

## **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Donaty Simińskiej**

### **pt.: „EKSPRESJA RECEPTORÓW ZALEŻNYCH OD HORMONÓW PŁCIOWYCH W GLEJAKU WIELOPOSTACIOWYM”**

Podstawą niniejszej recenzji jest rozprawa doktorska Pani mgr Donaty Simińskiej, wykonana w Zakładzie Biochemii Katedry Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. n. med. Ireny Baranowskiej-Bosiackiej oraz Pani dr n. med. Patrycji Kupnickiej, pełniącej funkcję promotora pomocniczego. Przewodnim tematem przedłożonej do oceny dysertacji jest określenie zmian w ekspresji receptorów hormonalnych w poszczególnych strukturach glejaka wielopostaciowego, a tym samym określenie ich roli w procesie nowotworzenia i progresji glejaka wielopostaciowego, a także sprawdzenie wpływu warunków panujących w mikrośrodkowisku guza na ekspresję tychże receptorów w warunkach *in vitro*.

Wywodzący się z linii astrocytarnej, glejak wielopostaciowy (ang. *glioblastoma multiforme* GBM) jest jednym z najczęściej występujących guzów pierwotnych mózgu, a także jednym z najbardziej agresywnych i złośliwych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. Rokowanie u chorych na GBM pozostaje złe. To choroba praktycznie nieuleczalna, która wciąż stanowi istotny problem kliniczny. Mimo postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w dziedzinie onkologii, wyniki leczenia złośliwych nowotworów mózgu pozostają niezadawalające, stanowiąc jedno z najważniejszych wyzwań dla współczesnej medycyny i nauki. Pomimo licznie prowadzonych badań dotyczących GBM, wiedza o szlakach molekularnych i mechanizmach prowadzących do transformacji prawidłowych komórek gleju w złośliwe komórki glejaka jest wciąż niewystarczająca. Postępy w poznawaniu mechanizmów transformacji nowotworowej wskazują na istotną, proonkogenną rolę hormonów w procesie karcynogenezy przez ich wpływ na wzrost i proliferację komórkową, różnicowanie, apoptozę i angiogenezę. Szczególnie interesującym wydaje się udział receptorów zależnych od hormonów płciowych w zmiany biologii komórek glejaka. Receptory zależne od hormonów płciowych pełnią bowiem istotną rolę w progresji wielu nowotworów, w tym regulują szlaki indukujące proliferację i migrację komórek GBM. Za udziałem jądrowych receptorów zależnych od hormonów płciowych w mechanizmach transformacji nowotworowej komórek gleju w glejaka przemawia również fakt, iż częstość występowania większości typów histologicznych glejaka, w tym GBM, różni się istotnie pomiędzy płciami. Znacznie częściej na GBM chorują mężczyźni, a kobiety w wieku przedmenopauzalnym charakteryzują się wyższą przeżywalnością w stosunku do kobiet w wieku pomenopauzalnym, czy mężczyzn. Dotychczas prowadzone badania nad receptorami hormonalnymi w glejaku dotyczyły linii komórkowych oraz tkanek pochodzących od

pacjentów lub zwierząt laboratoryjnych. Jednakże wysoki stopień proliferacji, naciekający charakter i znaczna heterogeniczność między- i wewnątrzkomórkowa guza, zmienność mikrośrodowiska guza wskazuje na konieczność prowadzenia badań, które pozwolą określić różnice pomiędzy ekspresją jądrowych receptorów hormonów płciowych w poszczególnych regionach guza. Badania na tkankach traktują guz jako całość, natomiast hodowle komórkowe nie oddają różnorodności i przestrzennej zmienności komórkowej i zmienności mikrośrodowiska guza, wywołanej dostępem do substancji odżywczych i tlenu.

Mając na uwadze powyższe dane, zasadnym jest podjęte przez Doktorantkę zagadnienie mające na celu wykazanie potencjalnego udziału jądrowych receptorów zależnych od hormonów płciowych w progresji glejaka wielopostaciowego, poprzez określenie ekspresji tychże receptorów w poszczególnych strukturach guza GBM, a także sprawdzenie wpływu warunków panujących w guzie na ich ekspresję w warunkach *in vitro*. Szczegółowe cele postawione przez Doktorantkę, obejmujące min.: 1] sprawdzenie ekspresji na poziomie mRNA i białka oraz lokalizacji komórkowej białek receptorów zależnych od hormonów płciowych, w tym: receptora androgenowego (AR), progesteronowego (PGR), estrogenowego  $\alpha$  i  $\beta$  ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ), prolaktynowego (PRLR) i folikulotropowego (FSHR) w poszczególnych strukturach guza (rdzeń, kora, obrzeże guza); 2] sprawdzenie wpływu płci na różnice w ekspresji oraz lokalizacji komórkowej analizowanych białek receptorów zależnych od hormonów płciowych w poszczególnych strukturach guza (rdzeń, kora, obrzeże guza), a także 3] sprawdzenie ekspresji genów i białek oraz lokalizacji komórkowej analizowanych białek receptorów zależnych od hormonów płciowych (AR,  $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ , PGR, PRLR, FSHR) w różnych warunkach występujących w guzie (warunki nekrozy, hipoksji i niedoboru składników odżywczych) w modelu *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórek glioblastoma astrocytoma (U87) decydują o nowatorskim charakterze badań jak również o ich wysokim walorze poznawczym. Wykazanie potencjalnych relacji: zmiana ekspresji receptora zależnego od hormonów płciowych - struktura guza GBM - płeć, z jednoczesnym uwzględnieniem specyficznych warunków panujących w obrębie guza nowotworowego (tj.: hipoksja, stan niedoboru składników odżywczych, nekroza) może prowadzić do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów leżących u podstaw onkogenezy, tym samym umożliwiając opracowanie nowych, skutecznych terapii i potencjalnych leków.

Przedstawiona do oceny Rozprawa ma typowy układ, na który składają się: Wstęp, Cel pracy, Opis części doświadczalnej, obejmujący model badawczy i badany materiał jak również stosowane metody badawcze, Prezentacja i omówienie wyników, Wnioski, obszernie Piśmiennictwo, liczące 425 pozycji literaturowych, Spis tabel i rycin, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Spis załączników wraz z załączoną opinią komisji bioetycznej i wzorem ankiety dla pacjenta. Całość liczy 155 stron. Pomiędzy poszczególnymi częściami pracy zostały zachowane właściwe proporcje.

Tematyka pracy doktorskiej jest bardzo aktualna a tytuł sformułowany został jasno i precyzyjnie; odpowiada w pełni tematyce przedstawionych badań.

Wstęp to obszerny i niezwykle wartościowy kompendium wiedzy dotyczące glejaków, wprowadzające czytelnika w złożoność analizowanego zagadnienia oraz przedstawiające zasadność wybranej tematyki. We wstępie Doktorantka przedstawia klasyfikację guzów OUN z wyszczególnieniem klasyfikacji guzów glejowych, podaje dane epidemiologiczne dotyczące

guzów glejowych, nakreśla ich etiologię, wymieniając potencjalne czynniki zarówno antropometryczne jak również środowiskowe, które mogą mieć wpływ na częstość zachorowania na glejaka. Przeprowadzona przez Doktorantkę wnikliwa analiza danych literaturowych dowodzi, że GBM jest najbardziej złośliwym pierwotnym guzem mózgu, który zdecydowanie częściej występuje u mężczyzn i osób otyłych. Ryzyko zachorowania na GBM zwiększa się wraz z wiekiem i wzrostem. Pomimo niepokojącego trendu dotyczącego zachorowalności na GBM, niestety w dalszym ciągu trudno bezpośrednio ustalić przyczyny jego występowania. Ze względu na znaczące różnice w metodologii raportów epidemiologicznych, dostępne dane nie pozwalają jednoznacznie określić, jaki wpływ na rozwój glejaka ma na przykład stosowanie używek, niektórych leków (np. NLPZ), stosowanie telefonów komórkowych czy narażenie na promieniowanie jonizujące; wskazując na konieczność prowadzenia dalszych badań w tym zakresie. W dalszej części wstępu Doktorantka prezentuje obraz kliniczny pacjenta z glejakiem, dokonuje wnikliwej i bardzo dokładnej charakterystyki poszczególnych regionów glejaka wielopostaciowego, opisując w szczególności sposób zawilość zmian biochemicznych i metabolicznych które zachodzą w poszczególnych strukturach guza GBM podkreślając heterogeniczność między- i wewnątrznowotworową oraz zmienność i złożoność mikrośrodowiska guza nowotworowego. Kolejny podrozdział wstępu to wnikliwy opis receptorów zależnych od hormonów płciowych. Bardzo szczegółowy przegląd obszernej i wartościowej literatury przedmiotu dowodzi bardzo dobrej znajomości podjętej przez Doktorantkę tematyki badawczej, jak również znajomości aktualnego stanu wiedzy, dotyczącego analizowanego przez Doktorantkę zagadnienia.

Przesłanki do podjęcia badań, jak również cel pracy, obejmujący trzypunktowe cele szczegółowe zostały jasno i precyzyjnie sformułowane.

Rozdział „Część doświadczalna” zawiera dokładny opis zastosowanego modelu badawczego *in vitro* i wykorzystanego do badań materiału biologicznego, który stanowiły guzy nowotworowe pobrane od 28 pacjentów (16 mężczyzn i 12 kobiet) ze zdiagnozowanym GBM. Dzięki metodzie neuronawigacji podczas operacji możliwe było precyzyjne wydzielenie i pobranie do badań materiału pochodzącego z 3 stref morfologicznych guza GBM: niewzrastającego rdzenia guza, obejmującego głównie obszar martwicy, rozrastającej się strefy guza czyli kory guza, oraz obrzeża guza - niszy inwazyjnej guza. Ponadto, do badań wykorzystano linię ludzkich komórek glejaka (glioblastoma astrocytoma, linia U87), poddanych warunkom nekrozy, hipoksji i niedoboru składników odżywczych w celu sprawdzenia wpływu wybranych czynników występujących przy wzroście guza na biologię tej linii komórek glejaka i ekspresję analizowanych receptorów w tej linii.

Zarówno charakterystyka materiału do badań, jak również zastosowana metodyka badań mających na celu analizę ekspresji na poziomie zarówno genu jak i białka jądrowych receptorów zależnych od hormonów płciowych *AR*, *PGR*, *ESR1*, *ESR2*, *PRLR* i *FSHR* w poszczególnych strukturach glejaka GBM i komórkach linii U87 poddanych działaniu nekrozy, hipoksji i niedoboru składników odżywczych (reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR), testy immunoenzymatyczne ELISA), jak również wizualizacja obecności i lokalizacji białek receptorów płciowych w komórkach linii U87 za pomocą mikroskopii konfokalnej i metodologii immunohistochemicznej (tkanki guza pochodzące od pacjentów) oraz statystyczne opracowanie wyników nie budzą zastrzeżeń.

Metody badawcze zastosowane przez Doktorantkę są właściwe i nowoczesne a zastosowane testy statystyczne gwarantują prawidłowe wnioskowanie statystyczne. Cała metodologia wskazuje na staranność przeprowadzonych badań.

W dalszej części dysertacji Doktorantka prezentuje otrzymane wyniki badań w formie pięciu podrozdziałów, każdy poświęcony omówieniu zmian w ekspresji odpowiednio receptora androgenowego, estrogenowego  $\alpha$  i  $\beta$ , progesteronowego, prolaktynowego i folikulotropowego w modelu *in vitro*, w warunkach panujących w mikrośrodkowisku guza oraz w poszczególnych regionach guza (niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego). Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wnoszą nowe i cenne dane, z których możemy wnioskować, iż warunki panujące w guzie GBM (hipoksja i niedobór składników odżywczych) są czynnikami, które wywierają wpływ na zmiany w ekspresji badanych receptorów w warunkach *in vitro* (warunki niedoboru składników odżywczych wywołały wzrost ekspresji mRNA *AR* i spadek ekspresji mRNA *ER $\beta$* . Warunki hipoksji spowodowały zaś spadek ekspresji mRNA *AR*, *ER $\beta$* , *PRLR* i wzrost ekspresji mRNA *ER $\alpha$* ). Z kolei analiza ekspresji badanych receptorów w poszczególnych regionach glejaka wykazała, iż w obrzeżu guza GBM zaobserwowano wzrost ekspresji białek *AR*, *ER $\beta$* , *PGR* w stosunku do hipoksyjnego i pozbawionego składników odżywczych rdzenia guza, a także wzrost białka *PGR* w stosunku do strefy guza rosnącego. W korze guza zauważono natomiast wzrost białka *AR* i mRNA *ER $\beta$*  w stosunku do rdzenia guza. Po uwzględnieniu podziału na płeć w analizach zaobserwowano, że guzy pochodzące od kobiet charakteryzowały się wzrostem białek *AR*, *ER $\beta$*  w obrzeżu guza w stosunku do rdzenia guza. Guzy pozyskane od mężczyzn cechowały się natomiast wzrostem mRNA *ER $\beta$*  w korze guza w stosunku do rdzenia guza. Zauważono również, że guzy mężczyzn charakteryzowały się wzrostem białka *PRLR* w rdzeniu w stosunku do guzów kobiet. Stwierdzone zmiany w ekspresji badanych receptorów hormonów płciowych u kobiet i mężczyzn mogą przemawiać za ich udziałem w zmianie biologii komórek glejaka wielopostaciowego, jednakże nie są wystarczające aby jednoznacznie określić ich rolę w progresji glejaka GBM.

Kolejny rozdział rozprawy to wnikliwa, obszerna (licząca 19 stron) i krytyczna dyskusja otrzymanych wyników z danymi literaturowymi. Bardzo szczegółowy przegląd obszernej i wartościowej literatury przedmiotu, wnikliwy opis mechanizmów aktywacji analizowanych receptorów w nowotworzeniu, zależności lokalizacji białka receptora w komórce od stopnia złośliwości guza glejowego, rola analizowanych receptorów w mechanizmach patofizjologicznych w tym ich rola w rozwoju i progresji GBM, wpływ szlaków sygnałowych receptorów na możliwości proliferacyjne, migracyjne i inwazyjne komórek GBM, udział w metabolizmie energetycznym komórek gleju, konsekwencje molekularne i zmiany biochemiczne w komórkach nowotworów indukowane przez receptory zależne od hormonów płciowych świadczą o znakomitej znajomości analizowanego przez Doktorantkę zagadnienia a także dowodzi niezwykłej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Zaprezentowane przez Doktorantkę rezultaty badań oraz wynikające z nich wnioski zostały poprawnie sformułowane i stanowią przejrzystą odpowiedź na założone cele.

Przedłożona do oceny dysertacja dowodzi bardzo dobrej znajomości warsztatu badawczego, olbrzymiego wkładu pracy i umiejętności interpretacyjnych niezbędnych do uzyskania założonych celów. Na uwagę zasługuje fakt, iż wyniki badań Doktorantki zostały

opublikowane w czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku oddziaływania (Simińska et al. Androgen Receptor Expression in the Various Regions of Resected Glioblastoma Multiforme Tumors and in an In Vitro Model. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 13004). Wysokie wskaźniki bibliometryczne (**IF 5,6** oraz **liczba punktów ministerialnych 140**) dowodzą wysokiej wartości merytorycznej pracy, jak również aktualności podjętej przez Doktorantkę tematyki badawczej. W powyższej pracy Pani mgr Donata Simińska ma wiodący wkład w jej powstanie (jest pierwszym autorem).

Reasumując, całość rozprawy Pani mgr Donaty Simińskiej oceniam bardzo dobrze. Praca została właściwie zaplanowana, bardzo dobrze wykonana, a uzyskane wyniki dowodzą, iż patofizjologia GBM ma bardzo złożony charakter i do dnia dzisiejszego nie wszystkie jej aspekty są do końca poznane. Przedstawiona do oceny dysertacja to cenne i wartościowe źródło wiedzy, dostarczające ważnych danych, które mogą okazać się pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmów onkogenezy. Podjęte przez Doktorantkę badania to bardzo wartościowe studium o walorach poznawczych i edukacyjnych, stanowiące ważny punkt wyjścia do dalszych analiz. Wydaje się, że aby lepiej zrozumieć mechanizmy prowadzące do rozwoju GBM zasadne jest prowadzenie dalszych badań na izolowanych pojedynczych strukturach nowotworu.

**Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania określone Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce tj. Dz. U. 2023, poz. 742. 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 mgr Donaty Simińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Biorąc pod uwagę duży aspekt poznawczy i edukacyjny pracy jak również nowatorski charakter prezentowanych przez Doktorantkę badań wnioskuję o wyróżnienie *summa cum laude* recenzowanej pracy.**

Z poważaniem,

Dr hab. n. med. Magdalena Gąssowska-Dobrowolska

