



18.02.2022 r.

Dr hab. Agata Przekora-Kuśmierz, prof. UM
Samodzielna Pracownia Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Sumorek-Wiadro pt.
„Potencjał terapeutyczny kumaryn w terapii skojarzonej z temozolomidem w eliminacji ludzkich komórek glejaka na drodze zaprogramowanej śmierci” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Joanny Jakubowicz-Gil, prof. UMCS w Katedrze Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pod tytułem „*Potencjał terapeutyczny kumaryn w terapii skojarzonej z temozolomidem w eliminacji ludzkich komórek glejaka na drodze zaprogramowanej śmierci*” dotyczy izolacji kumaryn prostych oraz furanokumaryn z roślin leczniczych w celu oceny ich właściwości przeciwnowotworowych względem komórek glejaka. Rozprawa doktorska liczy 147 stron (nie licząc aneksu) i składa się z sześciu głównych rozdziałów (I. Wstęp, II. Cel pracy, III. Materiały o metody, IV. Wyniki, V. Dyskusja, VI. Wnioski), suplementu, bibliografii, spisu rycin, spisu tabel i aneksu przedstawiającego sylwetkę oraz dorobek naukowy Doktorantki. Dodatkowo praca jest uzupełniona o wykaz stosowanych skrótów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim, co jest wymagane stosowną ustawą. Układ pracy jest poprawny oraz zawiera typowy dla pracy badawczej podział treści.

Temat podjęty przez Doktorantkę wpisuje się w bardzo ważny nurt naukowy z zakresu terapii nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania związków pochodzenia naturalnego w terapii skojarzonej z chemioterapeutykami w celu wzmocnienia efektu leczniczego. W ramach prowadzonych badań, Doktorantka dokonała izolacji kumaryn prostych (ostolu i umbeliferonu) oraz furanokumaryn (imperatoryny, izoimperatoryny, bergaptenu i ksantotoksyny). Do izolacji związków posłużyły rośliny zebrane w Ogrodzie Roślin Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Wyizolowane kumaryny zostały następnie oczyszczone (m.in. z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii przeciwprądowej) oraz zidentyfikowane. Wszystkie wyizolowane kumaryny oraz dwie kumaryny proste zakupione z Sigma-Aldrich Chemicals (eskulina oraz 4-hydroksykumaryna) zostały poddane analizie biologicznej pod względem ich aktywności przeciwnowotworowej



w stosunku do komórek glejaka. W tym celu dokonano analizy apoptozy, autofagii oraz nekrozy w hodowli komórek glejaka wykorzystując dwie linie nowotworowe zakupione w banku komórek, które zostały poddane ekspozycji na działanie kumaryn i ich pochodnych.

W następnym etapie badań, Doktorantka dokonała oceny właściwości przeciwnowotworowych wybranych w poprzednim etapie stężeń kumaryn w skojarzeniu z trzema chemioterapeutykami: temozolomidem, sorafenibem oraz LY294002. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę na pewną nieścisłość tytułu rozprawy doktorskiej z zakresem przeprowadzonych badań. Tytuł wskazuje na analizę potencjału terapeutycznego kumaryn w terapii skojarzonej wyłącznie z temozolomidem, podczas gdy Doktorantka dokonała analizy terapii skojarzonej kumaryn łącznie z trzema różnymi chemioterapeutykami. Niemniej jednak jest to tylko drobna uwaga, którą przedstawiam z obowiązku Recenzenta, nie mająca wpływu na wartość naukową i merytoryczną rozprawy doktorskiej. Aby ocenić potencjalną skuteczność terapii skojarzonej w warunkach *in vitro*, Doktorantka dokonała kompleksowej analizy biologicznej. W tym celu zostały wykonane następujące eksperymenty: (1) test indukcji zaprogramowanej śmierci komórek, (2) test migracji komórek, (3) ocena molekularnych mechanizmów zaprogramowanej śmierci komórek (poziom i aktywność kaspazy 3, poziom bekliny 1, białka Bcl-2, obecność kompleksów Bcl-2:bekulina 1, poziom kinaz PI3K i RAF, ocena aktywności Akt/PKB i ERK), oraz (4) w przypadku skojarzenia terapii z LY294002 i sorafenibem również ocena blokowania ekspresji PI3K oraz RAF.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Sumorek-Wiadro została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Praca jest przejrzysta, a cele badawcze zostały bardzo dobrze sformułowane. Wstęp jest obszerny, interesujący oraz zawiera wszystkie potrzebne informacje, które są niezbędne dla zrozumienia podjętej tematyki badawczej oraz właściwej interpretacji otrzymanych rezultatów. Na pochwałę zasługuje fakt, że Doktorantka wzbogaciła rozprawę doktorską o wiele ciekawych zdjęć, schematów i tabel, które ułatwiają zrozumienie podjętej problematyki. Jeśli chodzi o część eksperymentalną, to jestem pod wrażeniem ilości oraz złożoności wykonanych badań biologicznych. Co ważne, mgr Joanna Sumorek-Wiadro zastosowała właściwie metody badawcze typowe dla oceny biologicznej związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej. Niemniej jednak, najprawdopodobniej ze względu na bardzo dużą złożoność badań, do opisu metodyki oraz wyników wkraść się



pewien chaos oraz pojawiło się kilka nieścisłości. Dlatego w tym miejscu chciałabym prosić Doktorantkę o odpowiedź na kilka pytań oraz ustosunkowanie się do pewnych uwag:

- (1) Dobór stężeń związków do eksperymentów biologicznych: w pracy doktorskiej brakuje przedstawienia typowego testu „skriningowego” (np. MTT) dla wszystkich kumaryn, aby wybrać najbardziej obiecujące stężenia związków, wykazujące działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych oraz niską toksyczność w stosunku do komórek prawidłowych. W swojej pracy Doktorantka od razu przeszła do analizy mechanizmów działania kumaryn oraz ich kombinacji z chemioterapeutykami, przez co całość sprawia wrażenie jakby zabrakło badań podstawowych, które powinny stanowić punkt wyjścia dla analiz przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej. Chciałabym zauważyć, że jedynie związki wykazujące indeks selektywności (SI) powyżej 1, który jest definiowany jako stosunek wartości IC_{50} wyznaczonej dla komórek prawidłowych do wartości IC_{50} wyznaczonej dla komórek nowotworowych, mają realny potencjał terapeutyczny. Bez podstawowego testu cytotoksyczności, nie jest do końca zrozumiałe na jakiej podstawie Doktorantka wybrała konkretne stężenia do pozostałych analiz. Nie wystarczy informacja w sekcji „Materiały i metody”, że „*stężenia końcowe i czas inkubacji kumaryn zostały ustalone eksperymentalnie*”.
- (2) Identyfikacja komórek apoptotycznych i nekrotycznych: w podrozdziale 6.1 części „Materiały i metody”, Doktorantka napisała „*intensywność świecenia, zależna od stopnia skondensowania chromatyny, pozwoliła na odróżnienie silnie fluoryzujących komórek apoptotycznych od nie wykazujących świecenia komórek żywych*”. To zdanie jest zbyt dużym uproszczeniem, ponieważ barwnik Hoechst 33342 przenika przez nienaruszone błony biologiczne, barwiąc również jądra żywych, zdrowych komórek.
- (3) Rozdział „Materiały i metody”: przy opisie metodyki dla poszczególnych eksperymentów brakuje pewnych kluczowych informacji, np. jak długo komórki były wystawione na działanie związków (ta informacja pojawia się dopiero w opisie wyników) lub jaka była gęstość komórek podczas ich wysiewania na poszczególne testy. Dla niektórych eksperymentów (np. testu rysy), Doktorantka podała dane dotyczące gęstości komórek, niemniej jednak jest to informacja niepełna, która nie uwzględnia w jakiej objętości płynu hodowlanego były wysiewane komórki, co bezpośrednio wpływa na finalną ilość komórek w dołkach naczynia hodowlanego. Nie jest również do końca jasne czy podana ilość wysianych komórek (np. 2×10^5) jest wyrażona na dołek płytki wielodołkowej czy



na mL, a obie formy przedstawienia gęstości zawiesiny komórkowej są powszechnie stosowane oraz dopuszczone w protokołach hodowli komórek.

- (4) Brak badań na prawidłowej linii komórkowej: biorąc pod uwagę fakt, że związki o aktywności przeciwnowotworowej bardzo często wpływają negatywnie również na metabolizm, żywotność oraz proliferację komórek prawidłowych, zdecydowana większość eksperymentów powinna być wykonana równolegle dla prawidłowych komórek linii OLN-93 – zwłaszcza wpływ związków oraz ich kombinacji z chemioterapeutykami na indukcję apoptozy, autofagii i nekrozy. Uzupełnienie badań o wyniki uzyskane dla prawidłowej linii komórkowej bez wątpienia podniosłoby wartość naukową pracy.
- (5) Test rysy: test zarastania rysy jest prostym i dobrym narzędziem do wstępnej oceny wpływu związków na migrację komórek. Niemniej jednak aby uzyskać wiarygodne wyniki badań niezbędne jest równomierne wysianie komórek dla próbki kontrolnej (komórki hodowane w pożywce bez dodatku testowanego związku) oraz prób badanych. Ponadto ważne jest aby komórki tworzyły tzw. ścisły „monolayer” (nie były w fazie logarytmicznego wzrostu) w momencie dodawania do hodowli roztworów testowanych substancji. Ma to związek z tym, że obserwowana migracja komórek (tym samym zarastanie rysy) może być wynikiem podziałów komórkowych oraz zwiększania się liczby komórek w hodowli, a nie zdolności motorycznych komórek. Z tego również powodu w celu uzyskania wiarygodnych wyników w teście rysy, zalecane jest dodawanie do pożywki hodowlanej inhibitorów mitozy (np. mitomycyny C) jeśli ocena migracji komórek wykonywana jest po czasie dłuższym niż 24 godziny. Doktorantka dokonała oceny migracji po 24 godzinach, więc brak inhibitora mitozy nie jest dużym błędem. Niemniej jednak przedstawione przez Doktorantkę zdjęcia obrazujące wykonany test jednoznacznie pokazują znacznie bardziej ścisły „monolayer” komórek w hodowli kontrolnej w porównaniu do komórek w hodowlach traktowanych testowanymi związkami. Pozostawienie wolnych przestrzeni w hodowli, która nie wykazuje 100% konfluencji, powoduje preferencyjne zajmowanie przez komórki wolnych do wzrostu miejsc, co skutkuje wolniejszym zarastaniem utworzonej rysy w rzadszych hodowlach w porównaniu do gęstej hodowli kontrolnej, fałszując końcowy wynik testu. W związku z tym uzyskane wyniki nie mogą być uznane za wiarygodne. Jest to tak naprawdę jedyna poważna uwaga merytoryczna dotycząca przedawnionej rozprawy doktorskiej.



Mimo kilku nieścisłości oraz krytycznych uwag, które wskazałam z obowiązku Recenzenta, chciałabym podkreślić, że rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Joannę Sumorek-Wiadro prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny i naukowy, a jakość i dobór zastosowanych metod badawczych nie budzi żadnych zastrzeżeń. W ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej mgr Joanna Sumorek-Wiadro zrealizowała w pełni założone cele badawcze przy użyciu modeli komórkowych *in vitro* oraz metod typowych dla biologii molekularnej. Na pochwałę zasługuje również bardzo dojrzałe napisana sekcja „Dyskusja”, która doskonale tłumaczy zaobserwowane przez Doktorantkę zjawiska oraz w sposób bardzo logiczny wyjaśnia i interpretuje uzyskane wyniki badań. Dyskusja wyników zawsze stwarza największe problemy podczas pisania rozprawy doktorskiej oraz artykułów naukowych. Zatem tak doskonale przedstawiona interpretacja badań świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Joanny Sumorek-Wiadro pt. *„Potencjał terapeutyczny kumaryn w terapii skojarzonej z temozolomidem w eliminacji ludzkich komórek glejaka na drodze zaprogramowanej śmierci”* jest bardzo wartościowym dziełem z zakresu badań nad nowymi terapiami przeciwnowotworowymi, wnoszącym znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne. Warto również podkreślić aktywność naukową mgr Joanny Sumorek-Wiadro, która pełniła rolę kierownika w trzech projektach naukowych finansowanych z wewnętrznych źródeł finansowania UMCS. Co więcej mgr Joanna Sumorek-Wiadro może pochwalić się znaczącym dorobkiem naukowym – 7 artykułów w prestiżowych czasopismach z IF oraz 3 recenzowane artykuły opublikowane w czasopismach z listy MEiN. W związku z tym z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona przez mgr Joannę Sumorek-Wiadro rozprawa doktorska spełnia wymagania zapisane w stosownej ustawie, stanowiąc znaczny wkład w dziedzinę nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. **Biorąc pod uwagę powyższe oraz uwzględniając bardzo wysoką ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej, jak również rangę rozwiązywanego problemu badawczego, zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Joanny Sumorek-Wiadro oraz o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

KIEROWNIK
Samodzielnej Pracowni
Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Agata Przekora-Kuśmierz
dr hab. Agata Przekora-Kuśmierz, prof. UM