

Katowice, 18.08.2019r.

Ocena pracy doktorskiej pt.:

**OCENA KOMPONENTU PRZECIWNOWOTWOROWEGO AKRYDYNY  
W UKŁADACH ZAWIERAJĄCYCH KWAS JODOBENZOESOWY**

wykonanej przez

**mgr Małgorzatę Girek**

w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji  
Katedry Chemii Farmaceutycznej  
Wydziału Farmaceutycznego  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Katedra i Zakład Chemii  
i Analizy leków

Wydział Farmaceutyczny  
z Oddziałem Medycyny  
Laboratoryjnej  
w Sosnowcu

Śląski  
Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach

ul. Jagiellońska 4  
41-200 Sosnowiec  
[www.chemialekow.sum.edu.pl](http://www.chemialekow.sum.edu.pl)

KIEROWNIK KATEDRY  
Dr hab.n.farm.  
Dorota Wrześniok  
tel.: (+48 32) 364 16 11

SEKRETARIAT  
tel./fax: (+48 32) 364 16 11



Powstawanie i progresja zmian nowotworowych uzależnione są od wielu czynników, do których zaliczyć można i/ nagromadzenie zmian genetycznych powstałych w wyniku nadekspresji bądź mutacji protoonkogenów, a także utraty lub zmiany genów supresorowych, oraz ii/ zdolność komórek nowotworowych do unikania śmierci, czyli apoptozy. Apoptoza jako programowana śmierć komórki odgrywa fundamentalną rolę w rozwoju wielu typów nowotworów, w tym także raka płuc i raka jelita grubego. Proces apoptozy realizowany jest na drodze dwóch szlaków: zewnętrznego, który bezpośrednio związany jest z aktywacją receptorów śmierci, oraz wewnętrznego, nazywanego również programem mitochondrialnym - stanowiącym jedną z głównych barier przeciwnowotworowych, ponieważ nieprawidłowości w jego funkcjonowaniu prowadzą do namnażania się, przedłużenia żywotności i utrwalenia zmian genetycznych wadliwych komórek.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Girek została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. n. farm. Pawła Szymańskiego oraz dr n. med. Bartłomieja Grobelskiego, pełniącego funkcję promotora pomocniczego. Praca jest ambitną próbą oceny przeciwnowotworowych właściwości nowych pochodnych tetrahydroakrydyny zawierających komponent jodobenzoesowy.

Opracowywanie nowego leku to długotrwały proces, w którym głównym założeniem jest bezpieczeństwo pacjentów. Wiadomo, że od momentu sformułowania obiecującej hipotezy w laboratorium badawczym do uzyskania zatwierdzenia gotowego produktu leczniczego przez Urząd ds. Rejestracji może upłynąć nawet kilkanaście lat. Należy mieć również świadomość, że badania prowadzone z wykorzystaniem kilku tysięcy substancji zaowocują opracowaniem jednego związku chemicznego, który będzie można dopuścić do etapu badań, w którym będą uczestniczyć pacjenci.

W związku z powyższym, problematyka podjęta przez Doktorantkę, mająca na celu poszukiwanie nowych pochodnych akrydyny w aspekcie ich potencjalnego terapeutycznego zastosowania wydaje się być niezwykle istotna. Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Małgorzaty Girek jest jednotomowym opracowaniem, zawierającym 123 strony tekstu wraz z 30 rycinami (głównie wykresami) i tabelami w liczbie 10. Praca ma klasyczny układ i zawiera rozdziały: Wprowadzenie, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Omówienie i dyskusja wyników, Wnioski, Piśmiennictwo oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Z uwagi na dużą liczbę przeprowadzonych analiz, spis treści jest bardzo rozbudowany i zawiera się na aż 3 stronach. Dodatkowo w pracy zamieszczono wykaz skrótów stosowanych w tekście pracy, znacząco ułatwiający jej lekturę. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę, iż:

- i/ wzory sumaryczne wraz z towarzyszącymi im nazwami związków chemicznych: HCl, NaCl, NaOH, CH<sub>3</sub>COOH, CH<sub>3</sub>COONa, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - nie powinny być zamieszczone w wykazie skrótów.
- ii/ w przyszłych badaniach proponuję rozważyć wprowadzenie, w odniesieniu do przeżywalności komórek skrótu - EC<sub>50</sub> (ang. *half maximal effective concentration*) – jako stężenia powodującego obniżenie przeżywalności o 50% w odniesieniu do kontroli; skrót IC<sub>50</sub> (ang. *half-maximal inhibitory concentration*) – pozostawiając jako adekwatny do wyrażania stężenia hamującego działanie np. enzymów. Uwzględnienie dwóch skrótów (EC<sub>50</sub> i IC<sub>50</sub>) pozwoli na czytelną interpretację uzyskanych wyników badań.

Tytuł rozprawy doktorskiej został jasno sformułowany. Wybór tematu pracy doktorskiej uważam za trafny, zgodny z kierunkiem współczesnych badań naukowych i aktualnym stanem wiedzy. Punktem wyjścia do sformułowania celu pracy były wcześniejsze prace badawcze zrealizowane w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, których efektem była synteza dziewięciu nowych pochodnych tetrahydroakrydyny (1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoakrydyny).

We wstępie Doktorantka wiele miejsca poświęciła wprowadzeniu czytelnika w wiedzę na temat: i/ epidemiologii, czynników ryzyka oraz terapii niedrobnokomórkowego nowotworu płuc i gruczolakoraka jelita grubego, ii/ pochodnych akrydyny wykazujących działanie biologiczne oraz iii/ parametrów istotnych podczas projektowania nowych leków, jak również zagadnieniom dotyczącym: i/ stresu oksydacyjnego, ii/ cyklu komórkowego oraz iii/ apoptozy.

Szczegółowy opis zastosowanych metod badawczych został zamieszczony w rozdziale Materiały i metody. Rozdział ten zakończony jest informacją na temat zastosowanych w pracy metod analizy statystycznej niezbędnych do oceny uzyskanych wyników. Przedstawione metody są co do zasady aktualne i adekwatne do rozwiązywanych problemów naukowych i w zdecydowanej większości nie budzą żadnych wątpliwości. Pojawiło się jednak kilka zagadnień, które w mojej opinii wymagają wyjaśnienia lub przedyskutowania:

A. w aspekcie celu pracy, dotyczącego bezpośrednio raka płuc i raka jelita grubego, proszę o wyjaśnienie i umotywowanie:

i/ w jakim celu do badań została wykorzystana linia komórkowa SH-SY5Y ludzkiego nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma) będąca złośliwym nowotworem współczulnego układu nerwowego, zaliczanym się do grupy nowotworów wieku dziecięcego i będącego jednym z częściej występujących nowotworów współczulnego układu nerwowego u dzieci i jednocześnie najczęstszym nowotworem diagnozowanym u niemowląt?

ii/ dlaczego oporność na cisplatynę badanych związków była analizowana z wykorzystaniem linii komórkowej nowotworu pęcherza moczowego - 253J B-V?

W tym miejscu, korzystając z przywileju recenzenta, pozwolę sobie na uwagę, iż wykorzystanie linii komórkowej (hybrydy) śródbrzońki żyły pępowinowej - EA.hy926 - wyjaśniono dopiero na etapie omówienia wyników, a moim zdaniem takie uzasadnienie powinno pojawić się na etapie opisu zaprojektowanego panelu eksperymentalnego przedstawionego w celu pracy, tak aby nie było najmniejszych wątpliwości podjętych przez Doktorantkę badań cząstkowych.

- B. w aspekcie przeprowadzonej analizy statystycznej proszę o uściślenie:
- i/ jaki test post-hoc zastosowano po uprzednim przeprowadzeniu analizy wariancji?
- C. w aspekcie przeprowadzonych badań proszę o wyjaśnienie:
- i/ w jakim celu przeżywalność linii komórkowych A549 i HT-29 przeprowadzono za pomocą dwóch testów: z użyciem sondy MTT oraz testu klonogenego. Jakie są podstawowe różnice w zasadzie działania omawianych testów i czy omawiane testy są kompatybilne czy raczej mają charakter uzupełniający?

W celu pracy nie uwzględniono ponadto wykonania niezwykle cennych i interesujących badań *in silico* nowych pochodnych tetrahydroakrydyny zestawionych w tabeli 2.

Sformułowanie powyższych uwag i pytań wynika jedynie z przywileju recenzenta, z którego skorzystałam, i w żadnym wypadku nie mają charakteru uwag krytycznych. Powyższe pytania mogą natomiast stanowić inspirację do doskonalenia warsztatu badawczego oraz interesujący przedmiot dyskusji na polu naukowo-akademickim.

Uzyskane wyniki badań zostały poprawnie zredagowane i udokumentowane na szczegółowo opisanych rycinach. W tej części Autorka dokonuje i/ zasadniczego omówienia wyników jak również ii/ wysuwa po każdym cyklu badań wnioski cząstkowe. W rozdziale - Omówienie wyników i dyskusja - Autorka dokonała interpretacji uzyskanych wyników badań oraz skonfrontowała wyniki własne z hipotezami i badaniami przedstawionymi w adekwatnej literaturze przedmiotu. Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie uzasadnionych wniosków, wnoszących nowe istotne informacje do aktualnego stanu wiedzy. Z całym przekonaniem stwierdzam, iż rozdział dotyczący dyskusji wyników stanowi najmocniejszą część pracy doktorskiej mgr farm. Małgorzaty Girek, i pozwala na docenienie umiejętności krytycznej oceny otrzymanych wyników badań i interpretację wyników w przestrzeni przyczynowo-skutkowej.

W mojej opinii najistotniejszymi efektami prowadzonych badań było:

- i/ wykazanie, iż położenie jodu w podstawniku w pozycji *para* oraz dłuższy łańcuch alifatyczny zwiększają cytotoksyczność badanych związków;
- ii/ wskazanie na podstawie przeprowadzonych paneli eksperymentalnych trzech najbardziej obiecujących w terapii nowotworów płuc, jelita grubego i pęcherza moczowego pochodnych tetrahydroakrydyny (**1c**, **1f**, **1i**) - jako związków chemicznych o potencjalnym znaczeniu w medycynie i farmacji.



Cytowane przez Doktorantkę 181 pozycji piśmiennictwa naukowego odzwierciedla stan wiedzy w obrębie omawianego tematu - 69/181 pozycji, co stanowi ok. 38% wszystkich danych literaturowych - to doniesienia naukowe z ostatnich 10 lat, a spośród nich 33/69 pozycji (48%) to prace opublikowane w ciągu ostatnich 5 lat, co wskazuje na istotność podjętego przez Doktorantkę problemu naukowo-medyczno-społecznego.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są oryginalne i zaprezentowane w rzetelny sposób. Autorka posługuje się fachowym słownictwem, co świadczy o dobrej orientacji w badanej dziedzinie. Niestety z obowiązku recenzenta z przykrością muszę stwierdzić, iż styl sformułowań niejednokrotnie mimo tego, iż jest uzasadniony naukowo, nie jest napisany poprawnie z uwzględnieniem zasad gramatyki i stylu języka polskiego.

Reasumując, przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Girek wpisuje się w niezwykle istotny zarówno z punktu widzenia naukowego, medycznego, ekonomicznego, jak i społecznego nurt badań poświęconych poszukiwaniu potencjalnych rozwiązań terapeutycznych w przebiegu chorób nowotworowych. Pragnę podkreślić, że przedłożona przez Doktorantkę dysertacja, z uwagi na zaprezentowany poziom naukowy i wartości poznawcze oraz poparcie wysuniętych wniosków obszernym materiałem eksperymentalnym w pełni odpowiada wymogom ustawowym stawianym rozprawom doktorskim. Zakres naukowy omawianych zagadnień został przedstawiony wyczerpująco, w oparciu o adekwatne pozycje literaturowe. O wartości wykonanych badań świadczy opublikowanie części wyników w postaci oryginalnego artykułu, w którym Doktorantka jest pierwszym autorem, w czasopiśmie posiadającym znaczący współczynnik oddziaływania Impact Factor.

W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Girek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**KIEROWNIK**

Katedry i Zakładu Chemii i Analizy Leków  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

*Dorota Wrześniak*  
dr hab. n. farm. Dorota Wrześniak