



Łódź, 18 czerwca 2025 r.

Recenzja w postępowaniu habilitacyjnym Dr n. med. Łukasza Szafrona

I. Dane biograficzne i osiągnięcia zawodowe

Habilitant jest zawodowo związany z Narodowym Instytutem Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytucie Badawczym od 2006 roku. W 2005 roku ukończył studia magisterskie na Uniwersytecie Warszawskim, uzyskując stopień magistra. W 2011 roku Habilitant uzyskał także tytuł diagnosty laboratoryjnego po ukończeniu studiów podyplomowych w Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy przy Uniwersytecie im. M. Kopernika w Toruniu. Następnie w czerwcu 2013 uzyskał stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie: biologia medyczna, nadany przez Radę Naukową Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego. W listopadzie 2016 roku uzyskał specjalizację w dziedzinie laboratoryjnej genetyki medycznej, a w 2018 roku dyplom europejski genetyka laboratoryjnego.

II. Ocena osiągnięcia naukowego

Przedstawionym do oceny osiągnięciem naukowym jest cykl 6 publikacji oryginalnych, odnoszących się do poszukiwania nowych molekularnych biomarkerów prognostycznych i predykcyjnych u chorych na guzy jajnika o różnym stopniu złośliwości

Artykuły zostały opublikowane w latach 2015-2024 w recenzowanych czasopismach naukowych o współczynniku oddziaływania (IF) mieszczącym się w zakresie 3,057 – 5,168. Łączny IF wynosi 26,323, a liczba punktów KBN/MNiSW wynosi 430. Dr Łukasz Szafron jest

pierwszym autorem 2 publikacji, równorzędnym pierwszym autorem 2 publikacji i ostatnim autorem 2 publikacji w cyklu.

Nowotwory złośliwe jajnika stanowią istotny problem w onkologii, ze względu na liczbę zachorowań w ostatnich latach, a także ze względu na istotną umieralność w jego przebiegu, pomimo wprowadzenia do terapii nowoczesnych metod leczenia systemowego (w tym leczenia ukierunkowanego molekularnie). Zachorowania na raka jajnika stanowią istotną przyczynę zachorowań i najczęstszą przyczynę zgonów spośród nowotworów ginekologicznych w Polsce. Od wielu lat onkologia zmierza ku personalizacji leczenia, ze szczególnym znaczeniem odrębności genetycznych czy molekularnych, których znajomość prowadzi do nowych strategii terapeutycznych. Stąd, wybór tematów poszczególnych prac ma głębokie uzasadnienie naukowe i aplikacyjne, bowiem poprawa rokowania w badanej grupie chorych jest ważną potrzebą w onkologii.

Pierwsza z prac w cyklu jest zatytułowana „Germinalne mutacje *SMARCA4* u chorych na drobnokomórkowego raka jajnika typu hyperkalcemicznego”. Nowotwór ten występuje rzadko, dotyka młode kobiety, a jego przebieg kliniczny jest często agresywny. Grupa badaczy, wśród których Habilitant był drugim, równorzędnym autorem, przeprowadziła analizę molekularną genu *SMARCA4* u ośmiu chorych na drobnokomórkowego raka jajnika typu hyperkalcemicznego. Stwierdzono występowanie mutacji u dwóch pacjentek i przeprowadzono analizę genetyczną rodzin, wykazując, że w jednym przypadku mutacja miała charakter germinalny i dziedziczny w obrębie rodziny. W pracy przedstawiono szczegółową analizę dziedziczenia rodzinach obydwu pacjentek, z zaznaczeniem braku zgody na badania genetyczne u części członków rodziny, co pokazuje niezwykle trudny aspekt prac badawczych nad mutacjami germinalnymi u zdrowych członków rodzin probantek. Wnioskiem z tej pracy jest konieczność diagnostyki molekularnej u chorych z badanym podtypem nowotworu jajnika, a w przypadku stwierdzenia mutacji *SMARCA4*, rozszerzenia diagnostyki zgodnie z zasadami rodzinnego poradnictwa genetycznego. Habilitant wykonywał analizy molekularne w tym badaniu i napisał szkic manuskryptu.

Druga z prac cyklu jest zatytułowana „Znaczenie polimorfizmu c.690G>T i ekspresja genu *CEBPA* dla przebiegu raka jajnika”. W uzasadnieniu do przeprowadzenia badania, grupa autorów przypomina, że gen *CEBPA* u chorych na nowotwory jest często zmutowany lub ma nieprawidłową ekspresję. Opublikowane wyniki były pierwszym badaniem oceniającym

znaczenie mutacji i zaburzeń ekspresji u chorych na raka jajnika. Sekwencje genu *CEBPA* oceniono u 44 chorych leczonych pochodną platyny z cyklofosfamidem (PC) i 74 chorych leczonych taksanem z pochodną platyny (zarówno w tkance nowotworowej jak i we krwi obwodowej), a także u 236 zdrowych kobiet. W badaniu stwierdzono, że u 25,4% chorych, w guzach występuje polimorfizm c.690G>T *CEBPA*, co korelowało ze zwiększonymi poziomami mRNA ($p=0.059$). Co więcej wykazano, że występowanie powyższego polimorfizmu koreluje z gorszym rokowaniem ($p=0.005$) i gorszą odpowiedzią na PC ($p=0.024$). Nie stwierdzono, aby występowanie opisanego polimorfizmu korelowało z ryzykiem zachorowania na raka jajnika. Badanie potwierdziło nie tylko związek polimorfizmu genu *CEBPA*, a także podwyższonej ekspresji mRNA z niekorzystnym przebiegiem rak jajnika, ale udowodniono także, że ta zależność ma miejsce u chorych leczonych PC, ale nie taksanem z pochodną platyny. Czyni to polimorfizm genu *CEBPA* nie tylko czynnikiem prognostycznym, ale potencjalnie predykcyjnym dla odpowiedzi na różne schematy chemioterapii. Habilitant był drugim równorzędnym autorem tej pracy i odpowiadał za koncepcję badania, jego metody, oprogramowanie, analizę formalną, wykonanie badań, wizualizację, pozyskanie funduszy i napisanie artykułu.

Trzecia praca w cyklu nosi tytuł „Nowy gen *CRNDE* koduje białko jądrowe (CRNDEP), które ulega nadekspresji w wysoce proliferujących tkankach”. Wcześniejsze dane wskazywały na to, że gen *CRNDE* ulega nadekspresji w nowotworach złośliwych. Badanie to skupiło się na hipotezie, że gen *CRNDE* koduje białko jądrowe CRNDEP. Za pomocą narzędzi bioinformatycznych, we wcześniej opublikowanych pracach, autorzy zidentyfikowali 84-aminokwasowe fragmenty, kodowane przez 2 transkrypty CRDNE. Za pomocą zaawansowanych metod molekularnych, doprowadzono m.in. do wytworzenia białka poliklonalnego służącego do dalszej diagnostyki w badaniu lokalizującym CRNDEP w komórkach. Stosując własne metody diagnostyczne, wykazano, że CRNDEP lokalizuje się głównie w jądrze komórkowym, a jego ekspresja jest zwiększona w tkankach o wysokiej proliferacji takich jak: nabłonek płaski, krypty jelitowe czy spermatocyty. Chociaż dokładna rola CRNDEP pozostawała nieznana, uzyskane wyniki sugerowały, że może być związana z proliferacją i metabolizmem tlenowym. Było to pierwsze doniesienie wykazujące istnienie białka kodowanego przez gen *CRNDE*. Habilitant był pierwszym autorem tej pracy i

odpowiadał za koncepcję i projekt oraz analizę eksperymentów, dostarczenie narzędzi przeprowadzenia badania i napisanie artykułu.

Czwarta praca w cyklu jest kontynuacją badań z publikacji trzeciej i nosi tytuł „Domniemany onkogen *CRNDE* jest negatywnym czynnikiem prognostycznym u pacjentek z rakiem jajnika”. W badaniu analizowano ekspresję transkryptów *CRNDE* z zastosowaniem profilowania opartego o Real-Time qPCR z zastosowaniem zaprojektowanych przez badaczy sond TaqMan. Przebadano 135 zamrożonych próbek raka jajnika pochodzących od pacjentek leczonych pochodnymi platyny, bądź z cyklofosfamidem (PC, n – 32), bądź z taksanami (TP, n – 103). Stwierdzono, że podwyższone poziomy dwóch różnych transkryptów *CRNDE* są negatywnym czynnikiem prognostycznym dla ryzyka zgonu i nawrotu u chorych leczonych TP, ale nie PC. Związek był silniejszy statystycznie dla krótkiego wariantu splicingowego *CRNDE* (kodującego *CRNDE*, FJ466686) - HR 6.072, 95% CI 1.814-20.32, p = 0.003 dla ryzyka zgonu i HR 15.53, 95% CI 3.812-63.28, p < 0.001 dla ryzyka nawrotu. Ponadto, zaobserwowano, że kumulacja białka TP53 wiąże się z obniżoną ekspresją obydwu transkryptów *CRNDE* w komórkach nowotworowych. Zatem, badacze wyciągnęli wniosek, że *CRNDE* jest negatywnym czynnikiem prognostycznym u chorych na raka jajnika, ale jedynie leczonych TP. W tej pracy, Habilitant był pierwszym autorem i odpowiadał za koncepcję, metodę, oprogramowanie, analizę formalną i realizację badań oraz napisanie manuskryptu.

Piąta z prac w cyklu dotyczy analizy transkryptów i mikropeptydów *CRNDE* jako istotnych elementów karcynogenezy w raku jajnika i stanowi spójną kontynuację wcześniej opublikowanych badań. Projekt zakładał walidację sekwencji *CRNDEP* z zastosowaniem spektrometrii masowej oraz ocenę wpływu stopnia ekspresji *CRNDE(P)* na metabolizm i chemiooporność w raku jajnika. Oceniono także lokalizację *CRNDEP* w komórce, a także partnerów białkowych i zdolności wiązania RNA. Uzyskane wyniki wsparły tezę, że *CRNDE* jest onkogenem i wpływa na karcynogenezę na etapie transkrypcji i replikacji DNA, co dotyczy metabolizmu RNA i stymuluje progresję cyklu komórkowego i proliferację. Wykazano, że *CRNDEP* jest zlokalizowane w jądrze i wykazuje interakcje z p54 (helikaza RNA). W badaniu udowodniono, że wysoka ekspresja *CRNDE(P)* koreluje z opornością komórek raka jajnika na cytostatyki działające na mikrotubule. Ponadto, w badaniach *in silico* wykazano, że *CRNDEP* może wiązać się z RNA. Praca dostarcza wielu danych pozwalających zrozumieć rolę

CRNDE(P) w biologii raka jajnika, co może mieć w przyszłości zastosowanie aplikacyjne w diagnostyce i leczeniu raka jajnika. Habilitant jest w tej pracy ostatnim autorem, co jasno wskazuje na rozwój naukowy i umiejętność koordynowania pracy zespołu, a także dzielenia się warsztatem naukowym z pokoleniem młodych badaczy. Habilitant odpowiadał za wszystkie etapy planowania i przeprowadzania tego badania, a także odegrał istotną rolę w pisaniu tej publikacji.

Szósta publikacja w cyklu stanowi spójną całość z pozostałymi pięcioma pracami i dotyczy oceny klinicznego znaczenia metylacji i polimorfizmów genu *CRNDE*, a także ekspresji mikrobiałka CRNDEP u chorych na raka jajnika. Badania te przeprowadzono na materiale tkankowym pochodzących o chorych, u których wystąpiły nowotwory jajnika o różnym stopniu agresywności klinicznej. W badaniu stwierdzono, że poziom białka CRNDEP jest wyższy u chorych z agresywnymi postaciami nowotworów jajnika w porównaniu do nowotworów łagodnych. Ponadto, wysoki poziom tego mikrobiałka stanowił niezależny negatywny czynnik prognostyczny i predykcyjny u chorych z rakiem jajnika o wysokim stopniu złośliwości. Co ciekawe, w guzach o granicznej złośliwości (tzw. *borderline*) wykazano, że polimorfizm rs115515584 genu *CRNDE* istotnie koreluje z ryzykiem nawrotu, czego nie potwierdzono w agresywnych rakach jajnika. Jedynie w grupie chorych na nowotwory jajnika o granicznej złośliwości stwierdzono wysoką nadekspresję tego wariantu wobec populacji zdrowej. Natomiast u chorych z agresywnymi rakami jajnika, zaobserwowano, że hipometylacja *CRNDE* koreluje z opornością na chemioterapię, ale jedynie w przypadku jednoczesowej akumulacji supresorowego białka TP53. Także w tej pracy, Habilitant jest ostatnim autorem i był odpowiedzialny za koncepcję i zaplanowanie badań, a także za ich przeprowadzenie, interpretację i przygotowanie manuskryptu. I w tym przypadku udowodnił umiejętność tworzenia i nadzorowania zespołów badawczych. Dzięki tej pracy, dostarczył kolejnych danych pozwalających ocenić rolę biologiczną CRNDE(P) u chorych na nowotwory jajnika.

Podsumowując, cykl prac w sposób spójny dotyczy biologii molekularnej, proteomiki i epigenetyki, i ich wpływu na leczenie chorych na raka jajnika. Moje uznanie budzi umiejętność Habilitanta do organizowania, planowania i realizowania przedsięwzięć naukowych w zespołach badawczych, a także konsekwentne, wieloletnie planowanie badań w

wąskim obszarze genu *CRNDE*, co pozwoliło na dogłębne i nowatorskie dostarczenie istotnych danych naukowych do światowego piśmiennictwa.

W konkluzji, Habilitant przedstawił 1 cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych, które w roku opublikowania artykułu w ostatecznej formie były ujęte w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. b, co spełnia wymagania ustawowe w postępowaniu habilitacyjnym.

III. Ocena „istotnej aktywności naukowej”

Zgodnie z analizą bibliograficzną przygotowaną przez Bibliotekę Naukową w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie, całkowity dorobek naukowy Habilitanta posiada łączną punktację Impact Factor IF 162,634 (z tego IF 4,486 uzyskanych przed doktoratem) oraz 2250 punktów MEiN (w tym 20 punktów MEiN przed doktoratem). Dorobek ten obejmuje 28 oryginalnych prac naukowych (w tym 2 jako pierwszy i 5 jako ostatni autor) o łącznym IF 150,809 oraz 2175 punktów MEiN, 3 prace poglądowe (w tym 1 jako ostatni autor) o łącznej punktacji 49 punktów MEiN, oraz 22 streszczeń/wystąpień zjazdowych: 6 ze zjazdów krajowych i 16 międzynarodowych. Dorobek pozwolił osiągnąć Indeks Hirscha - 15 (na podstawie Web of Science) z liczbą cytowań wynoszącą 952, w tym 34 autocytowania (na podstawie bazy Web of Science).

Działalność naukowa Dr Łukasza Szafrona charakteryzuje się spójnością i w znaczącej części jest poświęcona nowotworom jajnika. Zainteresowania Habilitanta są z roku na rok planowane i realizowane konsekwentnie, a prowadzone prace stanowią logiczną drogę naukową, w której klarownie widać rozwój naukowy Habilitanta i osiągnięcie przez Niego poziomu eksperta. Praca naukowa Dr Łukasza Szafrona nie ogranicza się jedynie do diagnostyki genetycznej, w której jest specjalistą, ale sięga także do wpływu biologii nowotworu na screening, diagnostykę i leczenie.

Opisując bardziej szczegółowo dorobek, praca z *Cancer, Biology & Therapy* z 2013 dotyczy oceny wartości prognostycznej ekspresji białka i p19(INK3d) mRNA u chorych na raka jajnika. Natomiast, przeprowadzona w wielośrodkowej współpracy międzynarodowej praca z 2014, opublikowana w *Human Genetics* ocenia na poziome genomu ryzyko genetyczne wystąpienia określonych podtypów nowotworów jajnika.

Kolejna praca międzynarodowa z 2015 roku z *Human Molecular Genetics* skupia się na poszukiwaniu uwarunkowań genetycznych współwystępowania raka jajnika i endometriozy, a praca z 2016 z *International Journal of Epidemiology*, która powstała w wyniku współpracy międzynarodowej ocenia związek ryzyka zachorowania na raka jajnika ze stężeniami witaminy D3. Badanie z 2016 opublikowane w *Human Genetics* jest globalnym projektem, w którym brał udział Habilitant i dotyczy architektury genetycznej poszczególnych podtypów raka jajnika.

Rok 2017 przyniósł m. in. doniesienia (1) na łamach *Gynecologic Oncology*, które dotyczyło oceny rokowania u pacjentek z rakiem jajnika, które są nosicielkami wariantów patogennych BRCA1 w zależności od akumulacji białka TP53, (2) na łamach *Nature Genetics* oceniające predyspozycje genetyczne zwiększające ryzyko zachorowania na raka jajnika w międzynarodowej grupie badawczej. Rok 2019 zaowocował następnymi publikacjami w dorobku Habilitanta, m.in. to (1) globalna praca z *Cancer Research* oceniająca dane od 63 000 kobiet w Europie celem wskazania ryzyka raka jajnika w zależności od metylacji DNA, (2) praca z *Cancer, Biology & Therapy* badająca istotność kliniczną ekspresji FANCD2, BRIP1, BRCA1, BRCA2 i FANCF u chorych na raka jajnika.

Kolejne lata przyniosły następne prace dotyczące nowotworów jajnika, w tym m.in. (1) praca z 2022 z *PLoS ONE*, oceniająca znaczenie prognostyczne i predykcyjne dla odpowiedzi na leczenie chorych z rakami jajnika o wysokim stopniu złośliwości genów *PROM1*, *CXCL8*, *RUNX1*, *NAV1* i *TP73*, (2) pracę z *Cancers*, dotyczącą zmienności metylacji DNA u chorych na raka jajnika o granicznej złośliwości i surowicze raki jajnika, (3) analizę polimorfizmów w 76 genach w kontekście powstawania guzów jajnika z uwzględnieniem stopnia agresywności przebiegu klinicznego.

Powyższe prace, jak również inne publikacje o bardziej zróżnicowanej tematyce (rak płuca, rak piersi, chłoniaki), świadczą o dużej aktywności i dojrzałości Doktora Łukasza Szafrona realizowanej w ramach zespołów badawczych ukierunkowanych na aspekty diagnostyczne, kliniczne i biologiczne nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów jajnika.

Wskazane osiągnięcia naukowe Doktora Łukasza Szafrona stanowią znaczący wkład w rozwój szeroko pojętej onkologii nowotworów jajnika.

Dr Łukasz Szafron jest promotorem 2 prac magisterskich i promotorem pomocniczym 2 kolejnych. Zwracają także uwagę zdolności organizacyjne, logistyczne, umiejętność tworzenia zespołów naukowych, w tym wielośrodkowych.

IV. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że osiągnięcie naukowe dr Łukasza Szafrona spełnia warunki określone w art. 219 ust.1 i 2 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2021 r. poz.478 z późn. zm.) do nadania stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. Zwracam się zatem do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Dr n. med. Łukasza Szafrona do dalszych etapów postępowania.

Łączę wyrazy szacunku

Prof. dr hab. n. med. Ewa Kalinka