Lublin, 20.07.2023r.

Dr hab. Grzegorz Raszewski, prof. IMW
Zakład Toksykologii i Bezpieczeństwa Żywności
Instytut Medycyny Wsi w Lublinie

Recenzja

rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne, pt. „ Kwercetyna i lenzozyd Aβ jako adiuwanty sorafenibu w indukcji programowanej śmierci ludzkich komórek glejaka"

wykonanej

przez mgr Aleksandrę Maciejczyk z Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,

pod kierunkiem dr hab. Joanny Jakubowicz-Gil, prof. UMCS

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przesłana w postaci wydruku komputerowego. Całość rozprawy została zredagowana częściowo w przyjętym powszechnie stylu z podziałem treści na następujące rozdziały: Wstęp (1), Cel pracy (2), Materiał i metody (3), Wyniki (4), Dyskusja (5), Wnioski (6), Suplement – ocena skuteczności aplikacji skojarzonej (7), Bibliografia (8), Netografia (9), Spis rycin (10), Spis tabel (11) oraz Aneks-Zyciorys naukowy doktoranta. Rozdziały poprzedzone są: wykazem stosowanych skrótów (4 strony) i krótkim streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim. Cała rozprawa liczy 145 stron maszynopisu, w tym 56 rycin i 7 tabel.

Ostatnie strony przedstawiające życiorys naukowy Doktorantki, moim zdaniem są zbędne, gdyż zadaniem recenzenta jest ocena przedstawionej rozprawy doktorskiej a nie całościowo jej dokonań naukowych, nawet jak w tym przypadku ponadprzeciętnych.

W pracy od razu zwracają uwagę strony, zawierające wykaz stosowanych skrótów, ich ilość i różnorodność, co tylko może świadczyć o bogactwie poruszanej tematyki naukowej, związanej z rozprawą i dobrym warsztacie naukowym Doktorantki. Na wyróżnienie zasługuje również dobre tłumaczenie angielskich skrótów, co wiadomo nie jest sprawą łatwą.

Dwie następne części pracy: **Streszczenie i** angielskojęzyczna **Summary** w skrótowej formie w pełni odzwierciedlają omawianą pracę doktorską.

W rozdziale I – **Wstęp,** przedstawiono zwięzłą charakterystykę glejaków, dane epidemiologiczne i problemy związane ze skutecznym ich leczeniem. Na następnych stronach, Doktorantka omówiła klasyfikację glejaków, w tym, najnowszą z 2021r opracowaną przez Światową Organizację Zdrowia. Bardzo interesująca jest również, opisana klasyfikacja zaproponowana przez zespół pod kierownictwem prof. Antonio Iavarone, która opiera się na identyfikacji stanów funkcjonalnych komórek i aktywności ich szlaków sygnałowych. Pozwoliła ona na klasyfikowanie glejaków na cztery podtypy, definiowane przez dwa czynniki: rozwój neurologiczny oraz metabolizm komórkowy. Jak pisze Autorka, wychodzi to naprzeciw potrzebie, stworzenia klasyfikacji funkcjonalnej, umożliwiającej poznanie wrażliwości farmakologicznej glejaków, pozwalającej na bardziej precyzyjne określenie rokowania dla pacjentów.

W dalszej części wstępu, przedstawiono i scharakteryzowano dwa typy glejaków: Gwiaździaka anaplastycznego oraz Glejaka wielopostaciowego, których ludzkie linie komórkowe były modelem badawczym.

Następnie, dokładnie opisano szlak Ras/Raf/MEK/ERK i proces przekazywania sygnału przeżycia dla glejaka. Jak wiadomo, transformacja nowotworowa glejaków związana jest z rozregulowaniem ekspresji genów kodujących białka wchodzące w skład szlaków przekazywania sygnału przeżycia. W przypadku zintensyfikowania tego sygnału w komórkach nowotworowych, istnieje zarówno problem z opornością na prowadzoną chemioterapię jak i z wprowadzeniem komórek nowotworowych na drogę programowanej śmierci. Inhibitorem wspomnianego szlaku sygnałowego jest badany sorafenib, dlatego dokładne przedstawienie szlaku Ras/Raf/MEK/ERK i procesu przekazywania sygnału przeżycia dla glejaka jest potrzebne i celowe. Podobnie jak przedstawienie i dokładnie scharakteryzowanie użytych w badaniach: sorafenibu, kwercetyny i lenzozymu.

We wstępie Doktotantka zajęła się również kwestią leczenia onkologicznego i różnym strategiom terapeutycznym umożliwiającym likwidację komórek glejaka. Wspomniała o leczeniu chirurgicznym, radio i chemioterapii, immunoterapii oraz zastosowaniu flawonoidów w terapii przeciwnowotworowej w kontekście użytych w prezentowanych badaniach flawonoidów: kwercetyny i jej pochodnej Lenzozydu Aβ.

Wstęp kończy podrozdział 4, omawiający ogólnie znane fakty dotyczące rodzajów programowanej śmierci komórki, czyli apoptozę i autofagię oraz proces, który prowadzi do nieprogramowej śmierci – nekrozę. Autorka w tym fragmencie swojej pracy niestety,

pominęła proces nekroptozy, który jest innym rodzajem programowanej śmierci komórkowej i może działać jako system zapasowy, kiedy ścieżka apoptotyczna jest nieaktywna lub aktywnie hamowana. Dodatkowo, wiadomo, że zaburzenia w szlakach sygnalizacyjnych kontrolujących nekroptozę mają swój udział w procesie kancerogenezy. Dlatego omawiając mechanizmy i rodzaje śmierci komórkowej w kontekście procesów związanych z chorobą nowotworową, warto byłoby wspomnieć i o nekroptozie.

Mimo kilku uwag, uważam, że ta część rozprawy doktorskiej została poprawnie zaplanowana, a poszczególne podrozdziały zachowują odpowiednie proporcje. Rozdział ten napisany jasno i zrozumiale, wskazuje na obszerną i dobrze uporządkowaną wiedzę Doktorantki w obszarze jej działalności naukowej.

Rozdział II – **Cel pracy**.

W rozdziale tym, Autorka pisze, że „celem ... pracy była ocena przeciwnowotworowych właściwości kwercetyny, lenzozydu Aβ oraz sorafenibu, wykorzystując hodowle komórek glejaka jako model badawczy. Moim zdaniem, tak sformułowany cel badania jest zbyt ogólny, nie oddaje charakteru przeprowadzonych badań oraz nie jest adekwatny do tematu pracy – „.Kwercetyna i lenzozyd Aβ jako adiuwanty sorafenibu w indukcji programowanej śmierci ludzkich komórek glejaka". Wyszczególnione w czterech punktach cele cząstkowe dopiero wskazują jakie były cele badania, a lekko zmodyfikowany cel cząstkowy podany jako pkt. 1: może służyć, do moim zdaniem poprawnego podania jaki był cel ogólny przeprowadzonych prac. Podane cele cząstkowe są jasno i poprawnie wyznaczone a ich realizacja wskazuje na zakres i charakter prowadzonych badań, które powinny dać szczegółowe odpowiedzi o roli badanych związków w indukcji programowanej śmierci ludzkich komórek glejaka.

Rozdział III – **Materiały i metody**

Badania zostały zaplanowane z wykorzystaniem różnorodnych metod i technik badawczych stosowanych rutynowo w badaniach *in vitro*, które zostały precyzyjnie i wyczerpująco przedstawione. Również materiały wykorzystane podczas pracy badawczej (odczynniki, materiały do hodowli tkankowych i do mikroskopii konfokalnej, badane związki, stosowane bufory, przeciwciała i zestaw do oznaczeń białka), zostały bardzo dokładnie wymienione z podaniem producenta. Stosowane w badaniach liczne linie komórkowe zostały wymienione w oddzielnym podrozdziale z podaniem podłoży i dokładnych metod ich hodowli.

Stosowane przez Doktorantkę procedury badawcze: identyfikacja komórek apoptycznych, nekrotycznych i autofagalnych z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej;

identyfikacja komórek martwych z wykorzystaniem techniki cystometrii przepływowej oraz metoda badania potencjału błony mitochondrialnej i dokładnie opisane w dalszej części rozdziału pozostałe techniki badawcze, są szeroko stosowanymi uznanymi i zwalidowanymi w pracach naukowych metodami, co gwarantuje ich wiarygodność i daje poprawne odpowiedzi na stawiane pytania i realizację postawionych celów badawczych.

Metody badań dobrano prawidłowo, adekwatnie do postawionych celów badawczych. Moje uznanie budzi, użyte instrumentarium i bardzo dobra znajomość stosowanych metod i opanowanie skomplikowanej techniki tego typu badań in vitro przez Doktorantkę, która była niezbędna do wykonania tej pracy.

Otrzymane wyniki doświadczalne zostały poddane analizie statystycznej, która nie budzi zastrzeżeń, gdyż przyjęte testy statystyczne są odpowiednie i nie odbiegają od przyjętych w nauce standardów.

Rozdział IV – **Wyniki**

Rozdział ten od 68 do 99 strony maszynopisu został podzielony na 7 części. Wyniki zostały opisane w sposób jasny i czytelny. Dodatkowo zostały zilustrowane na rycinach 15-38, dobrze przygotowanych pod względem graficznym i prawidłowo opisane. Część rycin jest jednak mało przejrzystych i czytelnych, gdyż pokazanie kilkuprocentowych różnic w ilości martwych komórek na skutek apoptozy, autofagii i nekrozy, przy zakresie podanej skali procentowej znacznie utrudnia odczyt.

Wyniki dokumentują, że zbadano wpływ kwercetyny oraz lenzozydu Aβ (w dawce 5-100μM) i Sorafenibu (0,25-5μM) na badane 6 linii glejaka w indukcji apoptozy, autofagii i nekrozy i na tej podstawie wybrano stężenie każdego flawonoidu do stosowania w dalszych badaniach. Co warte podkreślenia, zaproponowane do dalszych testów, pojedyncze stężenia kwercetyny (50 μM), lenzozydu Aβ (50μM) i Sorafenibu (1μM) oraz ich skojarzona aplikacja, została przebadana na prawidłowej linii oligodendrocytów ONL-93 jako kontrola, w kierunku wywoływania śmierci komórkowej, dając w każdym wypadku wynik negatywny.

Ocenę wpływu skojarzonej aplikacji sorafenibu z kwercetyną i lenzozydem Aβ w kontekście indukcji programowanej śmierci komórkowej w liniach komórkowych glejaka, co warto podkreślić, wykonano posiłkując się dwoma metodami analizy: metodą z użyciem mikroskopu konfokalnego i by potwierdzić wiarygodność uzyskanych wyników z obserwacji mikroskopowej, analizą wykorzystującą technikę cystometrii przepływowej.

Następnie oceniono wpływ badanych flawonoidów na mechanizmy molekularne zaangażowane w indukcję śmierci komórkowej komórek glejaka poprzez: (1) analizę ekspresji białek markerowych: apoptozy (kaspasa-3) i autofagii (beklina-1) z wykorzystaniem

metody immunoblotingu; (2) analizę potencjału błony mitochondrialnej oraz (3) analizę udziału wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania sygnału przeżycia Ras/Raf/MEK/ERK. Przy czym, co istotne w celu potwierdzenia zaangażowania wspomnianego szlaku w oporności komórek glejaka na indukcję zaprogramowanej śmierci Doktorantka stosowała blokadę ekspresji genu kodującego kinazę Raf przy użyciu specyficznych siRNA.

Przedstawione wyniki to owoc zarówno ogromu pracy laboratoryjnej jak i analiz wykorzystujących szereg skomplikowanych procedur i technik badawczych, dzięki którym są one w pełni wiarygodne i tym samym wartościowe. Wyniki są pokazane w sposób logiczny i zrozumiały i nie mam zastrzeżeń do interpretacji otrzymanych danych oraz wyciąganych na ich podstawie wniosków. Autorka słusznie zauważa, że otrzymane wyniki mogą mieć ważny aspekt praktyczny i jest potrzeba ich kontynuowania.

Dodatkowo, część wyników przedstawionych w rozprawie przeszła już naukową weryfikację i została dobrze oceniona przez recenzentów publikacji: „Lensoside Aβ as an Adjuvant to the Anti- Glioma Potential of Sorafenib" w Cancers 13(11):2637 (IF=6,639), gdzie Doktorantka jest pierwszym autorem, co świadczy o jej znaczącym udziale w powstaniu tej pracy. Publikacja w czasopiśmie, posiadającym tak wysoki współczynnik oddziaływania, świadczy o randze prowadzonych badań ich rzetelności i wpływie na badania w tej ważnej dziedzinie wiedzy.

Rozdział V – **Dyskusja**

Zwięzła dyskusja przedstawiona jest na 7 stronach maszynopisu. Całość jest zajmująca, klarowna oraz wnikliwa i czytałem ją z dużym zainteresowaniem. Podkreślenia wymaga poprawność interpretacyjna uzyskanych wyników, prezentacja swoich sugestii i opinii oraz ich konfrontacja z wynikami i wnioskami współczesnych publikacji innych autorów. Co jest ważne, Autor oceniając zebrany własny materiał dowodowy, zdaje sobie sprawę, z praktycznych implikacji własnej pracy. Jednocześnie wie, że przeprowadzone badania i analizy mają jednak charakter wstępny i mogą stanowić co najwyżej podstawę do dalszych pogłębionych już badań w celu opracowania nowych strategii terapeutycznych w zwalczaniu tej choroby nowotworowej. Jest to ważny walor recenzowanej pracy, który świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Rozdział VI – **Wnioski**

Wyniki zaprezentowanych badań, Doktorantka podsumowała w postaci ogólnych 9 wniosków. Wnioski są spójne, rzeczowe i niosą skoncentrowaną wiedzę wprost wynikającą z

przeprowadzonych badań. Pokazują również, że założony cel badania i poszczególne, szczegółowe założenia badawcze zostały zrealizowane.

Rozdział VII – **Suplement – ocena skuteczności aplikacji skojarzonej.**

W rozdziale tym, skuteczność skojarzonej dawki badanych flawonoidów, oceniono przy pomocy metody Chou-Talalay, wykorzystując program CompuSyn. Jak podaje Autorka rozprawy, metoda ta pozwala określić wskaźnik kombinacji i wskaźnik redukcji dawki dla poszczególnych wariantów aplikacji skojarzonej oraz wykreślić izobologramy, na bazie których można wybrać odpowiednie stężenie leków w terapii skojarzonej. Razem z wynikami z obserwacji mikroskopowych był on przydatny przy wyborze odpowiedniego stężenia stosowanych związków dla poszczególnych linii komórkowych glejaka.

Razdział VIII - **Bibliografia**

Cytowane Piśmiennictwo liczy 125 pozycji, jest starannie dobrane, prawie w całości angielskojęzyczne i odpowiednio wykorzystane, głównie we Wstępie i Omówieniu wyników. Cytowane pozycje są głównie publikacjami z ostatnich lat. Liczba i rok publikacji świadczy, że Autor potrafi selekcjonować najnowsze dane doświadczalne i co jest równie ważne dane polemiczne, w zależności od ich wagi dowodowej i znaczenia, co stanowi również ważny walor przyszłego naukowca.

Rozprawa doktorska napisana jest poprawnym językiem, w odpowiedniej stylistyce charakterystycznej dla tego typu prac, z użyciem poprawnej terminologii naukowej, bez większych błędów interpunkcyjnych i edytorskich.

Pod względem merytorycznym, metodologicznym i warsztatowym praca zasługuje na jednoznaczną bardzo pozytywną opinię.

Podsumowując stwierdzam, że po lekturze Dysertacji pt. „ Kwercetyna i lenzozyd Aβ jako adiuwanty sorafenibu w indukcji programowanej śmierci ludzkich komórek glejaka", wykonanej przez mgr Aleksandrę Maciejczyk z Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, pod kierunkiem dr hab. Joanny Jakubowicz-Gil, prof. UMCS, uzyskane wyniki są spójne i ważne dla problematyki badawczej dotyczącej opracowaniu nowych leków i strategii terapeutycznej w leczeniu nowotworowym glejaków.

Doktorantka potrafi samodzielnie sformułować i rozwiązać problem naukowy, odpowiednio dobierając techniki badawcze, pozwalające uzyskać wyniki na dobrym naukowym poziomie. Udowodniła również, że potrafi przeprowadzić rzeczową, fachową

dyskusję swoich wyników z wynikami innych grup badawczych i że sprawnie porusza się w zagadnieniach ogólnie związanych z tematem leczenia chorób nowotworowych.

Wobec powyższego, stwierdzam, że oceniana Rozprawa doktorska spełnia kryteria Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule naukowym, przypisane pracom na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

I w związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Maciejczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 02.08.2023r

KIEROWNIK
ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
I BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOŚCI
Raszewski
dr hab. n. o zdr. Grzegorz Raszewski