

Uniwersytet Rzeszowski
Al. Rejtana 16 C, 35-959 Rzeszów



Instytut Nauk Medycznych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik
Kierownik Zakładu Genetyki Ogólnej
Instytut Nauk Medycznych
Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej
Przyrodniczo–Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 02.05.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Izabeli Zawadzkiej pt.: „Polimorfizmy i ekspresja genów kodujących białka z rodziny ABC w raku płuca”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Izabeli Zawadzkiej pt.: „Polimorfizmy i ekspresja genów kodujących białka z rodziny ABC w raku płuca” została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. farm. Ewy Balcerczak w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Celem pracy doktorskiej była ocena związku polimorfizmu pojedynczego nukleotydu genu *ABCB1* w pozycji 3435 z ryzykiem rozwoju niedrobnokomórkowego raka płuca. Ponadto celem pracy była ocena roli ekspresji genu *ABCB1*, kodującego glikoproteinę-P w zwiększonej predyspozycji do rozwoju raka płuca oraz wpływu na przebieg choroby i zastosowane leczenie. W pracy dokonano również oceny związku pomiędzy genotypem *ABCB1* a ekspresją tego genu w odniesieniu do cech kliniczno-patologicznych i zastosowanej terapii. Grupę badaną stanowiło 49 pacjentów z rozpoznanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Ocenę polimorfizmu genu *ABCB1* w pozycji 3435 przeprowadzono z wykorzystaniem metody PCR–RFLP u chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca oraz w grupie kontrolnej (96 osób) bez choroby nowotworowej. Ocenę ekspresji genu *ABCB1* przeprowadzono z wykorzystaniem metody Real-Time PCR u chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca w tkance nowotworowej pobranej śródoperacyjnie oraz próbkach krwi pobranej w trzech punktach czasowych: w

momencie diagnozy, 100 dni po zabiegu operacyjnym i 1 rok po interwencji chirurgicznej. Ocenę ekspresji genu *ABCB1* przeprowadzono również w próbkach krwi pobranej od 56 osób z grupy kontrolnej. Tak kompleksowe badania nie były do tej pory przeprowadzane w populacji polskich chorych. Temat podjęty w pracy doktorskiej jest ogromnie istotny dla określenia klinicznego znaczenia polimorfizmu i ekspresji genu *ABCB1* u chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, co może w przyszłości pozwolić na poprawę opieki nad pacjentem onkologicznym.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu liczącego 151 stron. Praca ma typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na rozdziały: wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie (w języku polskim i angielskim), spis rycin i tabel oraz piśmiennictwo. Praca zawiera wykaz skrótów, 52 ryciny oraz 34 tabele. Piśmiennictwo obejmuje 159 pozycji literaturowych pochodzących głównie z ostatnich kilku lat z dominacją literatury anglojęzycznej. Dodatkowo do pracy dołączono wykaz publikacji i doniesień zjazdowych Doktorantki. Dorobek publikacyjny Doktorantki stanowi 7 prac opublikowanych w latach 2019-2021 (w tym jedna publikacja obejmuje wstępne badania zawarte w pracy doktorskiej) i 5 komunikatów zjazdowych zaprezentowanych w latach 2018-2019. Sumaryczny współczynnik oddziaływania dorobku publikacyjnego Doktorantki wynosi 26,6 i należy go uznać za imponujący biorąc pod uwagę wczesny etap kariery naukowej Doktorantki.

Rozprawa doktorska napisana jest w zwięzłym i syntetycznym stylu. Wstęp pracy stanowi dokładną analizę aktualnego stanu wiedzy na temat podjętego problemu badawczego uzasadniając celowość prowadzonych badań. We wstępie przedstawiono szczegółowy opis dotyczący epidemiologii, czynników ryzyka oraz objawów, diagnostyki i terapii raka płuca. We wstępie przedstawiono także szczegółowy opis dotyczący nadrodziny białek transportujących ABC, budowy glikoproteiny-P, roli glikoproteiny-P w procesach fizjologicznych i patologicznych, lokalizacji i budowy genu *ABCB1*, wpływu polimorfizmu genu *ABCB1* na jego ekspresję oraz znaczenia klinicznego badanego polimorfizmu.

Cele pracy zostały precyzyjnie przedstawione w trzech punktach i poprawność ich sformułowania nie budzi wątpliwości. W rozdziale „Materiał i Metody” opisano grupę badaną i kontrolną, sposób izolacji materiału genetycznego, metodę genotypowania, metodę analizy ekspresji genu *ABCB1* oraz metody analiz statystycznych. Wszystkie etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane w kontekście spełnienia założonych celów pracy doktorskiej. Grupę badaną stanowiło 49 pacjentów (10 kobiet i 39 mężczyzn) z rozpoznaniem niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Średnia wieku pacjentów w momencie rozpoznania nowotworu wynosiła 67,1 lat. Grupa badana została dobrze scharakteryzowana pod względem kliniczno-patologicznym. Grupę kontrolną stanowili dawcy krwi bez choroby nowotworowej od których pobrano próbki krwi do celów analizy porównawczej częstości występowania poszczególnych genotypów *ABCB1* (96 próbek krwi) i do analizy ekspresji genu *ABCB1* (56 próbek krwi). W tym miejscu należy wskazać, że w pracy nie przedstawiono charakterystyki grupy kontrolnej. W pracy nie wyjaśniono na podstawie jakich kryteriów dokonano doboru grupy kontrolnej; nie podano chociażby informacji na temat płci i wieku grupy kontrolnej. Dopasowanie grupy kontrolnej pod względem płci i wieku do grupy badanej jest szczególnie ważne w porównaniu częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli w grupie kontrolnej i grupie badanej. Zastrzeżenie budzi również mała liczebność grupy badanej, co ma istotne znaczenie dla określania czy dany genotyp może zwiększać ryzyko rozwoju choroby nowotworowej. Podział pacjentów według cech patologiczno-klinicznych spowodował, że analizowane podgrupy były jeszcze mniej liczne, ale jednak na tyle duże, że możliwa była ocena statystyczna otrzymanych wyników. Pomimo małej liczebności grupy badanej należy podkreślić unikalność badań wykonanych w materiale tkankowym pobranym śródoperacyjnie i próbach krwi uzyskanych w trzech punktach czasowych.

Zastosowane w pracy metody badawcze zostały szczegółowo opisane. Skład mieszaniny reakcyjnej dla poszczególnych metod molekularnych oraz warunki prowadzenia reakcji zostały precyzyjnie przedstawione. Analizę polimorfizmu genu *ABCB1* w pozycji 3435 przeprowadzono z wykorzystaniem metody PCR–RFLP. W opisie tej metody wymieniono jaki enzym restrykcyjny został zastosowany, podano sekwencję rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny oraz podano długości

fragmentów restrykcyjnych dla poszczególnych genotypów, co ułatwia interpretację wyników. Analizę ekspresji genu *ABCB1* przeprowadzono z wykorzystaniem metody Real-Time PCR. Analizę ekspresji genu *ABCB1* u chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca przeprowadzono w tkance nowotworowej pobranej śródoperacyjnie oraz próbkach krwi pobranej w trzech punktach czasowych: w momencie diagnozy, 100 dni po zabiegu operacyjnym i 1 rok po interwencji chirurgicznej. Analizę ekspresji genu *ABCB1* przeprowadzono również w próbkach krwi pobranej od grupy kontrolnej bez choroby nowotworowej. Reakcję dla każdej z prób zarówno dla genu badanego *ABCB1* jak i genu referencyjnego *GAPDH* przeprowadzano w trzech powtórzeniach, a uzyskane wyniki uśredniono. W celu określenia poziomu ekspresji badanego genu zastosowano metodę podwójnej delty. W pracy przedstawiono również opis badania morfologii krwi obwodowej i poziomu fibrynogenu. W pracy doktorskiej zastosowano adekwatne dla rozwiązania problemów badawczych analizy statystyczne.

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w uporządkowany sposób, a właściwie dobrane tabele i wykresy ułatwiają analizę wyników. Do jednych z najważniejszych wyników należy wykazanie, że zmutowany genotyp TT i allel T występowały istotnie statystycznie częściej w grupie chorych na raka płuca niż w grupie kontrolnej. Genotyp TT był związany z 5,78 razy większym ryzykiem rozwoju raka płuca w porównaniu z genotypem CC. Na podstawie analizy prób krwi zaobserwowano, że poziom ekspresji mRNA *ABCB1* wzrastał w czasie w trakcie leczenia. W pracy wykazano istotną statystycznie różnicę w poziomach ekspresji genu *ABCB1* u pacjentów 100 dni po zabiegu chirurgicznym i 1 rok po operacji w stosunku do grupy kontrolnej. Poziom ekspresji genu *ABCB1* w grupie pacjentów o niższym stopniu zaawansowania nowotworu był ponad 40 razy niższy niż w grupie pacjentów o wyższym stopniu zaawansowania.

Dyskusja jest napisana w sposób rzeczowy i wnikliwy. Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały skonfrontowane z najnowszymi wynikami opublikowanych badań o podobnej tematyce. Dyskusja w pełni ukazuje bardzo dobre zorientowanie Doktorantki w aktualnej literaturze dotyczącej związku genu *ABCB1* z rozwojem raka płuca i jego klinicznym znaczeniem. Na podstawie uzyskanych wyników prawidłowo sformułowano wnioski końcowe wskazujące na ważną rolę genu *ABCB1* w rozwoju raka płuca.

Podsumowując, prezentowana praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autorki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego. Wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej, a uwagi przedstawione w recenzji nie umniejszają mojej wysokiej oceny tej pracy. Praca doktorska pt.: „Polimorfizmy i ekspresja genów kodujących białka z rodziny ABC w raku płuca” w pełni spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego wnoszę o dopuszczenie Pani magister Izabeli Zawadzkiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą prowadzonych badań, pragnę złożyć wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.



Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik

Dziękuję Wydział Lekarski UM w Łodzi

wpłynęło dnia 10.05.2022

podpis J. M. A. W.