



Ocena rozprawy doktorskiej lek. med. Anny Kuźmy-Richter

”Wpływ pochodnych fenotiazyny na komórki raka gruczołu sutkowego wrażliwych (MCF-7/WT) i opornych (MCF-7/DOX) na doksorubicynę”

Rak gruczołu sutkowego był schorzeniem znanym już XVII w p.n.e. Egipski medyczny papirus Ebersa opisuje osiem przypadków schorzeń guzów piersi u kobiet, w tym jednego u mężczyzny. Schorzenie to znane było na przestrzeni tysiącleci i traktowane jako choroba nieuleczalna. Dopiero na przełomie XX i XXI w. obserwować możemy znaczny postęp w leczeniu chorób onkologicznych, w tym raka gruczołu sutkowego. Współczesna onkologia należy do najszybciej rozwijających się dyscyplin medycyny. Pomimo istnienia szeregu terapii onkologicznych choroba ta nadal traktowana jest jako „dżuma” XXI wieku, budzi lęk i zagrożenie. Jednym z poważniejszych problemów w terapiach onkologicznych jest oporność komórek nowotworowych na cytostatyki. Szersze poznanie mechanizmów oporności wielolekowej komórek nowotworowych, znalezienie skutecznych sposobów znoszenia oporności na leki przeciwnowotworowe pozwoli na zastosowanie ukierunkowanych terapii antynowotworowych, co stanowi kluczowe wyzwanie dla współczesnej onkologii. Przedstawiona do recenzji praca doktorska lek. med. Anny Kuźmy-Richter dobrze mieści się w nurcie badawczym współczesnej onkologii. W swojej rozprawie doktorskiej Pani Anna Kuźma-Richter podjęła się niebagatelnego wyzwania zrozumienia mechanizmu oporności wielolekowej gruczolakoraka gruczołu sutkowego na doksorubicynę, leku o działaniu cytostatycznym, przy użyciu modulatorów transporterów związanych z opornością wielolekową tj. pochodnych fenotiazyny (promazyny i trifluopromazyny). W rozprawie doktorskiej Pani Anna Kuźma-Richter, szukając odpowiedzi na postawione w dysertacji pytania jaki wpływ posiadają pochodne fenotiazyny na komórki raka gruczołu sutkowego opornych i wrażliwych na doksorubicynę, skupiła swoją uwagę na białkach transportowych z nadrodziny ABC, pośród których glikoproteina P (Pgp) pełni kluczową rolę. W oparciu o dane literaturowe dotyczące wpływu fenotiazyn na inhibicję proliferacji i indukcję apoptozy komórek nowotworowych *in vitro*, doktorantka przeprowadziła ocenę apoptozy, ocenę ekspresji białka PARP-1 oraz białka Ki-67 w hodowlach komórkowych.

Niewątpliwą zasługą realizowanej pracy doktorskiej było precyzyjne metodyczne opracowanie poszczególnych etapów badawczych przy zastosowaniu szerokiej gamy metod. Doktorantka do badań użyła linii komórek gruczolakoraka gruczołu sutkowego wrażliwych (MCF-7/WT) oraz opornych (MCF-7/DOX) na doksorubicynę, które inkubowane były z doksorubicyną oraz z pochodnymi fenotiazyny. Ocena przeżywalności komórek dokonana została dzięki użyciu standardowego testu MMT, pozwalającego na analizę cytotoksyczności substancji podawanych do hodowli. Przy użyciu mikroskopii konfokalnej przeprowadzona została lokalizacja doksorubicyny i pochodnych fenotiazyny w mikrohodowlach. Natomiast ocena ekspresji glikoproteiny P, białka PARP-1 oraz Ki-67 przeprowadzona została metodami immunocytochemicznymi. Każdemu eksperymentowi towarzyszyły badania kontrolne.

Recenzowana praca liczy 78 stron tekstu i 115 pozycji literatury. Układ pracy, podział na rozdziały i podrozdziały są zgodne ze standardami pracy naukowej. Uzyskane wyniki są dobrze udokumentowane zdjęciami z mikroskopu konfokalnego, tabelami oraz wykresami. Wysoka jakość załączonej dokumentacji jednoznacznie wskazuje na uzyskaną przez doktorantkę biegłość w stosowanych metodach i w korzystaniu z aparatury badawczej.

Wstęp rozprawy doktorskiej, który bardzo dobrze wprowadza czytelnika do dalszych rozdziałów pracy, autorka przygotowała wyczerpująco i interesująco. Rozdział ten został przygotowany przez doktorantkę w oparciu o najnowszą literaturę światową, poświęconą wielu nowym zagadnieniom poszerzającym naszą wiedzę dotyczącą różnych aspektów terapii antynowotworowych, mechanizmów oporności wielolekowej itp. Dołączony przed wstępem wykaz skrótów używanych w pracy jest niezwykle pomocny czytelnikowi. W dyskusji autorka zestawiała swoje wyniki z opisanymi do tej pory danymi. Wyniki pracy zostały przedyskutowane wyczerpująco i rzeczowo. W dyskusji zawarte zostały wszystkie zagadnienia, które autorka ujęła w założeniach i celu pracy. Omawiając w tym rozdziale wyniki swoich badań, doktorantka w logiczny i bardzo precyzyjny sposób starała się wyjaśnić, w oparciu o najnowsze doniesienia z literatury światowej, podłoże oraz mechanizmy oporności wielolekowej badanych komórek nowotworowych, chociaż nie zawsze było to łatwe. Dyskusję oceniam jako wnikliwą i wyczerpującą.

Prawidłowo i jasno wyznaczony cel pracy oraz właściwie zastosowane technik badawczych pozwoliły doktorantce na uzyskanie interesujących wyników o wartości poznawczej. W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej do najważniejszych osiągnięć stanowiących o walorach naukowych pracy Pani Anny Kuźmy-Richter zaliczyć należy wnioski wynikające z wyników uzyskanych w dysertacji:

1. pochodne fenotiazyny zwiększają wrażliwość komórek gruczolakoraka gruczołu sutkowego po inkubacji z doksorubicyną (efekt pozytywny zaobserwowany był również w komórkach wykazujących oporność wielolekową)
2. pochodne fenotiazyny wykazują bezpośrednią interakcję z glikoproteiną P modulując w ten sposób aktywność komórek nowotworowych wykazujących oporność wielolekową
3. pochodne fenotiazyny znacząco indukują apoptozę w badanych liniach komórkowych
4. w linii komórek opornych na działanie doksorubicyny wykazano wysoką ekspresję białka PARP-1 co świadczy o aktywacji kaspaz efektorowych a tym samym apoptozy
5. w linii komórek wrażliwych na działanie doksorubicyny maksymalna ekspresja białka PARP-1 obserwowana była tylko w sytuacji działania doksorubicyny z dodatkiem promazyny lub trifluoropromazyny
6. w badanych liniach komórkowych obserwuje się spadek wartości białka Ki-67, co świadczy o zwiększeniu lekowrażliwości w obu liniach pod wpływem działania cytostatyku i pochodnych fenotiazyny

Podsumowując najważniejsze osiągnięcia uzyskane w rozprawie doktorskiej chciałabym w tym miejscu podkreślić, że doktorantka nie umieściła w rozprawie syntetycznego podsumowania wyników co w dużym stopniu skłoniło czytelnika do przeprowadzenia tej analizy na tzw. własną rękę. Uwaga ta jednak nie obniża wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej, a jest jedynie wskazówką dla autorki przed przygotowaniem pracy do publikacji.

Rozprawę doktorską lek. med. Anny Kuźmy-Richter uważam za bardzo dobrą, ponieważ jest wyrazem przemyślanej koncepcji, starannie wykonaną i podsumowaną w merytorycznej dyskusji. Poza

wartością czysto poznawczą, badania doktorantki mają istotne znaczenie aplikacyjne i przyczynią się niewątpliwie do lepszego zrozumienia mechanizmów oporności wielolekowej komórek nowotworowych. Stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. "Wpływ pochodnych fenotiazyny na komórki raka gruczołu sutkowego wrażliwych (MCF-7/WT) i opornych (MCF-7/DOX) na doksorubicynę" spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim. Na tej podstawie wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. med. Anny Kuźmy-Richter do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na względzie omówione powyżej osiągnięcia, wiedzę i umiejętności doktorantki oraz ogromny wysiłek, który włożyła w wykonanie badań będąc aktywnym zawodowo lekarzem, wnioskuję do Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o uhonorowanie pracy stosowną nagrodą.

Z poważaniem

Dr hab. Małgorzata Daczewska prof. UW

