



dr hab. Izabella Rząd, prof. US
Instytut Nauk o Morzu i Środowisku
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytet Szczeciński
ul. Wąska 13, 71-415 Szczecin
tel. 91 444 16 80
e-mail: Izabella.Rzad@usz.edu.pl

Szczecin, 16 sierpnia 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Donaty Simińskiej

pt. „Ekspresja receptorów zależnych od hormonów płciowych w glejaku wielopostaciowym”

Mechanizmy powstawania glejaków i przyczyny ich tworzenia się są poznane w niewystarczającym stopniu, jak również wiedza o szlakach molekularnych prowadzących do powstawania poszczególnych typów tych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego jest niepełna. Wiadomo, że występowanie glejaka nie jest jednakowe u kobiet i u mężczyzn, dlatego ekspresja receptorów zależnych od hormonów płciowych jest istotnym zagadnieniem, które wymaga jak najpełniejszego wyjaśnienia za pomocą najnowszych metod stosowanych w medycynie. Temat podjęty w recenzowanej rozprawie doktorskiej, polegający na określeniu ekspresji receptorów zależnych od hormonów płciowych w glejaku wielopostaciowym uważam za ważny.

Rozprawa doktorska przedstawiona na 155 stronach ma typowy układ, z poszczególnymi rozdziałami: wstęp, cel pracy, część doświadczalna, w tym: model badawczy, materiał badań i metody badawcze, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo i streszczenie. Pomędzy poszczególnymi częściami pracy są zachowane właściwe proporcje. Praca zawiera cztery tabele i 26 rycin. Wykaz skrótów na stronach od trzeciej do dziewiątej zawiera wyjaśnienia poszczególnych terminów w języku polskim, a także angielskie określenia. Wykaz ten jest starannie przygotowany i pomocny w analizie merytorycznej pracy. Na rozdział „Wstęp teoretyczny” składają się 3 podrozdziały: 1) Glejak, 2) Receptory zależne od hormonów płciowych i 3) Przesłanki do podjęcia pracy. W podrozdziale „Glejaki” Doktorantka przedstawiła etiologię i epidemiologię guzów glejowych oraz klasyfikację guzów ośrodkowego układu nerwowego z wyszczególnieniem klasyfikacji guzów glejowych. Opisała także czynniki antropometryczne, takie jak: płeć, wiek, wzrost, masa ciała i ra-

sa/pochodzenie etniczne, oraz czynniki środowiskowe, takie jak: promieniowanie jonizujące, alkohol, palenie papierosów, uraz głowy, picie kawy i herbaty, telefony komórkowe, sen, leki, w stosunku do których prowadzone były lub są prowadzone współcześnie badania dotyczące ich potencjalnego związku z rozwojem glejaka. W dalszej części Doktorantka opisała obraz kliniczny pacjenta z glejakiem, w tym także problemy diagnostyczne oraz postępy w leczeniu. Kolejne zagadnienie teoretyczne na temat budowy niszy nowotworowej glejaka wielopostaciowego, zawierający siedem zagadnień i jedną ilustrację zasługuje na szczególne docenienie, ponieważ bardzo szczegółowo i klarownie Doktorantka przedstawia budowę i metabolizm tego nowotworu. Podrozdział „Receptory zależne od hormonów płciowych” przedstawia opis budowy i funkcji receptorów, z którymi łączą się hormony płciowe. Są to: receptor androgenowy, receptor estrogenowy alfa i estrogenowy beta, receptor progesteronowy, receptor prolaktynowy i folikulotropowy. Różnice w występowaniu glejaków między kobietami i mężczyznami, a także między kobietami w okresie przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym sugerują ścisły związek receptorów dla hormonów ze zmianami w biologii komórek glejaka, w różnych obszarach guza, co było ważną przesłanką do podjęcia badań prezentowanych w rozprawie doktorskiej. Doktorantka słusznie zauważa, iż zachodzi potrzeba badań pozwalających określić różnice w ekspresji receptorów dla hormonów płciowych między różnymi obszarami guza. Konieczne jest więc prowadzenie badań w tym kierunku. Cały rozdział „Wstęp teoretyczny” jest bardzo dobrze napisany pod względem naukowym i świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzonych badań naukowych. Przegląd wiedzy w tym rozdziale jest rzetelny i wyczerpująco omawia dotychczasowe odkrycia naukowe dotyczące przedmiotu badań, co dowodzi, że oceniana rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauk medycznych.

Celem badań prowadzonych przez Doktorantkę było określenie ekspresji receptorów zależnych od hormonów płciowych w strukturach guza, Doktorantka sprawdzała także wpływ warunków panujących w guzie na ekspresję receptorów zależnych od hormonów płciowych *in vitro*. Cel ten oceniam pozytywnie, ponieważ jest on wyrazem aktualnych trendów wiedzy medycznej, a jego realizacja poprzez badania podjęte przez Doktorantkę zdecydowanie pogłębia poznanie mechanizmów ekspresji receptorów zależnych od hor-

monów płciowych w glejaku wielopostaciowym. Cele główne Doktorantka realizowała poprzez trzy jasno sprecyzowane cele szczegółowe. Cel pierwszy to sprawdzenie ekspresji genów i białek oraz lokalizacji komórkowej białek receptorów zależnych od hormonów płciowych w rdzeniu guza, korze guza i w obrzeżu guza. Cel drugi to sprawdzenie różnic w ekspresji genów i białek receptorów zależnych od hormonów płciowych między kobietami i mężczyznami. Trzecim celem było sprawdzenie ekspresji genów i białek oraz lokalizacji komórkowej białek receptorów zależnych od hormonów płciowych w modelu in vitro w warunkach nekrozy, hipoksji i niedoboru składników odżywczych w guzie.

Część doświadczalna zawiera obszerny, a zarazem szczegółowy opis modelu, materiału i metod badawczych. Doktorantka zastosowała dwa modele badawcze, w tym pierwszy z wykorzystaniem materiału pochodzącego z różnych struktur guza od pacjentów, i drugi model in vitro w formie hodowli komórkowej. Zastosowanie dwóch modeli badawczych jest jak najbardziej uzasadnione, ponieważ miały one służyć rozwiązaniu różnych problemów badawczych. Zastosowanie materiału od pacjentów miało przyczynić się do wykazania różnic w ekspresji receptorów płciowych pomiędzy różnymi strukturami guza zarówno na poziomie genu jak i białka, a zastosowanie hodowli komórkowych miało na celu sprawdzenie czy analizowane czynniki wpływają na ekspresję badanych receptorów. Charakterystyka grupy pacjentów oraz skład pożywek hodowlanych są przedstawione w postaci dwóch tabel. Doktorantka do realizacji założonych celów wykonała analizę ekspresji genów receptorów zależnych od hormonów płciowych metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym oraz analizy przy użyciu testów immunoenzymatycznych i analizy metodą immunohistochemii. Zastosowała mikroskopię konfokalną do wizualizacji wyników i analizę statystyczną do ich opracowania. Metody te są zgodne z obowiązującą wiedzą medyczną i biologiczną oraz uważam, że są dobrze dobrane przez Doktorantkę do realizacji celów pracy, oceniam je pozytywnie.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę są interesujące i mają dużą wartość praktyczną. Wyniki są adekwatne do założonych celów badań. Doktorantka zaprezentowała wyniki dotyczące poszczególnych receptorów, kolejno opisała receptor androgenowy, receptory estrogenowe: receptor estrogenowy alfa i receptor estrogenowy beta, receptor progesteronowy, receptor prolaktynowy i receptor folikulotropowy. Badania wykazały wzrost eks-

presji białek receptora androgenowego, receptora estrogenowego beta i receptora progesteronowego w obrzeżu guza w porównaniu z jego rdzeniem oraz wzrost białka receptora progesteronowego w porównaniu z korą guza. W korze guza nastąpił wzrost ekspresji białka receptora androgenowego i mRNA receptora estrogenowego beta. Ekspresja receptorów zależnych od hormonów płciowych w różnych obszarach guza była zróżnicowana między kobietami i mężczyznami. W materiale pobranym od kobiet nastąpił wzrost ekspresji białka receptora androgenowego i receptora estrogenowego beta w obrzeżu guza w porównaniu z jego rdzeniem. W materiale pobranym od mężczyzn nastąpił wzrost mRNA receptora estrogenowego beta w korze guza, w porównaniu z jego rdzeniem. W guzach pozyskanych od mężczyzn nastąpił wzrost ekspresji białek receptora prolaktynowego w porównaniu do guzów pozyskanych od kobiet, u których takiego wzrostu nie zaobserwowano. Badania nie wykazały różnic w ekspresji receptora prolaktynowego, receptora estrogenowego alfa i receptora hormonu folikulotropowego w poszczególnych strukturach guza. Nie zaobserwowano także różnic między ekspresją receptora estrogenowego alfa i receptora hormonu folikulotropowego u kobiet i u mężczyzn. Niedobór składników odżywczych spowodował wzrost ekspresji mRNA receptora androgenowego i spadek ekspresji mRNA receptora estrogenowego beta. Przy hipoksji zaobserwowano spadek ekspresji mRNA receptora androgenowego, receptora estrogenowego beta i receptora prolaktynowego oraz wzrost ekspresji mRNA receptora estrogenowego alfa. Nie zaobserwowano zmian w ekspresji badanych receptorów po stworzeniu warunków nekrotycznych. Opisy poszczególnych wyników badań są zilustrowane 24 rycinami, w tym wykresami przedstawiającymi różnice w ekspresji receptorów w analizie statystycznej, fotografiami wykonanymi z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej oraz mikrofotografiami ilustrującymi badania immunohistochemiczne. Na docenienie zasługuje duży wkład pracy Doktorantki włożony w uzyskanie wyników badań i klarowne przedstawienie ich w różnych podrozdziałach, wynikających z zastosowanych modeli i metod badawczych. Bardzo ciekawy i użyteczny merytorycznie jest rozdział „Podsumowanie wyników” wraz z tabelami o numerach trzy i cztery, w których Doktorantka zawarła podsumowanie ekspresji mRNA i białek receptorów zależnych od hormonów płciowych za pomocą strzałek w górę („↑”) i w dół („↓”) obrazujących spadek lub wzrost ekspresji.

Opis badań podjętych przez Doktorantkę i uzyskane wyniki wskazują, że posiada ona umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. W kolejnym rozdziale „Dyskusja” Doktorantka zdecydowanie potwierdza słuszność tego stwierdzenia. Dyskusja zawiera omówienie wyników w bardzo uporządkowanej formie dzięki podziałowi na 11 zagadnień, którymi są opisy poszczególnych receptorów w modelu *in vitro* i w guzach pobranych od pacjentów. Doktorantka wskazuje, iż zagadnienie podjęte przez nią w pracy doktorskiej leżą w kręgu zainteresowań wielu badaczy. Do przedyskutowania poszczególnych zagadnień posłużyło Doktorantce blisko sto pozycji literaturowych. Na uwagę zasługuje odnotowany w badaniach Doktorantki spadek ekspresji mRNA receptora estrogenowego beta w warunkach hipoksji i warunkach niedoboru składników odżywczych jest przeciwny wynikom literaturowym. Część dyskusji tego zagadnienia, w której przytoczono informacje o różnicy w protokole wywołania niedotlenienia, jak i część, w której Doktorantka podjęła próbę wyjaśnienia niezgodności uzyskanych wyników w zakresie wpływu warunków stresu na ekspresję receptora estrogenowego beta są bardzo ciekawie opisane. Oprócz przeanalizowania i przedyskutowania podobieństw i różnic uzyskanych wyników z wynikami innych Autorów, Doktorantka wskazuje dodatkowe możliwości poszerzenia badań dotyczących ekspresji badanych receptorów, na przykład pisząc, że analizy opisywane w zagadnieniu „*Receptor progesteronowy w modelu in vitro*” należałoby powtórzyć, stosując dłuższy czas inkubacji komórek, ponieważ mogłoby to mieć wpływ na zmiany w ekspresji tego receptora. Wszystkie wyniki badań uważam za prawidłowo i wyczerpująco przedyskutowane.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań są sformułowane w postaci siedmiu punktów. Uważam, że w większej części, to jest punkty od pierwszego do piątego, stanowią one podsumowanie badań, a w mniejszej, czyli punkty szósty i siódmy są właściwymi wnioskami. Liczba wniosków powinna być moim zdaniem zredukowana do dwóch lub trzech sentencji opisujących najważniejsze rezultaty wynikające z badań.

Rozdział Piśmiennictwo zawiera aż 425 pozycji ponumerowanych według kolejności cytowania w pracy. Piśmiennictwo jest prawidłowo dobrane i dostosowane do treści poszczególnych rozdziałów pracy. Na tle cytowanej literatury specjalistycznej wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę wnoszą nową wiedzę na temat ekspresji recep-

torów zależnych od hormonów płciowych w glejaku wielopostaciowym. Piśmiennictwo zastosowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej oceniam pozytywnie. Osiągnięciem Doktorantki wynikającym z przeprowadzonych badań jest wykazanie, że w różnych strefach glejaka wielopostaciowego ekspresja receptorów zależnych od hormonów płciowych jest zróżnicowana oraz że w warunkach *in vitro* hipoksja i niedobór składników odżywczych w guzie mają wpływ na zmiany w ekspresji receptorów zależnych od hormonów płciowych. Tym samym Doktorantka dostarczyła nowych dowodów na związek między cechami glejaka wielopostaciowego a ekspresją receptorów zależnych od hormonów płciowych, zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn. Uzyskane wyniki badań mogą mieć praktyczne zastosowanie w prowadzeniu badań klinicznych glejaka wielopostaciowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera spis tabel, spis rycin, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim (summary), spis załączników oraz dwa załączniki dokumentujące proces badawczy i świadczące o rzetelności wykonanych badań. Są to: Załącznik numer 1, pozytywna opinia Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie z dnia 9 marca 2020 roku między innymi dotycząca rozszerzenia projektu „Udział receptorów dla nukleotydów w progresji glejaków” o badanie „Ekspresja receptorów zależnych od hormonów płciowych w glejakach o różnej etiologii” oraz dotycząca dołączenia mgr Donaty Simińskiej do zespołu badawczego, Załącznik numer 2, ankieta o udziale receptorów dla nukleotydów w progresji glejaków. W rozdziale „Materiał i metody” Doktorantka zamieściła wyjaśnienie, iż Załącznik numer 2 jest ankietą dotyczącą stanu zdrowia pacjenta.

Uwagi do pracy:

1. Cel główny i cele szczegółowe przedstawione w postaci hipotez i proces ich testowania za pomocą analizy statystycznej byłyby cennym uzupełnieniem pracy, a szczególnie prezentacji wyników i wniosków.
2. Charakterystyka badanej grupy pacjentów (Tabela 1 na stronie 44) nie przedstawia wszystkich informacji uzyskanych za pomocą ankiety (Załącznik 2 na stronach 153-155).
3. W wykazie skrótów brakuje wyjaśnienia symbolu ER β

4. Część doświadczalna zawiera jedno odniesienie do trzech pozycji piśmiennictwa, dotyczące wyboru genu referencyjnego. Doktorantka nie przytacza żadnej literatury, z której korzystała przygotowując do rozprawy doktorskiej opisy modelu badawczego, materiału badanego i metod badawczych. Opis części doświadczalnej powinien zawierać odniesienia do pozycji literatury, w których opisano wcześniej standardowe procedury badawcze.
5. Rozdział „Podsumowanie wyników” stanowi w rzeczywistości część dyskusji i powinien być przesunięty do rozdziału Dyskusja.
6. Brak objaśnienia symboli strzałek oraz symbolu równości („=”) w tabeli 3 i tabeli 4 na stronach 76-77, powinna zostać załączona legenda.

Powyższe uwagi nie umniejszają w żaden sposób wartości merytorycznej pracy. Przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską oceniam w całości pozytywnie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego, polegającego na określeniu ekspresji receptorów zależnych od hormonów płciowych w poszczególnych strukturach guza glejaka, a także sprawdzeniu wpływu warunków panujących w guzie na ekspresję badanych receptorów *in vitro*.

Rozprawa odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. z 2017 r, poz. 1789 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Wydziału Medycyny i Stomatologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego (PUM) w Szczecinie o dopuszczenie Pani magister Donaty Simińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zgłaszam wniosek o wyróżnienie rozprawy *summa cum laude*, ponieważ została ona częściowo opublikowana w czasopiśmie z listy Filadelfijskiej w artykule: Simińska D. et al. Androgen Reception Ekspresion in the Various Regions of Resected Glioblastoma Multiforme tumors and in an In Vitro Model. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 13004 (140 punktów MEN, impact factor 5.6). Przegląd literatury został opublikowany w artykule: Simińska et al. Epidemiology of Anthropometric Factors in Glioblas-



UNIWERSYTET SZCZECIŃSKI
**INSTYTUT NAUK O MORZU
I ŚRODOWISKU**

toma Multiforme – Literature Review. *Brain Sciences* 2021, 11, 116 (100 punktów MEN, impact factor 3.3). W obu artykułach Pani mgr Donata Simińska jest pierwszym autorem.

Szczecin, 16 sierpnia 2023

dr hab. Izabella Rząd, prof. US