

Prof. dr hab. Adam Zięcik
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Elżbiety Fiedor pt. „Określenie wpływu selektywnych blokerów receptora leptyny na wybrane parametry nowotworu jajnika”, wykonanej Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Gregoraszczuk.

Dysertację o podanym powyżej tytule opracowano zgodnie z wytycznymi wynikającymi ze znowelizowanej Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym z dnia 18.03.2011 Dz.U. 2011 R., nr 84 poz. 455, z późniejszymi zmianami oraz Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14.03.2003 roku z późniejszymi zmianami.

Regulacje ustawowe narzucały Doktorantce potrzebę wykonania nowego opisu pracy naukowej dostępnej już w opublikowanych oryginalnych artykułach. Zmuszona była więc ustalić nowy temat i tytuł obejmujący swoim zasięgiem wszystkie opublikowane prace jak i zaczerpnąć z już istniejącego tekstu, część materiału opisowego oraz dane liczbowe by włączyć je do nowego tematu.

Nowa forma przygotowania rozprawy doktorskiej w Polsce, tradycyjna już od kilkunastu lat w krajach skandynawskich, a ostatnio obowiązująca na wielu uniwersytetach np. Hiszpanii, sprowadza się do konieczności wydania przez Recenzenta opinii w oparciu o opracowany materiał faktograficzny i dyskusyjny oraz opublikowane i zrecenzowane już przez specjalistów publikacje.

Rozprawa licząca 82 strony została podzielona na dwie części:

I. Tekstowa, która jest właściwym opracowaniem publikacji i zawiera następujące rozdziały:

1) Streszczenie w języku polskim(5-8); 2) Streszczenie w języku angielskim (9-11); 3) Wykaz publikacji zawartych w rozprawie (12); 4) Wstęp (13-16); 5) Materiał i Metody (17-20); 6) Schematy eksperymentów (21-26); 7) Podsumowanie załączonych publikacji (27-30); 8) Publikacje (31-68); 9) Oświadczenia współautorów (67-68); 10) Dyskusja (69-75) i 11) Spis literatury (76-82).

II. Załączone do rozprawy publikacje 3 oryginalne prace i opublikowane w *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*: 1. Fiedor E, Gregoraszcuk EL. The molecular mechanism of action of superactive human leptin antagonist (SHLA) and quadruple leptin mutein Lan-2 on human ovarian epithelial cell lines. 2016, 78:611-622 (IF=2.737); 2. Fiedor E, Gregoraszcuk EL. Superactive human leptin antagonist (SHLA), triple Lan1 and quadruple Lan2 leptin mutein as a promising treatment for human folliculoma. 2017, 80:815-822 (IF=2.737) oraz 3. *Cancer Genomics and Proteomics*: Fiedor E, Zajda K, Gregoraszcuk EL. Leptin Receptor Antagonists' Action on HDAC Expression Eliminating the Negative Effects of Leptin in Ovarian Cancer. 2018, 15:329-336 (IF=1.892).

Są to prace zespołowe, dlatego też w załączonych oświadczeniach współautorów podane zostało, że współudział Autorki w przygotowania koncepcji pracy, wyborze modelu badawczego, wykonaniu analiz jak również opracowaniu wyników wynosi odpowiednio 80 (publikacja 1 i 2) oraz 70% (publikacja 3).

Chcę podkreślić, już na wstępie, że tematyka publikacji, a tym samym rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Fiedor, wpisuje się w dotychczasową tematykę badawczą prowadzoną w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ, którego kierownikiem od wielu lat jest promotor pracy doktorskiej – Pani prof. dr hab. Ewa L. Gregoraszcuk.

Po wnikliwym przeanalizowaniu przedłożonych prac, jak też manuskryptu rozprawy doktorskiej i poszczególnych rozdziałów, wypowiadam się bardzo pozytywnie o jej wartości naukowej. Wnosi bowiem ona bardzo wiele nowych, oryginalnych danych, po raz pierwszy zarejestrowanych w eksperymentach biologicznych *in vitro* i stanowi pewne „novum” zbiorczo zredagowane z materiału opisanego w trzech publikacjach.

Pierwszym obowiązkiem recenzenta tego typu rozprawy jest stwierdzenie, czy tytuł rozprawy doktorskiej i jej treść odzwierciedlają tematykę i wyniki badań zawartych w publikacjach dołączonych do manuskryptu. O ile tematyka i wyniki nie budzą najmniejszych zastrzeżeń to do tytułu można mieć uwagę ponieważ określenie „parametry nowotworu jajnika” wywołuje pewne wątpliwości. Tytuł ten sugeruje, że Autorka badała nowotwory jajnika gdy tymczasem modelem badawczym były linie komórkowe, wyprowadzone z różnych nowotworów jajnika kobiety. Oczywiście określone właściwości badanych komórek mają związek z powstawaniem i progresją określonego typu nowotworu jajnika ale sam nowotwór czy tkanki guza nie były przez Autorkę badane.

Usprawiedliwieniem tak sformułowanego tytułu jest prawdopodobnie dążenie do przekazania w jak najprostszy, lapidarny sposób całej treści rozprawy, w tym zawartych w Dyskusji informacji, o możliwości zastosowania antagonistów receptora leptyny w terapii nowotworów jajnika u kobiet i w ten sposób uczynienia tytułu bardziej „nośnym”.

Być może na przykład tytuł „Wpływ selektywnych blokerów receptora leptyny na wybrane właściwości linii nowotworów jajnika i nowe perspektywy ich zastosowania w terapii przeciwnowotworowej” byłyby bardziej właściwym opisem omawianej rozprawy doktorskiej, tym bardziej że rozprawa dotyczy pośrednio nowotworu jajnika charakteryzującego się najwyższą śmiertelnością u pacjentek w/g *American Cancer Society*, głównie dlatego że długo nie daje objawów skłaniających kobiety do przeprowadzenia odpowiednich badań. Istnieje również hipoteza, że otyłość związana z wielokrotnie wyższym stężeniem leptyny w osoczu krwi może być powodem podatności na rozwój nowotworu jajnika. Istnieje przypuszczenie, że zablokowanie działania leptyny może zahamować rozwój/progresję nowotworu jajnika.

Model badawczy proponowanych badań przygotowany został niezwykle precyzyjnie i może stanowić wzór dla tego typu badań *in vitro*. Badania przeprowadzono na ośmiu liniach komórkowych: czterech wyprowadzonych z nabłonkowych nowotworów jajnika (OVCAR-3, CaOV-3, SK-OV-3, TOV-21G) i jednej linii komórek nabłonkowych nienowotworowych (HOSEpiC) oraz dwóch liniach wyprowadzonych z komórek ziarnistych warstwy jajnika (KGN, COV434) i uniesmiertelnionej linii prawidłowych komórek ziarnistych (HGrC1). Użyto trzech antagonistów receptora (Lan1, Lan2 i SHLA) leptyny o bardzo wysokim, zbliżonym powinowactwie do receptora, jak natywne formy leptyny. Myślę, że było to tylko możliwe

dzięki wieloletniej współpracy prof. Gregoraszczyk z laboratorium prof. A. Gertlera z Hebrajskiego Uniwersytetu w Jerozolimie w Rehovot.

W Publikacji 1, oprócz określenia poziomu i stymulowanej lektyną, ekspresji genu receptora leptyny (OBR), w trzech nowotworowych liniach i jednej monoklonalnej linii, wywodzących się z nabłonka jajnika, wpływu leptyny i antagonistów ObR (SHLA i Lan2) na poziom białka receptora leptyny wybranych linii i wpływu leptyny i antagonistów jej receptora na proliferację komórek badanych linii, określono również mechanizm działania antagonistów ObR w liniach CaOV-3 i OVCAR-3.

Linie komórek nowotworowych wyprowadzonych z nowotworów w wysokim stopniu zaawansowania CaOV-3 i OVCAR-3 charakteryzowały się kilkakrotnie (5 i 9 odpowiednio) wyższym poziomem genu receptora leptyny niż linia wyprowadzona z komórek prawidłowych (HOSEpiC). Co ciekawe, te same linie odpowiadały pozytywnie na stymulację swojego receptora przez leptynę. Bardzo interesujące jest stwierdzenie, że leptyna w koncentracji 40 ng/ml, notowanej u osób otyłych, stymuluje proliferację komórek nowotworowych obu testowanych linii, natomiast zastosowanie antagonistów SHLA i Lan2 hamuje ten efekt. W komórkach prawidłowych nie zanotowano wpływu leptyny i antagonistów na proliferację komórek, poza antagonistą Lan2, który hamował podziały komórek. W celu zbadania mechanizmów działania antagonistów receptora leptyny w komórkach nowotworowych, po stymulacji leptyną, zastosowano wysoką dawkę antagonisty – 1000 ng/ml. Domyślam się, że jest to wymóg konieczny do uzyskania pełnego wysycenia receptora leptyny antagonistą i osiągnięcia minimum 10-molowego nadmiaru antagonisty w środowisku komórki nowotworowej. Natomiast w tym przypadku stosunek leptyna: antagonisty wynosił około 1:20.

Wykazano spadek ekspresji większości genów zaangażowanych w aktywację cyklu komórkowego linii CaOV-3 pod wpływem obu zastosowanych antagonistów, a linii OVCAR-3, po zastosowaniu Lan2. Drugi antagonisty SHLA w obu liniach komórkowych podnosił poziom ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego CDKN1B i TP53. W obu liniach komórkowych SHLA i Lan2 efektywnie obniżały, stymulowaną leptyną ekspresję obu kinaz cyklino-zależnych (cKd2 i cdk4). W linii komórkowej CaOV-3 zarówno SHLA jak i Lan2 obniżały stymulowaną leptyną fosforylację białka STAT, ale tylko Lan2 zmniejszył fosforylację białka ERK1/2.

Przedmiotem badań Publikacji 2 są dwie linie nowotworowe ziarnistych komórek nowotworowych (COV434 i KGN) i kontrolna linia HGrC1. W obu tych liniach ekspresja receptora leptyny była o 50% wyższa na poziomie genu i białka, w porównaniu do komórek linii HGrC1. W obu liniach nowotworowych egzogenna leptyna nie zmieniła ekspresji swojego receptora. Doktorantka wykazała, że antagoniści receptora leptyny Lan1 i Lan2 obniżają jego ekspresję w linii COV434, pozostając bez wpływu na linie KGN.

Wszyscy zastosowani antagoniści odwracają stymulowaną leptyną proliferację komórek linii HGrC1 i KGN, ale tylko Lan2 miał taki wpływ na komórki linii COV434. W tej pracy, autorki określały również ekspresje receptorów estrogennych $ER\alpha$ i $ER\beta$ wykazując, że w prawidłowych komórkach ziarnistych, poziom ekspresji genu $ER\alpha$ był dwukrotnie wyższy niż $ER\beta$, natomiast w komórkach nowotworowych obu linii proporcja ta była odwrotna. W komórkach KGN wszyscy antagoniści wpływają na obniżenie poziomu białka $ER\alpha$, zaś w komórkach COV434 jedynie Lan1 miał taką skuteczność. Leptyna stymulowała wydzielanie estradiolu w linii „kontrolnej” HGrC1 oraz KGN, a spośród wszystkich zastosowanych antagonistów, jedynie Lan2 hamował ten efekt.

Celem Publikacji 3 było określenie podstawowej i stymulowanej leptyną ekspresji genów i białek deacetylaz histonów (HDACs) w liniach komórkowych jajnika wywodzących się z warstwy nabłonkowej i komórek warstwy ziarnistej jajnika, będących przedmiotem badań zawartych w Publikacji nr 1 i 2 (COV3 i OVCAR3 oraz COV434 i KGN, odpowiednio), jak również zbadanie wpływu antagonistów SHLA i Lan2 na stymulowaną leptyną ekspresję genów i białek wybranych deacetylaz w komórkach badanych linii nowotworowych. Zamierzono również określić aktywność deacetylaz histonów pod wpływem leptyny i obu antagonistów receptora w dawce 1000 ng/ml. Wyższą ekspresję deacetylaz histonów stwierdzono w komórkach linii wyprowadzonych z nowotworów nabłonka niż warstwy ziarnistej jajnika. Leptyna zwiększyła ekspresję genów HDAC1,7 i 9 w linii OVCAR3, SHLA hamował działanie leptyny na geny i białka HDAC 1 i 9 oraz HDAC5 genu HDAC4 i białka HDAC6. Lan2 obniżył jedynie ekspresję białka HDAC9. W komórkach drugiej linii „nabłonkowej” CaOV3 leptyna nie wpłynęła na ekspresję genów HDAC.

W komórkach ziarnistych stwierdzono wyższą ekspresję deacetylaz z grupy 1 niż w komórkach KGN. W komórkach COV434 leptyna zwiększyła ekspresję genu HDAC9, a

komórkach KGN w HDAC5, 6 i 7. SHLA zmniejszył ekspresję genu HDAC1 oraz białek HDAC1, 4 i 9, natomiast Lan2 obniżył nie tylko ekspresję HDAC1, ale także genu i białka HDAC5, jak również białek HDAC4 i 9. Linia KGN jest mniej podatna na działanie antagonistów receptora leptyny, gdyż Lan2 obniżył tylko poziom ekspresji HDAC4 – 9, a SHLA zahamował ekspresję genu HDAC2, 7 i 9. W podsumowaniu tej publikacji (str. 29) stwierdzono, że (cytuje): „Nie zaobserwowano wpływu leptyny i antagonistów jej receptora na aktywność deacetylaz histonów we wszystkich badanych liniach”. Czy odnosi się to także do, anonsowanej w celach Publikacji 3 (str. 26), dawki antagonistów 1000 ng/ml. Nie znalazłem jednak żadnej informacji w oryginalnej publikacji na temat zastosowanie tej dawki antagonistów receptora leptyny w opisywanym eksperymencie. Końcowy wniosek tej publikacji brzmi (cytuję wersję oryginalną w j. angielskim) : „*We also suggest that both SHLA and Lan-2, selective leptin receptor antagonists, could exhibit some benefits in ovarian cancer treatment, because they are able to decrease the levels of HDACs*”

Pierwsza część „Dyskusji” rozprawy doktorskiej dotyczy historii prac nad syntezą terapeutycznych antagonistów receptora leptyny i ich antagonistycznych właściwości w kulturach *in vitro* i badaniach *in vivo* prowadzonych m.in. na liniach komórkowych nowotworu piersi czy okrężnicy. Narracja ta była potrzebna Autorce do wyjaśnienia przyczyn zastosowanych w badaniach własnych antagonistów, SHLA oraz Lan1 i 2, zsyntezowanych w laboratorium prof. A. Gertlera. Równie dobrze część tych informacji mogłaby zostać przeniesiona do „Wstępu” rozprawy. Niemniej przytoczone dane literaturowe utwierdzają czytelnika o trafności wyboru przedmiotu badań i skupieniu się na wpływie leptyny na komórki nowotworowe i prawidłowe wywodzące się z dwóch struktur jajnika: nabłonka i warstwy ziarnistej. Oprócz nowych wartości poznawczych, opublikowane i załączone oryginalne publikacje, po raz pierwszy zawierają charakterystykę badanych linii komórkowych pod wpływem leptyno-zależności i będą stanowić cenne źródło piśmiennictwa, dlatego wróżę im dużą cytowalność.

We wszystkich badanych liniach komórkach gen leptyny nie ulega ekspresji czyli komórki nie produkują leptyny i działanie autokrynne i parakrynne tego hormonu w obrębie jajnika nie jest możliwe. Pozwoliło to również precyzyjnie określić wpływ różnych dawek egzogennej leptyny na badane procesy. Poziom ekspresji receptora leptyny był uzależniony od typu linii komórkowej w liniach epitelialnych i tych wywodzących się z komórek ziarnistych. Jednym z

ważnych wyników tej rozprawy jest stwierdzenie, że leptyna w podwyższonym stężeniu, notowanym w osoczu osób otyłych, wzmacnia proliferację komórek nowotworowych, zarówno wywodzących się z nabłonka jajnika jak i komórek ziarnistych. Zróżnicowana jest odpowiedź poszczególnych linii komórkowych na działanie antagonistów receptora leptyny. Na przykład antagoniści SHLA i Lan2 hamują stymulowaną leptyną proliferację komórek linii nabłonkowej OVCAR3, ale w podobnej linii CAOV3 efektywnym antagonistą był tylko bloker Lan2. Interesujące, z punktu widzenia terapeutycznego, jest spostrzeżenie, że zastosowani antagoniści nie blokują aktywności leptyny w komórkach „zdrowej” linii HOSEpiC.

Autorka podjęła się próby odpowiedzi na pytanie, jaki mechanizm zaangażowany jest w blokowanie stymulowanej leptyną proliferację komórek jajnika, uwzględniając wyniki poprzednich doniesień literaturowych. Sama leptyna podnosiła poziom białka cykliny D1 w nabłonkowej linii COV, pozostając bez wpływu w linii OVCAR-3 podwyższając ekspresję białka dla kinazy cyklino-zależnej CdK2 i CdK4, zaangażowanych w fazę G1 cyklu komórkowego i przejście z fazy G1 do fazy S. Autorka wysunęła wniosek, że antagoniści receptora leptyny, poprzez obniżenie ekspresji czynników zaangażowanych w punkt kontrolny G1/S, przyczyniają się do zahamowania cyklu komórkowego i tym samym spadku proliferacji (Publikacja 3).

W obu liniach komórkowych wywodzących się z warstwy epitelialnej nowotworu jajnika, leptyna stymulowała aktywację kinazy ERK1/2 oraz czynnika transkrypcyjnego STAT-3. Uruchomienie tej i innych ścieżek sygnalizacyjnych (np. MAP) stymuluje m.in. transkrypcję genów odpowiedzialnych za przeżycie i proliferację komórek. W przypadku linii CaoV-3, antagonistę hamował ekspresję białek STAT-3 i ERK1/2 w konsekwencji obniżając stymulowaną przez leptynę proliferację komórek. W linii OVCAR-3 superaktywny agonista receptora leptyny (SHLA) hamował fosforylację wszystkich trzech białek aktywujących ścieżki sygnalizacyjne leptyny (Publikacja 1). Autorka podjęła się również charakterystyki jeszcze jednej ścieżki sygnalizacyjnej, uruchomianej przez estrogeny, biorąc pod uwagę fakt, że sekrecja estradiolu w dojrzałym typie ziarniszczaka jest 10-krotnie wyższa niż w komórkach prawidłowych i komórkach juvenilnej formy nowotworu.

Leptyna stymulowała sekrecję estradiolu w komórkach nienowotworowych (HGrC1) oraz linii wywodzącej się z dojrzałej formy ziarniszczaka (KGN). Zastosowanie antagonistów, za

wyjątkiem Lan2, nie zmieniło wydzielania estradiolu przez komórki tych linii. Przyjmuje się, że leptyna, poprzez kinazę MAP zwiększa aktywację receptora ER α wpływając na uruchomienie transkrypcji genów odpowiedzialnych za proliferację komórek.

Bardzo istotnym zagadnieniem, z punktu widzenia biologii nowotworu, którym zajęła się również Doktorantka jest określenie udziału leptyny w indukowaniu zmian epigenetycznych na przykładzie potranslacyjnych modyfikacji histonów. Wysoka ekspresja deacetylasy histonów (HDCAC) jest powszechnym zjawiskiem, między innymi w komórkach nowotworu jajnika, a wykazanie zależności pomiędzy aktywnością leptyny i deacetylaz histonów oraz wpływu antagonistów receptora leptyny na obniżenie ekspresji wybranych białek deacetylaz histonów, a tym samym osłabieniem ich kancerogenego potencjału, są pierwszymi obserwacjami zależności pomiędzy aktywnością leptyny i deacetylaz histonów, chociaż mechanizm tego zjawiska pozostaje do wyjaśnienia.

W podsumowaniu rozprawy doktorskiej, Kandydatka skupia się głównie nad możliwością zastosowania antagonistów receptora leptyny u osób z podwyższonym stężeniem leptyny w celu ograniczenia jej negatywnego działania: zahamowania aktywności ścieżek sygnalizacyjnych uruchamianych przez leptynę, obniżenia ekspresji czynników zaangażowanych w cykl komórkowy prowadzących do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych wywodzących się z obu warstw jajnika.

Dodatkowo antagoniści ObR mogą obniżyć aktywację genów uruchamianych przez estrogeny i w ten sposób pośrednio wpływać na obniżenie deacetylaz histonów w odpowiednich typach komórek nowotworowych.

Końcowy wniosek rozprawy brzmi następująco: antagoniści receptora leptyny mogą być brani pod uwagę jako związki potencjalnie terapeutyczne we wspomaganiu leczenia nowotworu jajnika. Wybór stosowanego antagonisty powinien być jednak skorelowany z rodzajem nowotworu.

Ocena końcowa

Każdy rozdział pracy doktorskiej został opracowany na podstawie danych, które opublikowano w czasopismach liczących się w środowisku osób zajmujących się farmakologią i chemioterapią nowotworów. Jestem przekonany, że publikacje te wejdą niebawem do obiegu naukowego ze względu nie tylko na doniosłość problemów, które starają się wyjaśnić, ale także pokazują po raz pierwszy istnienie wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych działania leptyny i jej antagonistów w różnych typach komórek nowotworowych jajnika kobiety.

Na szczególne podkreślenie zasługuje wzorowe zaplanowanie doświadczeń na szeregu liniach komórkowych jajnika. Oceniana rozprawa doktorska i opublikowane 3 prace posiadają również jeden niezaplanowany, a przynajmniej niepodkreślany walor naukowy, mianowicie scharakteryzowanie po raz pierwszy szeregu linii komórkowych nowotworów jajnika i kontrolnych linii nienowotworowych, pod względem ekspresji genów związanych z działaniem leptyny.

Generalnie, przedstawione wyniki pozytywnie weryfikują przedstawioną hipotezę, że zablokowanie działania leptyny może przynieść korzyści w postaci zahamowania rozwoju/progresji nowotworu jajnika. Warto jednak dodać, że prawdziwa weryfikacja badań winna być potwierdzona na żywych zwierzętach. Szkoda tylko, że synteza rozprawy doktorskiej, w postaci kilku czy nawet kilkunastu szczegółowych wniosków, nie przybrała zwartej formy twierdzącej lecz podana jest opisowo, co utrudnia konfrontację ze szczegółowymi 11 celami wszystkich trzech publikacji zawartych w opisie pracy.

Pani mgr Elżbieta Fiedor wykazała się doskonałym opanowaniem wielu nowoczesnych technik badawczych z zakresu kultur komórkowych *in vitro*, biologii molekularnej, ekspresji genów i białek. Pracując w bardzo małym 2-3 osobowym zespole musiała wziąć na siebie aż 75% wszystkich obowiązków, od zaplanowania doświadczeń i ich przeprowadzenia, opracowania wyników i opublikowania w bardzo dobrych czasopismach. Sprostowanie wymogom redakcyjnym prestiżowych wydawnictw świadczy też o umiejętności opracowania wyników, ich krytycznej analizie i znajomości przedmiotu.

Zaznaczone uwagi krytyczne i kilka błędów edytorskich, nie zmieniają mojej opinii i jak zaznaczyłem wcześniej, nadesłaną do recenzji pracę doktorską oceniam bardzo wysoko.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Elżbiety Fiedor spełnia warunki określone w artykule 13.1 ustawy z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz.595 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Elżbiety Fiedor do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



29.10.2018.

prof. dr hab. Adam Zięcik