszystkim w utworzeniu laboratorium do prowadzenia badań naukowych.

Kandydatka uzyskała stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej w 2011 roku na podstawie dysertacji: „Analiza efektu epimutacji sekwencji promotorowych wybranych genów supresorowych (RASSF1A, VHL, CDH1) jako przyczyny zmiany ich ekspresji w łagodnych i złośliwych nowotworach tarczycy oraz w wolu guzkowym", która została wyróżniona.

Przedmiotem zainteresowań zawodowych i naukowych Kandydatki już od czasu studiów jest biologia molekularna, analiza mechanizmów genetycznych i epigenetycznych w chorobach nowotworowych oraz nowatorskie metody badawcze.

Kandydatka była wielokrotnie nagradzana i wyróżniana za swoje osiągnięcia. W 2010 roku otrzymała nagrodę za zajęcie pierwszego miejsca w sesji plakatowej podczas II Kongresu Współczesnej Onkologii w Poznaniu. Kilkukrotnie otrzymała Nagrodę Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi dla Nauczycieli Akademickich za osiągnięcia naukowe (nagrody zespołowe I stopnia) – w 2013 roku za cykl publikacji

dotyczących badania udziału wybranych czynników genetycznych w powstawaniu chorób autoimmunologicznych i nowotworów gruczołu tarczowego, - w 2014 roku za cykl publikacji dotyczących badania udziału wybranych czynników genetycznych w powstawaniu niedrobnokomórkowego raka płuca, - w 2016 roku za cykl publikacji pt: "Genetyczne i epigenetyczne mechanizmy uczestniczące w etiopatogenezie raka płuca", - w 2016 roku za cykl publikacji pt: " Poszukiwanie molekularnych markerów o wartości diagnostycznej i prognostycznej w przebiegu sarkoidozy płucnej ".

**Ocena osiągnięcia naukowego/rozprawy habilitacyjnej**

Osiągnięciem naukowym będącym podstawą złożonego przez dr n. med. w zakresie biologii medycznej Dorotę Pastuszak-Lewandoską wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego jest cykl publikacji obejmujących zagadnienie pt.: **„Analiza mechanizmów genetycznych i epigenetycznych uczestniczących w etiopatogenezie niedrobnokomórkowego raka płuca"**. Cykl obejmuje 9 publikacji oryginalnych o łącznej punktacji MNiSW 220 i łącznym wskaźniku wpływu (IF) 22,654. W skład cyklu wchodzą prace: **1)** Pastuszak-Lewandoska D, Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Nawrot E, Domańska D, Kiszałkiewicz J, Kordiak J, Antczak A, Górski P, Brzeziańska-Lasota E. Decreased FAM107A Expression in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. Adv Exp Med Biol. 2015; **2)** Pastuszak-Lewandoska D, Kordiak J, Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Nawrot E, Domańska-Senderowska D, Kiszałkiewicz JM, Antczak A, Górski P, Brzeziańska-Lasota E. Expression analysis of 3 miRNAs, miR-26a, miR-29b and miR-519d, in relation to MMP-2 expression level in non-small cell lung cancer patients - a pilot study. Med Oncol. 2016; **3)** Pastuszak-Lewandoska D, Kordiak J, Migdalska-Sęk M, Czarnecka KH, Antczak A, Górski P, Nawrot E, Kiszałkiewicz JM, Domańska D, Brzeziańska-Lasota E. Quantitative analysis of mRNA expression levels and DNA methylation profiles of three neighboring genes: FUS1, NPRL2/G21 and RASSF1A in non-small cell lung cancer patients. Respir Res. 2015; **4)** Pastuszak-Lewandoska D, Kordiak J, Antczak A, Migdalska-Sęk M, Czarnecka KH, Górski P, Nawrot E, Kiszałkiewicz JM, Domańska-Senderowska D, Brzeziańska-Lasota E. Expression level and methylation status of three tumor suppressor genes, DLEC1, ITGA9 and MLH1, in non-small cell lung cancer. Med Oncol. 2016; **5)** Antczak A, Pastuszak-Lewandoska D, Górski P,

Domańska D, Migdalska-Sęk M, Czarnecka K, Nawrot N, Kordiak J, Brzeziańska E. CTLA-4 Expression and Polymorphisms in Lung Tissue of Patients with Diagnosed Non-Small-Cell Lung Cancer. Biomed Res Int. (Journal of Biomedicine and Biotechnology) 2013; **6)** Dutkowska A, Antczak A, Pastuszak-Lewandoska D, Migdalska-Sęk M, Czarnecka KH, Górski P, Kordiak J, Nawrot E, Brzeziańska-Lasota E. RARβ Promoter Methylation as an Epigenetic Mechanism of Gene Silencing in Non-small Cell Lung Cancer. Adv Exp Med Biol. 2016; **7)** Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Domańska D, Pastuszak-Lewandoska D, Dutkowska A, Kordiak J, Nawrot E, Kiszałkiewicz J, Antczak A, Górski P, Brzeziańska-Lasota E. FHIT promoter methylation status, low protein and high mRNA levels in patients with non-small cell lung cancer. Int J Oncol. 2016; **8)** Antczak A, Migdalska-Sęk M, Czarnecka K, Pastuszak-Lewandoska D, Nawrot E, Domańska D, Kordiak J, Górski P, Brzezianska E. Significant frequency of allelic imbalance in 3p region covering RARβ and MLH1 loci in non-small lung cancer. Med Oncol. 2013; **9)** Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Antczak A, Pastuszak-Lewandoska D, Kordiak J, Nawrot E, Domańska D, Kaleta D, Górski P, Brzeziańska EB. Allelic imbalance in 1p, 7q, 9p, 11p, 12q and 16q regions in non-small cell lung carcinoma and its clinical association: a pilot study. Mol Biol Rep. 2013;.

Z przedstawionych oświadczeń współautorów, określających indywidualny wkład w powstanie publikacji wynika, że wkład Kandydatki był znaczący.

Rak niedrobnokomórkowy płuca (NSCLC) jest najczęstszą postacią raka płuca. W tej grupie rozróżnia się trzy podtypy: rak płaskonabłonkowy (SCC), rak gruczołowy (AC) i rak wielkokomórkowy (LCC). Ograniczona skuteczność diagnostyki i leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca jest głównie spowodowana trudnością w odróżnianiu podtypów i ograniczoną wiedzą na temat mechanizmów patogenezy podtypów NSCLC. Różnice pomiędzy rakiem gruczołowym (AC) i rakiem płaskonabłonkowym (SCC) mogą być odzwierciedlone na poziomie komórkowym i molekularnym. Tradycyjne metody polegają na wizualnej ocenie morfologii komórek (wielkość guza i cechy histologiczne), jednak różnice morfologiczne pomiędzy podtypami NSCLC nie są jasne. Znaczenie dokładnego różnicowania podtypów NSCLC wiąże się z wyborem odpowiedniej i skutecznej metody leczenia. Dynamiczny rozwój nauk genetycznych daje nadzieję, że osiągnięcia biologii molekularnej i analiza danych na poziomie molekularnym (mRNA, mikroRNA,

metylacja DNA) przyniesie przełom w diagnostyce raka płuca, umożliwi modyfikację klasyfikacji oraz zaoferuje nowe możliwości w terapii tego nowotworu.

Na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się dynamiczny rozwój badań w kierunku opracowania informatywnych, molekularnych markerów diagnostycznych w różnych typach nowotworów. Dostępne, nowoczesne techniki biologii molekularnej umożliwiają efektywne i wiarygodne badania zmian genetycznych i epigenetycznych w tkance nowotworowej płuca, jak również w surowicy i osoczu krwi, plwocinie, popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych. Wśród zmian molekularnych w NSCLC do najczęstszych należą: mutacje onkogenów (np. EGFR, KRAS, MYC, TP53), niestabilność genetyczna (np. LOH w 3p), modyfikacje ekspresji genów supresorowych, onkogenów czy genów naprawy DNA wynikające z hipermetylacji ich regionów promotorowych (np. RASSF1A, APC, DAPK, p16INK4A, hMLH1, ERCC1) czy aktywności miRNA (np. miR-25, miR-100, miR-223, miR-449a).

Molekularne techniki analizy ekspresji genów na poziomie transkrypcji, takie jak RT-PCR, qPCR, mikromacierze oligonukleotydowe, sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, next-generation sequencing) umożliwiają jednoczesną analizę poziomu mRNA dla setek, a nawet tysięcy genów. Wyniki tych badań mogą umożliwić modyfikację klasyfikacji histologicznej i zaawansowania rozwoju raka płuca o kryteria molekularne. Dane z ostatnich lat wskazują, że miRNA spełniają wymagania „idealnych biomarkerów" ze względu, m.in., na swoją znaczną stabilność, dużo większą niż mRNA, obecność w płynach ustrojowych, co stwarza możliwość ich badania nie tylko w tkance, ale i w osoczu, surowicy czy plwocinie oraz swoistość nowotworową, a więc możliwość diagnostyki guzów na podstawie profili ekspresji miRNA. W raku płuca poszukiwanie miRNA o potencjalnej roli biomarkerów pozwoliło zidentyfikować różne miRNA, których ekspresja jest zwiększona lub zmniejszona u pacjentów z NSCLC w stosunku do zdrowych kontroli. Niektóre z nich stanowią potencjalne biomarkery diagnostyczne NSCLC, służące do identyfikacji nowotworu we wczesnym stadium lub różnicowania podtypów histologicznych. Celem przeprowadzonych badań, prezentowanych przez Kandydatkę jako osiągnięcie naukowe, było poszukiwanie markerów molekularnych wspomagających wczesną diagnostykę NSCLC i/lub markerów o znaczeniu prognostycznym, skorelowanych z rozwojem guza i/lub ryzykiem przerzutowania. Z tego powodu **wybór tematu uważam za bardzo aktualny, trafny i wpisujący się w światowy nurt badań nad**

**diagnostyką chorób nowotworowych**.

Wyniki przeprowadzonych badań poszerzyły wiedzę na temat molekularnego podłoża niedrobnokomórkowego raka płuca, łącząc analizę poziomu ekspresji genów supresorowych z określeniem stopnia metylacji regionów promotorowych badanych genów. Wybrane geny – z wyjątkiem RASSF1A – jak dotąd nie były analizowane u polskich pacjentów ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Przeprowadzona analiza pozwoliła wyłonić geny: (1) pełniące ważną rolę w rozwoju NSCLC, zwłaszcza na wczesnym etapie karcynogenezy, (2) geny o oznaczeniu diagnostycznym i różnicującym podtypy NSCLC, (3) geny mogące służyć jako markery epigenetyczne. Badania tego typu, kontynuowane w przyszłości mogą się przyczynić do opracowania panelu markerów użytecznych klinicznie, wspomóc diagnostykę raka płuca lub stanowić podstawę do opracowania nowych metod terapeutycznych opartych na mechanizmach epigenetycznych (przeciwnowotworowe leki epigenetyczne).

Badania podjęto po uzyskaniu zgody wydanej przez Komisję Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN/140/10/KE i RNN/64/11/KE. Materiałem do badań były fragmenty tkanki płuca (fragment tkanki z ogniska pierwotnej zmiany i fragment tkanki niezmienionej makroskopowo) pobrane podczas zabiegu pulmonektomii/lobektomii od pacjentów ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca, operowanych w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej, Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej, Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2011-2013. Zastosowane metody badawcze, po wyizolowaniu RNA i/lub DNA z materiału biologicznego, to: qPCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, PCR w czasie rzeczywistym) z wykorzystaniem sond TaqMan; MS-PCR (metylospecyficzny PCR) z zastosowaniem specjalnie zaprojektowanych starterów dla sekwencji zmetylowanych i niezmetylowanych w obrębie promotora badanych genów; analiza LOH/MSI z użyciem markerów mikrosatelitarnych zaprojektowanych w oparciu o bazę danych NCBI i in.; analiza polimorfizmów genowych (SNP, single nucleotide polymorphism) z wykorzystaniem sond TaqMan; analiza poziomu immunoekspresji białek metodą ELISA.

Wśród prezentowanych jako osiągnięcie naukowe publikacji pięć z nich (nr 1, 3, 4, 6,

7) łączy analizę względnej ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA (metoda qPCR) oraz analizę metylacji promotorowej badanych genów (metylospecyficzny PCR) jako możliwego mechanizmu wyciszenia ekspresji genów supresorowych w przebiegu karcynognezy w tkance płuca. W kolejnych dwóch pracach (publikacje nr 8 i 9) przedstawianych jako osiągnięcie, analizowanym mechanizmem molekularnym uczestniczącym w procesie karcynogenezy i prowadzącym do utraty ekspresji genów supresorowych była niestabilność genetyczna typu LOH/MSI (utrata heterozygotyczności/niestabilność mikrosatelitarna). Łącznie analizie poddano 20 markerów mikrosatelitarnych z 7 różnych chromosomów. Pod względem praktycznym, informacje związane z mechanizmem utraty materiału genetycznego w komórce nowotworowej mogą stać się podstawą do opracowania markerów o wartości diagnostycznej i/lub predykcyjnej. Zastosowana przez Kandydatkę ocena częstości LOH/MSI na podstawie oszacowania indeksu FAL (*Fractional Allele Loss*) ma szczególne i nowatorskie znaczenie. Większość publikowanych badań ocenia zwykle LOH/MSI w pojedynczym *locus*. Indeks FAL odzwierciedla natomiast całkowity poziom niestabilności genetycznej w badanych *loci* dla analizowanego DNA i podkreśla rolę współwystępowania LOH/MSI w różnych regionach chromosomowych jako zaburzenia molekularnego indukującego niestabilność genetyczną w komórkach nowotworowych. Obliczanie wskaźnika FAL jest cenne z punktu widzenia oceny korelacji pomiędzy obecnymi w komórkach nowotworowych zmianami genetycznymi typu LOH/MSI a histopatologiczną charakterystyką danego nowotworu. Kolejna praca (nr 2) prezentowana jako osiągnięcie naukowe dotyczy kolejnego mechanizmu epigenetycznego związanego z regulacją ekspresji genów. Analizie poddano poziom ekspresji trzech miRNA: miR-26a, miR-29b i miR-519d oraz docelowego dla nich genu, kodującego metaloproteinazę macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (MMP-2), który ze względu na swoją rolę w procesie karcynogenezy (wzrost i migracja komórek nowotworowych, inwazja i przerzutowanie) uważany jest za jeden z najważniejszych potencjalnych celów w terapii przeciwnowotworowej. Celem kolejnej pracy (nr 5) prezentowanej jako osiągnięcie naukowe była analiza częstości występowania u chorych ze zdiagnozowanym NSCLC polimorfizmów sekwencji DNA w genie *CTLA-4*, którego aktywność wiąże się z osłabieniem odpowiedzi przeciwnowotworowej organizmu, sprzyjając wzrostowi i progresji guza. Badanymi polimorfizmami genu *CTLA-4* były: +49 A/G i -318 C/T, analizowane przy użyciu sond TaqMan (odpowiednio: rs231775 i

rs5742909); badanym materiałem biologicznym była krew obwodowa i zmieniona nowotworowo tkanka płuca. Nowatorskim podejściem przedstawianej pracy była analiza częstości występowania polimorfizmów genu *CTLA-4* w tkance nowotworowej płuca i porównanie jej z częstością występowania w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej u tych samych pacjentów oraz analiza poziomu ekspresji genu *CTLA-4* w tkance płuca. W większości badań polimorfizm *CTLA-4* analizowany jest w limfocytach i niewiele jest prac dotyczących związku pomiędzy ekspresją CTLA-4 (zwłaszcza na poziomie mRNA) i jego wariantami polimorficznymi w tkance nowotworowej.

Za najważniejsze z przedstawionego osiągnięcia naukowego Kandydatki należy uznać:

1) Udokumentowanie znaczenia badanych genów supresorowych , a zwłaszcza *DLEC1*, *ITGA9* i *RASSF1A* (z regionu 3p21.3) oraz *FAM107A* (3p21.1), w rozwoju niedrobnokomórkowego raka płuca. Zaobserwowana dodatnia korelacja pomiędzy genami *ITGA9* (*locus* w AP20) i *RASSF1A* (*locus* w LUCA) podkreśla rolę genów z różnych subregionów chromosomu 3p. Dodatkowo, znaczenie genów *DLEC1*, *ITGA9*, *RASSF1A* i *FAM107A* zostało wzmocnione przez fakt zaobserwowania statystycznie istotnych różnic w poziomie ekspresji tych genów w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki niezmienionej makroskopowo, otaczającej zmianę pierwotną, co może sugerować potencjalne znaczenie diagnostyczne wymienionych genów w rozpoznawaniu raka płuca *in situ*.

2) Możliwość uznania roli badanych genów w różnicowaniu podtypów histopatologicznych NSCLC, co może wspomóc diagnostykę różnicową niedrobnokomórkowego raka płuca. Geny: *ITGA9*, *RASSF1A, FUS1, FHIT*, *MLH1* i *RARβ* można uznać za markery różnicujące podtypy SCC i NSCC, a gen *NPRL2/G21* może być uznany za marker różnicujący podtypy SCC i AC. Wszystkie wymienione geny, prócz genu *RARβ*, wykazały istotnie niższy poziom ekspresji w podtypie SCC.

3) Potwierdzenie udziału – na podstawie wysokiego poziomu hipermetylacji regionów promotorowych genów *RASSF1A*, *RARβ*, *ITGA9*, *MLH1*, *DLEC1* i *FUS1* – epigenetycznego mechanizmu regulującego poziom ich ekspresji, zwłaszcza w

przypadku genów *DLEC1*, *ITGA9* i *RASSF1A*, które były najsilniej wyciszone. Natomiast w przypadku genu *FHIT* metylacja promotorowa nie wydaje się być wystarczającym mechanizmem, który prowadzi do wyciszenia ekspresji genu, a niski poziom białka FHIT – przy wysokim poziomie mRNA genu – może sugerować udział innych, potranslacyjnych mechanizmów epigenetycznych, takich jak aktywność miRNA czy modyfikacje histonów. Podobnie, niski poziom metylacji promotorowej w przypadku genów: *FAM107A*, *NPRL2/G21* i *RARβ* wskazuje na udział innego niż epigenetyczny mechanizmu regulującego poziom ich ekspresji.

4) Możliwość uznania genów *DLEC1*, *ITGA9* i *MLH1* jako genów kandydujących do panelu markerów epigenetycznych- może to sugerować ich znaczenie w przyszłości jako genów docelowych dla leków epigenetycznych.

5) Potwierdzenie wysokiego poziomu ekspresji (na poziomie mRNA) metylotransferaz DNA jako enzymów uczestniczących w procesie metylacji i stwierdzenie możliwości ich znaczenia jako epigenetycznych markerów o znaczeniu diagnostycznym.

6) Możliwość uznania genu FHIT jako markera prognostycznego w NSCLC.

7) Potwierdzenie znaczenia zaburzonej funkcji genów: *RASSF1A*, *DLEC1*, *RARβ* i *FUS1* w początkowych stadiach rozwoju niedrobnokomórkowego raka płuca.

8) Udokumentowanie znaczenia zmian genetycznych typu LOH/MSI w 3p w rozwoju NSCLC, zwłaszcza podtypu SCC, gdzie na uwagę zasługuje rola niestabilności mikrosatelitarnej genu MLH1. Znaczący wzrost częstości LOH/MSI w loci genów: FHIT, MLH1 i RARβ podkreśla znaczenie badanych genów supresorowych i genetycznego mechanizmu ich wyciszenia.

9) Potwierdzenie roli utraty materiału genetycznego w *loci* genów *hMLH1* i *KCNQ1* na późnym etapie karcynogenezy – na podstawie korelacji pomiędzy LOH w *loci* genów a zaawansowanym stadium rozwoju guza (III A/B) – i możliwość prognostycznego wykorzystania markerów analizowanych w badaniu (D3S1611, D11S4088, D11S1318).

10) Potwierdzenie roli utraty materiału genetycznego w *loci* genów *FHIT* i *RARβ* w inicjacji NSCLC – na podstawie częstego występowania LOH w *loci* tych genów w

guzach sklasyfikowanych jako pT1 i I stadium rozwoju, odpowiednio.

11) Potwierdzenie roli – na podstawie zwiększonej częstości występowania LOH/MSI w *loci FHIT* i *MLH1* skorelowanej z paleniem papierosów – dymu papierosowego w indukcji zmian genetycznych związanych z rozwojem niedrobnokomórkowego raka płuca, zwłaszcza podtypu SCC.

12) Udokumentowanie użyteczności obliczania wskaźnika FAL, jako uniwersalnego markera korelującego z istotnym czynnikiem w rozwoju NSCLC, jakim jest palenie papierosów.

13) Potwierdzenie znaczenia miR-26a i miR-29b w rozwoju NSCLC i dołączenie do tej grupy miR-519d, który wcześniej nie był badany w raku płuca.

14) Możliwość uznania potencjalnego znaczenia diagnostycznego miR-29b i MMP-2, których poziom ekspresji różnicuje podtypy histologiczne NSCLC.

15) Potwierdzenie – na podstawie ujemnej korelacji – regulatorowego związku pomiędzy miR-26a i MMP-2.

16) Możliwość uznania – na podstawie korelacji pomiędzy ekspresją genu a wielkością guza – proapoptycznego wpływu CTLA-4 na komórki guza.

17) Potwierdzenie słabszego inhibującego wpływu – na podstawie korelacji z ryzykiem rozwoju NSCLC – genotypu +49GG na proliferację komórkową.

Łączna punktacja MNiSW cyklu dziewięciu publikacji obejmujących zagadnienie pt.: „Analiza mechanizmów genetycznych i epigenetycznych uczestniczących w etiopatogenezie niedrobnokomórkowego raka płuca" wynosi 220 punktów , a wskaźnik wpływu (IF) 22,654.

**Ocena dorobku naukowego**

Jak wynika z przekazanych mi dokumentów, dr Dorota Pastuszak-Lewandoska jest autorką i współautorką 39 prac pełnotekstowych, w tym 27 prac oryginalnych (dodatkowo jedna w druku), 10 prac poglądowych i jednego rozdziału w podręczniku krajowym. W sześciu pracach jest pierwszą autorką. Punktacja MNISW prac

Kandydatki w czasopismach, z wyłączeniem publikacji stanowiących oceniane osiągnięcie naukowe, wynosi 535, a wskaźnik wpływu IF wynosi 47,893. Łączna punktacja MNiSW prac oryginalnych Kandydatki wynosi 459 punktów, z czego 130 punktów przypada na prace pierwszoautorskie. Łączny wskaźnik wpływu (IF) prac oryginalnych Kandydatki wynosi 41,773; w tym za prace pierwszoautorskie IF wynosi 8,324: dodatkowo punktacja za prace przyjęte do druku wynosi 20 punktów MNiSW (IF 1,746), punktacja za publikacje w suplementach – 9 punktów MNiSW. Prace dr Doroty Pastuszak-Lewandoskiej były cytowane 207 razy (wg bazy Web of Science) a indeks Hirscha wynosi 7.

Kandydatka uczestniczyła w kilkudziesięciu konferencjach i sympozjach w Polsce i za granicą. Jest autorką i współautorką 68 doniesień zjazdowych.

Kandydatka brała udział w 21 projektach badawczych (w tym granty KBN, MNiSW oraz UMED). Dr Dorota Pastuszak-Lewandoska za swoją działalność naukową była kilkukrotnie nagradzana Przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi dla Nauczycieli Akademickich.

Prace oryginalne, których Kandydatka jest współautorką, zawierają między innymi wyniki analiz:

- zmian molekularnych w genie pendryny (SLC26A4) u chorych z zespołem Pendreda w populacji polskiej (w badanym genie pendryny zidentyfikowano dwie mutacje zmiany sensu – L236P i T416P – korelujące z występowaniem choroby);

- mutacji punktowych w genie dla tyreotropiny w przypadku wrodzonej niedoczynności tarczycy (w pracy doświadczalnej wykryto nową nonsensowną mutację punktową typu transwersji (Y444X) w genie tyreotropiny, korelującą z występowaniem wrodzonej niedoczynności tarczycy);

- wybranych czynników genetycznych związanych z powstawaniem raka brodawkowatego tarczycy w populacji polskiej (zakres prac doświadczalnych obejmował analizę występowania mutacji punktowych w onkogenie BRAF, występowanie rearanżacji chromosomowych RET/PTC i Trk, analizę zmian we wzorze ekspresji onkogenu MET oraz genu dla cykliny D1; na podstawie wyników analizy molekularnej proto-onkogenów RET i NTRK1 wykazano, że częstość

występowania rearanżacji RET/PTC1-3 w tkankach PTC w populacji polskiej wynosi 21%, podczas gdy rearanżacji onkogenu NTRK1 - 12% ; w przypadku najczęściej opisywanej w literaturze mutacji w genie BRAF – transwersji V600E, częstość jej występowania w tkankach PTC w populacji polskiej wyniosła 48%; zaobserwowano również wzrost ekspresji genów cykliny D1 i MET w PTC w porównaniu z tkanką niezmienioną; wyniki badań potwierdziły znaczenie analizowanych genów – w szczególności genów kodujących białka o aktywności kinazy – w powstawaniu i progresji raka brodawkowatego tarczycy);

- częstości występowania polimorfizmu sekwencji DNA w genie dla receptora ß3 adrenergicznego u dzieci z otyłością w populacji polskiej (w pracy doświadczalnej wykazano podobną częstość występowania wariantu Trp64Argβ3AR u dzieci z otyłością, jak w grupie kontrolnej, uzyskane wyniki sugerują, że występowanie wariantu Trp64Arg w genie receptora ß3AR nie wpływa na wartość indeksu BMI, nie predysponuje do występowania otyłości, jak również nie koreluje z występowaniem oporności na insulinę);

- ekspresji wybranych genów mających znaczenie w m.in. w procesach angiogenezy i włóknienia w przebiegu sarkoidozy płucnej, ocenę immunoekspresji białek kodowanych przez badane geny oraz analizę poziomu ekspresji wybranych klas mikroRNA (miRNA) regulujących ekspresję białek kodowanych przez badane geny - oceniane było znaczenie prognostyczne powyższych zmian molekularnych w przebiegu sarkoidozy płucnej i ich współzależności ze stadiami rozwoju choroby; publikacje obejmują zagadnienia zmiany poziomu ekspresji/immunoekspresji genów/białek szlaku sygnałowego TGF-β/SMAD (TGF-β, SMAD 2 i 3, SMAD 7 i osi HIF-1α/ING-4/VEGF (VEGF, HIF-1α, ING-4) oraz wybranych klas miRNA (let-7f, miR15b, miR-16, miR-20a, miR-27b, miRNA-128b, miR-130, miR-192, miR-221, miR-222) regulujących na drodze pośredniej lub/i bezpośredniej wyżej wymienione szlaki sygnałowe( dotychczas opublikowane prace opisują tylko znaczenie *TGF-β* w sarkoidozie, nie ma żadnych doniesień naukowych na temat poziomu ekspresji/immunoekspresji genów i białek SMAD, a tylko nieliczne opisują poziom ekspresji miRNA w przebiegu tej choroby).

Pozostała aktywność naukowa dr Doroty Pastuszak-Lewandoskiej pozwala uznać, jej dorobek naukowy stanowi istotny i oryginalny wkład w rozwój medycyny. W

moim przekonaniu aktywność naukowa Kandydatki spełnia wymogi ustawowe, pozwalając Jej ubiegać się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

**Działalność dydaktyczna, organizacyjna i popularyzatorska**

Kandydatka jest bardzo aktywna jako dydaktyk - w latach 1992-1995 w Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej INP WAM prowadziła zajęcia z biologii medycznej (parazytologia) i genetyki dla studentów Wydziału Wojskowo-Lekarskiego; w latach 2006-2008 w Klinice Endokrynologii i Chorób Metabolicznych UM prowadziła zajęcia dla studentów Wydziału Farmacji, kierunek Kosmetologia; od roku 2014 do chwili obecnej będąc na stanowisku adiunkta w Zakładzie Molekularnych Podstaw Medycyny prowadzi zajęcia z biofizyki i biochemii dla studentów I i II roku Wydziału Lekarskiego oraz zajęcia z fizjologii dla studentów anglojęzycznych. Kandydatka prowadzi zajęcia fakultatywne dla studentów I, III i IV roku Wydziału Lekarskiego oraz słuchaczy studium doktoranckiego; jest pomysłodawcą i autorką programu zajęć fakultatywnych dla studentów IV roku Wydziału Lekarskiego pt. „Nutriepigenomika, czyli jak odżywiać własne geny"; dla studentów I roku Wydziału Lekarskiego pt. „Miejsce leczenia żywieniowego we współczesnej medycynie" i „Aktywność fizyczna, genom a zdrowie", dla studentów III roku Wydziału Lekarskiego pt. „Biomateriały w praktyce lekarskiej". Kandydatka prowadzi także wykłady dla licealistów organizowane przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

Dr Dorota Pastuszak-Lewandoska w latach 2011-2013 sprawowała opiekę nad studenckim kołem naukowym Laboratorium Młodych Naukowców, obecnie jest opiekunem dwóch studenckich kół naukowych: SKN Genetyki i Medycyny Molekularnej oraz SKN Prototypowania 3D. Wyniki prac badawczych przeprowadzonych w ramach SKN były prezentowane i nagradzane na międzynarodowych konferencjach studenckich.

Kandydatka sprawowała opiekę nad dwoma pracami doświadczalnymi w ramach prac doktorskich (obrona prac doktorskich w 2015 i 2017 roku), obecnie jest opiekunem dwóch słuchaczy studium doktoranckiego.

Kandydatka jest recenzentem w czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym : *PLOS ONE, Autoimmunity, Immunological Investigations, Journal of Clinical Pathology, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, Endokrynologia Polska, BMC Cancer, Tumor Biology.*

Dr Dorota Pastuszak-Lewandoska jest członkiem Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego od 2003 roku, Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc od 2013 roku, European Respiratory Society (ERS) od 2015 roku, Polskiego Towarzystwa Genetycznego od 2016 roku, Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej od 2016 roku;

**Podsumowanie**

Analizując jakościowo i ilościowo dorobek Kandydatki stwierdzam, że dr n. med. w zakresie biologii medycznej Dorota Pastuszak-Lewandoska spełnia ustawowe warunki potrzebne do uzyskania stopnia doktora habilitowanego. Kandydatka poza znaczącym dorobkiem naukowym wykazuje się wyróżniającym dorobkiem dydaktycznym i organizacyjnym.

Na tej podstawie przekładam Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie dr n. med. w zakresie biologii medycznej Doroty Pastuszak-Lewandoskiej do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

dr hab. n. med. Dariusz Nejc