



Prof. dr hab. Adrian Doroszko

Wrocław, 05.01.2024 r.

Klinika Kardiologii, Ośrodek Chorób Serca 4 WSKzP  
Katedra Nauk Klinicznych Niezabiegowych  
Wydział Medyczny Politechniki Wrocławskiej  
Ul. R. Weigla 5, 50-981 Wrocław  
Tel. +48 261 660 237  
Email: kardiologia.sekretariat@4wsk.pl

Wol  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE  
M. Podhorska Okołów  
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów

## Recenzja rozprawy doktorskiej

**Mgr NATALII JAMROZIK**

**pt. „Analiza białek szlaku COX-2/PGE<sub>2</sub> w raku jelita grubego”**

*powstałej w Zakładzie Biochemii Lekarskiej Katedry Biochemii i Immunochemii  
na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu*

Podstawę opracowania przeze mnie recenzji stanowi pismo otrzymane od Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z dnia 15 listopada 2023 r. i przekazana rozprawa doktorska w formie monografii, której promotorem jest prof. dr hab. Małgorzata Krzystek-Korpaczka, Kierownik Katedry Biochemii i Immunochemii na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

### 1. Ocena merytoryczna

#### a) trafność i oryginalność podjętej tematyki

Według szacunków WHO choroby nowotworowe odpowiadają za około 10.5 mln zgonów rocznie, co plasuje je na drugim miejscu zaraz po chorobach układu sercowo-naczyniowego (ok. 18.5 mln rocznie) wśród przyczyn szacowanych dla populacji światowej. Gruczolakorak jelita grubego jest drugim co do częstości występowania nowotworem złośliwym w Europie (po raku piersi) i zajmuje on również drugie miejsce (po raku płuca) – jako przyczyna śmierci z powodu nowotworu. Szacuje się również, że liczba nowych przypadków na całym świecie do 2030 r. wzrośnie do 2,2 miliona, a zgonów spowodowanych tym typem nowotworu do 1,1 miliona. Patrząc zatem z perspektywy trendów epidemiologicznych – mimo znacznego wzrostu wykrywalności

choroby we wczesnych stadiach dzięki programom badań przesiewowych - radykalna terapia i wieloletnie przeżycie bez wznowy nadal pozostają wyzwaniem. Stąd też podjęcie przez Doktorantkę badań nad znaczeniem szlaku biotransformacji eikozanoidów i wybranych inhibitorów cyklooksygenazy w patogenezie wzrostu i przerzutowania nowotworu stanowi wcióż aktualne zagadnienie, zaś przeprowadzone dotychczas obserwacyjne badania kliniczne w zakresie wpływu niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), w tym kwasu acetylosalicylowego (ASA) nie przyniosły rozstrzygających wyników. Tematyka pracy podjęta przez Doktorantkę wpisuje się w nurt aktualnie prowadzonych badań.

### **b) Ocena uzyskanych rezultatów oraz ich znaczenie dla nauki i praktyki**

Jako cele prowadzonych badań Doktorantka przyjęła ocenę zmian szlaku COX2/PGE2 związanych z występowaniem raka jelita grubego poprzez analizę transkryptomoczną, proteomiczną i metabolomiczną z założeniem, że zaobserwowane deregulacje mogą być wykorzystane jako potencjalne biomarkery nowotworu i/lub cele terapeutyczne z uwzględnieniem klasycznych oksykamów (piroksykanu i meloksykanu) oraz nowo zsyntetyzowanych pochodnych w mniejszym stopniu drażniących błonę śluzową górnego odcinka przewodu pokarmowego.

Cele pracy sformułowane są w sposób jasny i konsekwentnie realizowane są w części eksperymentalnej, stanowiącej adekwatną podstawę do sformułowania ostatecznych wniosków.

Na przeprowadzenie badań Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu (nr KB/1/2021).

W rozdziale *Materiał i Metody* Doktorantka w obszerny i wyczerpujący sposób opisuje materiał kliniczny i sposób jego zabezpieczenia oraz dokonuje charakterystyki badanych oksykamów. Następnie opisuje szczegółowo technikę wykonanych analiz transkryptomocnych, immunochemicznych (western blot) i badań z zakresu metabolomiki. Dobór zastosowanych testów statystycznych nie budzi zastrzeżeń w



odniesieniu do protokołu eksperymentalnego, liczebności grup i specyfiki zmiennych poddawanych analizie, a ich opis jest wystarczający.

Dokonując oceny ekspresji genów kodujących białka szlaku COX2/PGE2 w tkankach jelit (guz/margines resekcji) Doktorantka wykazała niższą ekspresję większości z nich w homogenacie tkanki guza, bez znamienego wpływu głębokości nacieku, występowania przerzutów w ww. chłonnych oraz przerzutów odległych wg charakterystyki klinicznej, jak również stopnia zaawansowania histologicznego procesu nowotworowego (G).

Następnie analizie poddane zostały stężenia trwałych metabolitów wybranych prostanoidów w próbkach krwi zabezpieczonych od pacjentów. Doktorantka wykazała występowanie istotnych różnic w zakresie stężeń kilku z nich w zależności od ryzyka zgonu w czasie operacji ocenionego w skali ASA oraz słabych, znamienych statystycznie korelacji z głębokością nacieku guza. Ponieważ w większości zaprezentowanych analiz różnice te dotyczą 6-keto -PGF-1 alfa, nasuwa się pytanie: Czy zdaniem Doktorantki mogą być one traktowane jako marker dezintegracji/uszkodzenia śródbłonka naczyniowego w guzie wskazującym na wyższe ryzyko powstawania przerzutów? Doktorantka wykazała też istnienie słabej korelacji głębokości nacieku guza ze stężeniem TxB2, który w osoczu pochodzi głównie z aktywowanych płytek krwi. Na kanwie tej obserwacji prosiłbym Doktorantkę o krótkie przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat roli płytek krwi w procesie przerzutowania nowotworów, w tym także raka jelita grubego.

W dalszej części wyników Doktorantka prezentuje analizę czułości i swoistości oznaczeń wybranych eikozanoidów w diagnostyce i ocenie zaawansowania procesu nowotworowego, wskazując dla wielu z nich wysokie wartości AUC w analizie ROC. Jak zdaniem Doktorantki wielochorobowość, często obecna u chorych z rakiem jelita grubego (populacja w wieku 60+), w tym w szczególności chorób zapalnych, układu sercowo-naczyniowego oraz na podłożu alergicznym (astma) może wpłynąć na ich wartość diagnostyczną? Czy oceniając ich stężenia zależnie od zaawansowania procesu nowotworowego współwystępowanie tych schorzeń było brane uwagę?

W kolejnym podrozdziale wyników Doktorantka prezentuje wpływ wybranych oksykamów na ekspresję białej szlaku COX2/PGE2 w komórkach raka jelita grubego – linii HCT116, Caco-2 i HT-29 w analizach western blot z ilościową oceną stężeń skorygowanych na aktywność jako *loading control*. Jest to w opinii recenzenta bardzo wartościowa część wyników. Czy obserwowane podobne kierunki zależności w ocenie wpływu poszczególnych oksykamów na ekspresję badanych białek uzyskujące istotność statystyczną tylko w przypadku niektórych mogą wynikać w opinii Doktorantki z różnych wartości N próbek w poszczególnych eksperymentach i po ich zwiększeniu wykazałyby podobne wyniki wskazując na „efekt klasy” dla oksykamów? Czy różnice te mogą wynikać jednak z odrębności farmakodynamicznych poszczególnych przedstawicieli klasy?

Obszerna dyskusja wyników świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta i o krytycznym podejściu do uzyskanych wyników, stanowiąc tym samym niewątpliwy atut rozprawy.

W oparciu o przeprowadzone badania Doktorantka wyciąga następujące wnioski:

1. W raku jelita grubego dochodzi do deregulacji szlaku COX2/PGE2 na poziomie lokalnym i ogólnoustrojowym, w powiązaniu z cechami histopatologicznymi RJG oraz w sposób odzwierciedlający dobrostan pacjenta.
2. PGE2 jest doskonałym markerem RJG, lecz umiarkowaną obecnością przerzutów w węzłach chłonnych. Pozostałe eikozanoidy cechuje dobra–bardzo dobra moc diagnostyczna w różnicowaniu pacjentów z RJG i osób zdrowych, lecz umiarkowana w różnicowaniu stopnia zaawansowania histologicznego.
3. Oksykamy modulują szlak COX2/PGE2 na poziomie transkryptomu i proteomu, przy czym wpływ nowo zsyntetyzowanych pochodnych oksykamów jest silniejszy i bardziej powtarzalny niż leków wykorzystywanych w praktyce klinicznej – piroksykamu i meloksykamu, a najbardziej obiecującym związkiem jest pochodna charakteryzująca się propylenowym linkerem łączącym arylopiperyzynowy farmakofor z azotem pierścienia tiazynowego oraz pojedynczym podstawnikiem fluorowym umiejscowionym w reszcie arylopiiperazynowej.



Warto zauważyć, że wnioski podparte są tezami wyodrębnionymi z wyników, podkreślając ich zasadność i właściwe wyważenie.

### **c) Poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna**

Doktorantka posługuje się poprawnym słownictwem charakterystycznym dla prac naukowych. Praca doktorska napisana jest poprawnie pod względem formalno-językowym i stylistycznym. Wprawdzie Doktorantka nie ustrzegła się przed drobnymi błędami literowymi, typograficznymi, interpunkcyjnymi, o których wspominam jedynie z obowiązku recenzenta, jednak są to drobne potknięcia, nie wpływające na merytoryczną ocenę pracy.

## **2. Ocena metodologiczna**

### **a) Dobór piśmiennictwa**

Piśmiennictwo jest aktualne, ściśle związane z tematyką pracy oraz umiejętnie zacytowane. Wskazuje tym samym na dużą znajomość literatury przedmiotu przez Doktoranta.

### **b) Poprawność formułowania problemu badawczego, definiowania hipotez i celów pracy**

Cele i hipotezy badawcze zostały sformułowane poprawnie, zaś wnioski odpowiadają postawionym celom pracy, znajdując podparcie w zaprezentowanych wynikach.

### **c) Trafność doboru narzędzi badawczych i umiejętność ich zastosowania**

Opis metodyki prac zawiera wystarczające informacje niezbędne celem zapoznania się ze sposobem przeprowadzania badania. Doktorantka poprawnie zastosowała techniki laboratoryjne na potrzeby badań z zakresu transkryptomiki, immunochemii i metabolomiki, gwarantując rzetelność i powtarzalność uzyskanych wyników.

#### **d) Poprawność układu pracy i struktury podziału treści**

Układ pracy i struktura podziału treści pracy odpowiada standardom prac doktorskich mających formę monografii prezentującej oryginalne wyniki pracy własnej. Rozprawa liczy 133 strony, składa się ze: spisu treści, wykazu skrótów, wstępu, części zawierającej szczegółowy opis metodyki badań, opisu uzyskanych wyników wraz dyskusją i wnioskami końcowymi, a następnie streszczeń w języku polskim i angielskim wykazu tabel, wykresów i rycin, bibliografii oraz skanu dokumentu zgody komisji bioetycznej.

#### **WNIOSEK KOŃCOWY**

Przystępując do oceny całości pracy stwierdzam, praca doktorska mgr Natalii Jamrozik stanowi oryginalny dorobek naukowy oraz porusza ważne i aktualne problemy, patrząc z perspektywy epidemiologii i praktyki klinicznej. Doktorantka wykazała się gruntowną znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki pracy. W sposób umiejętny zaplanowała część oryginalną swoich badań, poprawnie formułując ich cele oraz dokumentując wyniki. Przedstawiona dyskusja dowodzi umiejętności ich krytycznej interpretacji oraz zdolności samodzielnego wyciągania racjonalnych wniosków z przeprowadzonego projektu badawczego. Rozprawa posiada walory praktyczne, wnosząc nowe i zarazem cenne informacje na temat roli reakcji zapalnej związanej z ekspresją szlaku COX-2/PGE<sub>2</sub> w patogenezie wzrostu i rozsiewu raka jelita grubego, przydatności oceny stężeń we krwi wybranych intermediiów tego szlaku w diagnostyce i ocenie zaawansowania choroby. Zaprezentowane wyniki mogą mieć potencjalne implikacje w praktyce klinicznej, a z pewnością stanowią inspirację i cenny fundament do kontynuacji badań w tym kierunku.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Natalii Jamrozik spełnia warunki określone w art.187 ust.1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. DZ. U. 2018 poz. 1668), w związku z czym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we

Wrocławiu o przyjęcie pracy autorstwa mgr Natalii Jamrozik zatytułowanej „Analiza białek szlaku COX-2/PGE<sub>2</sub> w raku jelita grubego” jako rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu, zgodnie ze stosownymi przepisami i procedurami.

*Adrian Doroszko*

Adrian Doroszko

*prof. dr hab. Adrian Doroszko  
specjalista chorób wewnętrznych  
kardiolog  
2006310*