

**Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego**

Imię i nazwisko kandydata: Mgr Elżbieta Fiedor

Tytuł rozprawy doktorskiej: " Określenie wpływu selektywnych blokerów receptora leptyny na wybrane parametry nowotworu jajnika"

Promotor: Prof. dr hab. Ewa Łucja Gregoraszczyk

Recenzent: Prof. dr hab. nauk med. Anna Gasińska

.....

**1. Wartość naukowa rozprawy
 a. Oryginalność badań**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Elżbiety Fiedor jest opracowaniem, które należy ocenić zdecydowanie pozytywnie. Praca opiera się na przemyślanym i bardzo dobrze zaplanowanym i wykonanym cyklu doświadczeń. Temat podjęty przez Autorkę jest ważny, bardzo aktualny i jest typowym przykładem badań translacyjnych, których wnioski mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu nowotworów złośliwych. Podam dwa powody, dla których z terapeutycznego punktu widzenia wybór tematu pracy był słuszny: (1) model eksperymentalny – nowotwór jajnika należy do najbardziej opornych na leczenie konwencjonalne nowotworów złośliwych u kobiet, do czego przyczynia się stosunkowo słaba znajomość biologii tego nowotworu (2) obecnie dostępne metody terapii nie są zadowalające i potwierdzają, że poszukiwanie czynników wspomagających leczenie jest wyzwaniem dla współczesnej onkologii.

Stymulująca rola leptyny w onkogenezie nowotworów jajnika nie jest dobrze poznana. Wiadomo, że leptyna odgrywa dużą rolę w onkogenezie, stymulując proliferację, angiogenezę i rozwój nowotworu. Jednak ścieżki sygnalizacyjne wiodące przez różne receptory leptyny, jak też inhibitory receptorów leptyny nie są dobrze poznane i nie są rutynowo stosowane w praktyce klinicznej. Procesy epigenetyczne (takie jak acetylacja czy deacetylacja histonów) stanowiące epigenetyczny mechanizm kontroli ekspresji genów są ważne nie tylko z punktu widzenia naukowego, ale też ze względu na możliwości ich wykorzystania w leczeniu nowotworów. W niektórych typach nowotworów zmiany epigenetyczne są już wykorzystywane jako markery biologiczne służące do wykrywania i rozpoznawania nowotworów w najwcześniejszym stadium oraz dla dokładnej analizy ryzyka wystąpienia nowotworów u poszczególnych osób. Jednymi z enzymów odpowiedzialnych za te zmiany są deacetylazy histonów (HDAC), które obniżają poziom acetylacji. Nadekspresja HDAC jest powszechnym zjawiskiem w komórkach nowotworowych. Dlatego nie dziwi zainteresowanie Doktorantki tym zagadnieniem ponieważ analiza inhibitorów HDAC może mieć duże znaczenie w opracowywaniu leków przeciwnowotworowych. Brak jest obecnie badań dotyczących możliwości zastosowania antagonistów receptora leptyny w przypadku nowotworów jajnika wywodzących się zarówno z warstwy nabłonkowej, jak i ziarnistej nabłonka.

Doktorantka, już w 2016 roku jako pierwsza opisała molekularny mechanizm działania superaktywnego antagonisty receptora leptyny, w pierwszej publikacji zamieszczonej w rozprawie, czym zapoczątkowała stawianie kolejnych hipotez badawczych, przedstawionych w kolejnych publikacjach.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artyków

Wyniki dysertacji zostały opisane w sposób przejrzysty w trzech publikacjach, które ukazały się w trzech renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (IF=2,801, IF=2,801, oraz IF=2,432). We wszystkich pracach Autorka jest pierwszym autorem, z procentowym udziałem odpowiednio 80 %, 80 % i 70 %. Celem pracy było (1) sprawdzenie wpływu leptyny i antagonistów jej receptora na żywotność komórek, poziom ekspresji genów i białek związanych z cyklem komórkowym oraz białek ścieżek sygnalizacyjnych uruchamianych przez leptynę w komórkach linii nowotworowych wywodzących się z warstwy nabłonkowej jajnika (publikacja 1 i 2 załączona do rozprawy). (2) określenie wpływu leptyny na ekspresję receptorów estrogenowych alfa i beta (ER α , ER β), oraz sekrecję estradiolu w liniach komórek wywodzących się z warstwy ziarnistej nabłonka jajnika, a także wpływu zastosowanych antagonistów jej receptora na ekspresję deacetylaz histonów (HDAC) i ich genów (trzecia publikacja). Dla udowodnienia swoich tez Doktorantka zastosowała 8 linii komórkowych. Cztery linie wyprowadzone z nabłonkowych nowotworów jajnika, o różnym stopniu zróżnicowania histologicznego (od linii SK-OV-3, wywodzącej się z raka jasnokomórkowego, o średniej agresywności histologicznej, poprzez CaOV-3, pochodzącej z gruczolakoraka jajnika, TOV-21G o średniej agresywności, do tej o dużej złośliwości histologicznej – linia OVCAR-3), oraz dwie linie nowotworowe wyprowadzone z komórek warstwy ziarnistej jajnika : KGN (dojrzała forma ziarniszcza) i COV434 (juwenilna forma nowotworu). Dla porównania do linii nowotworowych wywodzących się z komórek nabłonkowych użyła linię prawidłowych komórek nabłonkowych jajnika – HOSEpiC, zaś w przypadku linii wywodzących się z warstwy ziarnistej nabłonka – linii prawidłowych komórek ziarnistych nabłonka - HGrC1. Doktorantka zastosowała trzech antagonistów receptora leptyny, które są zmutowanymi cząsteczkami leptyny: Lan1, Lan2, oraz SHLA – superaktywny bloker receptora leptyny.

Przeprowadzone badania wykazały różnice w poziomie ekspresji genu receptora leptyny (*ObR*) w komórkach epithelialnych jajnika, zależne od typu nowotworu. Najniższą ekspresją charakteryzowała się linia komórek prawidłowych HOSEpiC oraz linia nowotworowa SK-OV-3, średnią ekspresję genu *ObR* stwierdzono w linii komórkowej nowotworu jajnika jasnokomórkowego: TOV-21G. Najwyższą ekspresją charakteryzowały się linie CaOV-3 oraz OVCAR-3. Zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych Doktorantka stwierdziła obecność długiej i krótkiej izoformy receptora leptyny. Leptyna w dawce notowanej w osoczu osób otyłych stymulowała proliferację komórek linii nowotworowych

CaOV-3 oraz OVCAR-3, efekt ten nie był obserwowany w linii HOSEpiC. Doktorantka wykazała hamujący wpływ antagonistów receptora leptyny, SHLA i Lan2, na proliferację komórek nowotworowych linii CaOV-3 oraz OVCAR-3 stymulowana leptyną. Jako mechanizm hamowania proliferacji przez antagonistów receptora leptyny wskazała ich wpływ na obniżenie poziomu ekspresji genów i białek zaangażowanych w cykl komórkowy, takich jak kinazy cyklino-zależne : Cdk2 i Cdk4, jak również obniżenie poziomu fosforylacji białka STAT-3 oraz kinazy Akt, uczestniczących w transdukcji sygnału z leptyny. Jako pierwsza

wykazała, że blokery receptora leptyny, jak SHLA i Lan-2 mogą być inhibitorami proliferacji i progresji nabłonkowych komórek nowotworowych jajnika przez co hamować stymulujący wpływ leptyny prowadzący do kancerogenezy. Wykazała również, że ich działanie jest zależne od typu nowotworu, co może mieć duże znaczenie kliniczne.

W drugiej publikacji dotyczącej linii komórek wywodzących się z warstwy ziarnistej Autorka wykazała obecność krótkiej i długiej formy ObR zarówno w komórkach prawidłowych jak i nowotworowych, jednak z wyższym poziomem ekspresji receptora leptyny w komórkach nowotworowych (linie COV434 oraz KGN) niż w komórkach prawidłowych (HGrC1). Doktorantka wykazała stymulujący wpływ leptyny na proliferację komórek w przypadku linii nowotworowych i nienowotworowych. Zarówno SHLA, jak i Lan2 hamował proliferację komórek obu linii nowotworowych, podczas gdy Lan1 wykazał podobne działanie jedynie w komórkach linii KGN. Bloker SHLA najefektywniej hamował stymulowaną leptyną proliferację w linii KGN. Podobnie jak w komórkach wywodzących się z warstwy nabłonkowej zahamowanie ekspresji występowało poprzez cykliny D, Cdk2 i Cdk4. Autorka wykazała wyższą ekspresję ER α w komórkach nowotworowych a ER β w linii prawidłowej. Lan1 w linii COV434 i wszyscy trzej zastosowani antagoniści w linii KGN obniżali ekspresję ER α . Ponadto, w linii HGrC1 oraz KGN wykazała hamujący wpływ Lan2 na sekrecję estradiolu stymulowaną leptyną.

W trzeciej publikacji Doktorantka przedstawiła wyniki analizy wpływu antagonistów receptora leptyny (SHLA, Lan2) na aktywność deacetylaz histonów i 6 ich genów (*HDAC1*, 4, 5, 6, 7, oraz 9) w dwóch liniach nowotworowych komórek nabłonkowych (OVCAR-3, CaOV-3) i dwóch liniach ziarniszczaka (COV434, KGN). W celu zastosowania antagonistów receptora leptyny, jako inhibitorów HDAC Doktorantka określała aktywność tych enzymów oraz działanie leptyny w badanych liniach. Wykazała wyższą aktywność deacetylaz histonów w komórkach linii KGN niż w linii COV434 oraz stymulujący wpływ leptyny na ekspresję *HDAC5-7* w linii COV434 i *HDAC9* w linii KGN. Dodatkowo, Autorka rozprawy analizowała stymulacyjny wpływ leptyny na poziom ekspresji genów deacetylaz histonów *HDAC1*, *HDAC7*, i *HDAC9* w linii OVCAR-3, jak również ekspresji białka HDAC1 w komórkach CaOV-3 oraz HDAC4-5 w linii OVCAR-3. Antagonista SHLA obniżał poziom ekspresji badanych genów w komórkach OVCAR-3 oraz w linii CaOV-4. Najwyższą aktywność deacetylaz histonów zanotowano w linii komórek opornych na chemioterapię OVCAR-3. Doktorantka nie wykazała natomiast wpływu zarówno leptyny jak i antagonistów ObR na aktywność deacetylaz histonów. Ponadto Autorka wykazała, że leptyna może wpływać na ekspresję genów i białek deacetylaz histonów w komórkach niektórych typów raka jajnika, a zastosowanie antagonistów receptorów leptyny (SHLA, Lan-2) może eliminować działanie leptyny, przez co odnieść skutek w leczeniu tego nowotworu poprzez zmniejszenie poziomu deacetylaz histonów.

Podsumowując, wyniki uzyskane w prezentowanej pracy doktorskiej wykazały, że zastosowani antagoniści receptora leptyny hamują proliferację komórek nowotworowych wywodzących się zarówno z nabłonka jajnika, jak i warstwy ziarnistej poprzez obniżenie poziomu ekspresji genów i białek cyklu komórkowego, jak również poprzez zahamowanie ścieżek sygnalizacyjnych uruchamianych przez leptynę. Wykazały również, że w komórkach warstwy ziarnistej jajnika wybrani antagoniści ObR powodują zmiany stosunku ekspresji receptorów estrogenowych (ER α i ER β) na korzyść formy β , która dominuje w komórkach nienowotworowych. Ponadto, ujawniły również, że antagoniści receptora leptyny obniżają ekspresję wybranych deacetylaz histonów, wykazując potencjalne korzyści działania na

poziomie epigenetycznym. Na tej podstawie sugerując, że antagoniści receptora leptyny mogą być brani pod uwagę jako związki potencjalnie terapeutyczne we wspomaganiu leczenia nowotworów jajnika wywodzących się z warstwy komórek nabłonkowych i ziarnistych.

Uzyskane wyniki pozwoliły również na poznanie mechanizmów molekularnych zachodzących pod wpływem blokerów szlaków sygnalizacyjnych prowadzących od leptyny i stworzyły perspektywy dla dalszych badań w celu poprawy diagnostyki nowotworów oraz nowych strategii terapeutycznych. Rozprawa udowodniła postawioną przez Doktorantkę hipotezę, że zablokowanie działania leptyny może przynieść korzyść w postaci zahamowania rozwoju lub progresji nowotworu jajnika i znaczenia tego wniosku nie można przecenić.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

Wartość merytoryczna rozprawy nie budzi żadnych zastrzeżeń. Uzyskane wyniki stanowią ważny wkład do wiedzy na temat biologii nowotworów jajnika. Doktorantka umiejętnie sprecyzowała hipotezy badawcze i z powodzeniem starała się je udowodnić. Do udowodnienia swoich tez zastosowała 8 linii komórkowych, oraz nowoczesne metody z zakresu biologii molekularnej. Zmiany w ekspresji genów mierzyła za pomocą metody łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR), zmiany w ilości białka analizowała za pomocą metody Western Blot. Pomiar aktywności kaspazy-3 przeprowadziła na podstawie metody fluorymetrycznej, a analizę stężenia estradiolu wykonała za pomocą metody ELISA z zastosowaniem powszechnie dostępnych zestawów odczynników. Aktywność deacetylaz histonów określała również fluorymetrycznie za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu. Do oceny aktywności metabolicznej komórek oraz potencjału proliferacyjnego Autorka została zastosowała testy: AlamarBlue oraz wbudowania bromodeoksyurydyny (BrdU). Wszystkie testy zostały w sposób bardzo klarowny przedstawione. Doktorantka poprawnie zastosowała metody statystyczne. We wszystkich publikacjach umiejętnie przeprowadziła dyskusję z dostępnymi wynikami innych autorów, cytując adekwatne i aktualne prace, oraz wyciągając właściwe wnioski. Prace napisane są lapidarnie, bez zbędnych treści, ze starannie przygotowaną stroną graficzną.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa przedstawiona została na 82 stronach, podzielona na 11 części, obejmujących: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji zawartych w rozprawie, wstęp, materiały i metody zastosowane w pracy, schematy przeprowadzonych eksperymentów i zastosowane metody statystyczne, kopie trzech publikacji oryginalnych w języku angielskim, wraz z podsumowaniem uzyskanych wyników w języku polskim. Następnie Doktorantka zamieściła oświadczenie współautorów publikacji, po czym przedstawiła rozdział Dyskusja, a na końcu rozprawy spis 63 pozycji cytowanej literatury. Według recenzenta z pewnością byłoby podzielić rozprawę na dwie części: treść tekstową w języku polskim i na końcu, w suplemencie zamieścić publikacje oryginalne w języku angielskim. Praca napisana jest klarownie i w ładnym stylu. Na podkreślenie zasługuje umieszczenie trzech klarownych schematów eksperymentów, wykonanych w celu uzyskania

wyników do trzech publikacji, co zdecydowanie ułatwia analizę uzyskanych rezultatów, czym potwierdziła logiczną konsekwencję w formułowaniu hipotez badawczych. W załączonych publikacjach zarówno część merytoryczna jak i strona ilustracyjna zostały przedstawiona bardzo starannie o czym świadczy wydrukowanie ich w wysoko-impaktowanych czasopismach.

Pewnym mankamentem rozprawy jest brak wykazu skrótów na początku rozprawy, co jest zwyczajowo stosowane w pracach doktorskich, choć wszystkie skróty w tekście pracy zostały wyjaśnione. We wstępie pracy, do opisu onkogenego działania leptyny może należałoby dodać, że jest ona potencjalnym aktywatorem powstania rodników tlenowych i może mieć wpływ na przeżywalność nowotworowych komórek macierzystych, co wykazano w raku piersi [Zheng Q i wsp. *Endocr Relat Cancer* 2013;20:797-808]. Doktorantka nie ustrzegła się również pewnych niezręczności językowych, np. s.17 „linia KGN reprezentuje formę dorosłą ziarniszcza jajnika”, poprawnie histologicznie byłoby forma dojrzała ziarniszcza jajnika, lub s. 26. „Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ odchylenie średnie z trzech powtórzeń biologicznych”; chodzi o średnią z trzech eksperymentów biologicznych, s.72 – nowotwór piersi to nie nowotwór ginekologiczny tylko nowotwór hormonozależny.

4. Uwagi krytyczne

W ocenianej rozprawie trudno jest wskazać uwagi krytyczne. Może podam tylko, że według recenzenta streszczenie rozprawy jest za długie. Dwa pierwsze akapity powinny się znaleźć we wstępie pracy. W streszczeniu nie podano czy zastosowany w pracy poziom leptyny, wykazany został w osoczu otyłych osób chorych, czy zdrowych.

Recenzent chciałby podzielić się pewną sugestią. Doktorantka przeprowadziła swoje badania w dwuwymiarowej hodowli komórek nowotworowych, co uniemożliwiło ocenę wpływu mikrośrodowiska nowotworu, które odgrywa dużą rolę w inicjacji i progresji nowotworu, między innymi poprzez wpływ komórek podścieliska nowotworu czy komórek układu odpornościowego na ten proces. Przeprowadzenie badań w hodowli trójwymiarowej pozwoliłoby na uzyskanie pełniejszego obrazu badanych efektów biologicznych i było przekonujące dla klinicystów.

5. Ocena końcowa

Przedstawioną do oceny pracę doktorską oceniam bardzo dobrze. Jest ona obszernym i cennym opracowaniem, które zawiera oryginalne wyniki. Autorka wykazała predyspozycję i umiejętności wykorzystania wielu technik i metod badawczych, wykazała się doskonałą znajomością piśmiennictwa i umiejętnością rozwiązywania problemu badawczego, co wskazuje na to, iż jest przygotowana do samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Wykazała dużą wiedzę teoretyczną i specjalistyczną w zakresie nie tylko biologii nowotworu jajnika ale także strategii terapeutycznych tego nowotworu. Podsumowując, wyrażam przekonanie, że Autorka rozprawy osiągnęła stawiane sobie cele i na każde pytanie uzyskała odpowiedź. Jej rozprawa zawiera elementy nowe i wartościowe, w istotny sposób przyczyniające się do poszerzenia wiadomości na temat biologii nowotworu jajnika. Moje uwagi, przede wszystkim o charakterze redakcyjnym, nie wpływają na całościową, wysoce

pozytywną ocenę omawianej pracy, która w moim przekonaniu spełnia wszystkie warunki rozprawy na stopień doktora nauk przyrodniczych.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Elżbiety Fiedor spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Mgr Elżbiety Fiedor do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ja, niżej podpisana wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie wniosku

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat biologii raka jajnika. Zwróciły uwagę na procesy epigenetyczne, które są ważne nie tylko z punktu widzenia naukowego, ale też ze względu na wykorzystanie ich w klinice. Pozwoliły na poznanie mechanizmów molekularnych zachodzących w komórkach nowotworu jajnika pod wpływem inhibitorów receptora leptyny, co sprawia, że mają znaczenie aplikacyjne i mogą mieć wpływ na zastosowanie nowych strategii leczenia tego nowotworu. Na wysoką wartość uzyskanych wyników może wskazywać opublikowanie ich w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (sumaryczny IF = 8,034).

29 październik 2018

.....
data sporządzenia recenzji


.....
podpis recenzenta