



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Prof. dr hab. Jolanta Saczko

Wrocław, 29 października 2019 r.

Kierownik Katedry i Zakładu

Biologii Molekularnej i Komórkowej

Wydziału Farmaceutycznego

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Magdaleny Dudy

pt.: „*Ekspresja polimorfizmu C3435T genu oporności wielolekowej MDR1 u chorych z rakiem pęcherza moczowego*”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydziału Farmaceutycznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. Ilony Bednarek.

Choroby nowotworowe, mimo postępu metod diagnostycznych i wprowadzenia nowych, bardziej skutecznych metod leczenia, wciąż stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów u ludzi. Niewrażliwość komórek nowotworowych na działanie czynników terapeutycznych jest uważane za główną przyczynę niepowodzeń terapii i umieralność pacjentów z chorobami nowotworowymi. Podjęta w rozprawie doktorskiej tematyka obejmuje problem oporności wielolekowej w raku pęcherza moczowego, którego przyczyną może być nadekspresja genu MDR1, którego produktem jest glikoproteina-P, białko błonowe odpowiedzialne za usuwanie z komórki substancji toksycznych.

Przedłożona mi do recenzji praca liczy 111 stron i posiada typowy układ. Na wstępie praca zawiera wykaz skrótów, tabel rycin prezentowanych w rozprawie. Zamieszczony na początku wykaz skrótów czyni rozprawę bardziej dostępną i może ułatwić jej zgłębienie nawet osobom, które nie zajmują się poruszonym tematem. Pierwszym rozdziałem

przedstawionej mi do recenzji dysertacji jest „Wstęp”, który jest przeglądem literatury dotyczącej epidemiologii, etiologii, czynników ryzyka i sposobów leczenia raka pęcherza moczowego. Ponad to doktorantka we „Wstępie” omawia precyzyjnie wybrane molekularne mechanizmy oporności wielolekowej, której przyczyną może być między innymi nadekspresja transporterów błonowych. Zwraca również uwagę na epigenetyczne podłoże inicjacji choroby nowotworowej, któremu przypisuje się ostatnio bardzo ważną rolę w tym procesie. Jest to obszerny i wyczerpujący rozdział pracy. W części drugiej „Założenia i cel pracy” Doktorantka po krótkim wprowadzeniu prezentuje postawiony cel, którym była weryfikacja poziomu ekspresji genu MDR1, podstawowego genu związanego ze zjawiskiem oporności wielolekowej u pacjentów z pierwotnym rakiem pęcherza moczowego. Poziom ekspresji tego genu doktorantka postanawia skorelować z parametrami molekularnymi, charakteryzowanymi w tkankach badanych guzów takich jak typ polimorfizmu C 3435T egzonu 26 genu MDR1 oraz obecności lub braku metylacji promotora genu MDR1. Równocześnie postanowiła odnieść poziom ekspresji weryfikowanego genu MDR1 do parametrów klinicznych, takich jak: stopień złośliwości histologicznej guzów (G), ich stopień zaawansowania miejscowego (T), liczby guzów, ich wielkości, grupy ryzyka pojawienia się wznowy i progresji choroby, jak i zaobserwowanego pojawienia się wznowy choroby u pacjentów. W trzecim rozdziale pracy „Materiał i metody” doktorantka najpierw szczegółowo opisuje materiał badawczy, który ostatecznie stanowią wycinki pobrane od pacjentów, w trakcie przezcewkowej elektroresukcji guzów pęcherza moczowego. Do badań Doktorantka włącza także grupę 10 zdrowych pacjentów, niechorujących na raka pęcherza moczowego, od których uzyskano wycinki z niezmięnionej ściany pęcherza, tą grupę określa jako tzw. mapping zdrowy.

W rozprawie określono również jednoznacznie kryteria włączenia do badań pacjentów z grupy badanej. W tej części pracy Doktorantka opisuje również szczegółowo stosowane procedury i metody badawcze, które obejmowały analizę molekularną zebranego materiału badawczego: izolację kwasów nukleinowych, ocenę aktywności transkrypcyjnej genu MDR1 techniką Real Time TM (tm index górny) RT-PCR, analizę polimorfizmu C3435T genu MDR1, jakościową analizę metylacji promotora genu MDR1 techniką MS-PCR. Rozdział ten zawiera liczne tabele i ryciny. W tabelach lek. med. Magdalena Duda prezentuje między innymi sekwencje nukleotydowe starterów dla reakcji PCR stosowanych w pracy, składniki

mieszanin reakcyjnych, profile termiczne reakcji, wykaz odczynników stosowanych w rozdziale elektroforetycznym. Na rycinach z kolei przedstawione są przykładowe rozdziały elektroforetyczne produktów izolacji DNA i RNA oraz rozdziały produktów amplifikacji, krzywe amplifikacji, krzywe topnienia, wyniki analizy sekwencyjnej. Nie wszystkie ryciny są opisane precyzyjnie (ryc. 14 bez opisu). Doktorantka także podaje błędną numerację cyt. „*W celu przeprowadzenia procedury sporządzono mieszaninę reakcyjną, której skład przedstawiono w tabeli 14-stej*” koniec cytatu. Skład mieszaniny jest przedstawiony w tabeli 15-stej. Doktorantka używała do izolacji kwasów nukleinowych komercyjny zestaw TRI Reagent TM, za pomocą którego można było izolować RNA, DNA oraz białka. Czytając ten fragment pracy nasuwa mi się sugestia. Dla pełniejszego zrozumienia zagadnienia można byłoby również określić ekspresję produktu genu MDR1, czyli białka P-gp. Mielibyśmy wtedy pełniejszy obraz opisanych zjawisk, nie tylko na poziomie genu ale także na poziomie ich białkowych produktów. Można to potraktować jako wskazówkę do dalszych badań. Ostatnia część rozdziału „Materiał i metody” została poświęcona analizie statystycznej uzyskanych wyników. Doktorantka słusznie podkreśla, że wyniki przedstawione w pracy reprezentowały cechy ilościowe (poziom ekspresji genu MDR1, wiek pacjentów) oraz cechy jakościowe (stopień zaawansowania i złośliwość nowotworu- G i T, liczba guzów, stopień ryzyka wznowy, metylacja promotora genu MDR1). W związku z tym lek. med. Magdalena Duda decyduje się słusznie na zastosowanie odmiennych testów statystycznych do oceny cech jakościowych i ilościowych. Podsumowując ten rozdział pracy należy zaznaczyć, że zarówno materiał badawczy, jak i zastosowane metody nie budzą moich zastrzeżeń i zostały dobrane adekwatnie do postawionego sobie celu badań.

W części 4 dysertacji: „Wyniki” Doktorantka po uzyskaniu danych z doświadczalnej części badań i wyników analizy statystycznej stwierdza, że wycinki tkankowe ze zmienionej nowotworowo ściany pęcherza moczowego badanej grupy pacjentów charakteryzowały się zmiennym poziomem ekspresji genu MDR1 zależnym od stopnia złośliwości histologicznej i zaawansowania miejscowego nowotworu. Podkreśla, że najwyższe wartości ekspresji znaleziono u pacjentów ze stopniem złośliwości G2 i stadium zaawansowania miejscowego T1 guzów. Ponad to, z uzyskanych analiz wynika, że liczba guzów nowotworowych w pęcherzu moczowym nie była czynnikiem powiązany zmiennie statystycznie z poziomem ekspresji MDR1. Grupowanie pacjentów z uwagi na stopień złośliwości

histologicznej i stadium zaawansowania miejscowych guzów wykazało istnienie znamienych statystycznie różnic w relatywnym poziomie ekspresji MDR1 wśród pacjentów z pojedynczymi i mnogimi guzami najwyższym stadium choroby, odpowiednio G3 i T2. Dwukrotne zwiększenie relatywnego poziomu ekspresji MDR1 zwiększało iloraz szans pojawienia się wznowy choroby u pacjentów o 1,3 razy. Polimorfizm c3435T egzonu 26 genu MDR1 miał wpływ na poziom ekspresji tego genu i był najwyższy w grupie chorych z wzorem polimorficznych c/c a najniższy dla typu polimorficznego T/T. Dodatkowo doktorantka stwierdza, że typując pacjentów na podstawie zróżnicowania polimorficznego pozwoliło wykazać zmienność ekspresji tego genu zależnie od parametrów klinicznych. Ten rozdział pracy napisany jest poprawnie i nie budzi moich zastrzeżeń.

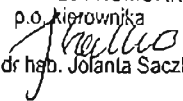
Kolejny rozdział pracy to 13-stronicowa „Dyskusja” którą można podzielić na kilka części. W pierwszej doktorantka omawia uzyskane wyniki w odniesieniu do danych literaturowych. Doktorantka omawia rezultaty własnych doświadczeń, odnosząc się do wyników innych badaczy. W kolejnym fragmencie przytacza i szeroko omawia inne przyczyny powstawania raka pęcherza moczowego. Wśród nich jako najczęstsze i najbardziej znamienne przedstawia mutacje w obrębie różnych genów. W dalszej części wraca ponownie do omawiania własnych wyników w aspekcie wpływu zmian epigenetycznych. Szczególnie podkreśla, cyt. *„kiedy odkryto, że przyczyny nadekspresji genów, których produkty białkowe są powiązane z onkogenezą czy metastazą nie zależą tylko od zmian o charakterze mutacyjnym podejście do regulacji ekspresji genów i procesów komórkowych po raz kolejny uległo zmianie i przyniosło wiele nowych wyników”* koniec cyt. Słusznie podkreślono odkrycie zmian epigenetycznych jako rewolucyjne w tej dziedzinie. Ta niekonwencjonalnie napisana dyskusja spotkała się z moją całkowitą aprobatą i zasługuje na podkreślenie.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka w kolejnej części pracy sformułowała 9 wniosków. Wnioski są jasne i czytelne.

Następny rozdział pracy to „Literatura” aktualna i poprawnie dobrana. Autorka powoływała się w pracy na 187 pozycji literaturowych, w dużej mierze to prace z ostatnich kilku lat. Rozprawę zamykają streszczenia w języku polskim i angielskim.

Stwierdzam, że uchybienia przedstawione wcześniej w niczym nie obniżają wartości poznawczej pracy oraz jej znaczenia praktycznego. Stwierdzam, że przedłożona mi do

recenzji rozprawa doktorska lek. med. Magdaleny Dudy spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lekarza Magdaleny Dudy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII
MOLEKULARNEJ I KOMÓRKOWEJ
p.o. kierownika

prof. dr hab. Jolanta Saczko