

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Górskiej - Wójtowicz
pt. „ Rola androgenów w regulacji czynności prostaty knura: badania in vivo i in vitro”**

**Praca wykonana w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii
Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie,
pod kierunkiem prof. dr hab. n. biol. Barbary Bilińskiej**

Prostata pełni ważną rolę w układzie płciowym męskim zarówno u człowieka jak i u ssaków. Jest ona pod ścisłą kontrolą androgenów, które są odpowiedzialne za różnicowanie i prawidłową funkcję tego gruczołu oraz jego homeostazę. Wydzielina gruczołu krokowego, produkowana przez komórki wydzielnicze, wchodzi w skład płynu nasiennego i stanowi około 20 – 30% ejakulatu. Wydzielina ta zawiera między innymi kwas cytrynowy, fruktozę, fosfatazę kwaśną, cynk oraz enzymy: amylazę i fibrynolizynę. Warunkuje ona żywotność plemników oraz rozrzedza płyn nasenny. Prawidłowy skład tej wydzieliny zależy od prawidłowej budowy i funkcji komórek nabłonka prostaty.

Doktorantka, jako model swoich badań, wybrała prostatę knura, ze względu na duże podobieństwo fizjologii świni do fizjologii człowieka, jak również ludzkie, nowotworowe linie komórek prostaty.

Cel pracy, który postawiła sobie Doktorantka, był bardzo ambitny. Postanowiła zbadać, czy antyandrogen flutamid zaburza funkcjonowanie receptora androgenowego i białek połączeń przylegania β - kateniny i E-kadheryny w komórkach prostaty knura poprzez wpływ na zmianę ekspresji, lokalizacji i poziomu fosforylacji kinaz białkowych, uczestniczących w nieklasycznej drodze kontrolowanej przez androgeny takich jak: cSrc, Raf-1, ERK1/2 i kinazy Akt. Cel główny pracy został zrealizowany poprzez 5 celów szczegółowych przedstawionych w rozprawie. Pani mgr Ewelina Górńska - Wójtowicz poszerzyła jeszcze dodatkowo swoje badania, prowadząc je zarówno w warunkach in vivo, w komórkach prostaty knura po ekspozycji na flutamid jak i in vitro w ludzkich, nowotworowych komórkach prostaty traktowanych antyandrogenem 2-hydroksyflutamidem HF. To właśnie te dwa antyandrogeny są obecnie często stosowane jako modele badawcze zarówno w naukach podstawowych jak i badaniach klinicznych. W naukach podstawowych flutamid,

może być wykorzystany w różnych modelach doświadczalnych w celu sprawdzenia co się stanie, jeżeli organizm ma ograniczony dostęp do androgenów. Ze względu na to, że flutamid selektywnie blokuje AR, obecne w ustroju androgeny nie mają możliwości wywołania efektów biologicznych poprzez AR oraz klasyczną drogę ich działania. Dlatego uważam, że recenzowana rozprawa dotyczy tematu bardzo ważnego, aktualnego i budzącego obecnie duże zainteresowanie środowisk naukowców i lekarzy praktyków.

Praca doktorska obejmuje 103 strony, 8 tabel, 13 rycin, 20 figur i 6 tablic. Rozprawa podzielona jest 8 rozdziałów, typowych dla prac doktorskich: Wstęp, Uzasadnienie i cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim i Literatura. Dodatkowo Doktorantka bardzo dokładnie i przejrzysto przygotowała wykaz stosowanych skrótów w języku angielskim i polskim i zamieściła go na początku rozprawy. Cytowane piśmiennictwo obejmuje 222 pozycje literaturowe, prawie wszystkie są anglojęzyczne. Tylko 1 załączona praca (nr 82) jest napisana w języku polskim. Świadczy to o dobrej znajomości języka angielskiego przez Autorkę i umiejętności wyboru odpowiednich publikacji do swojej pracy doktorskiej. Piśmiennictwo jest dobrze dobrane i większość pozycji pochodzi z ostatnich piętnastu lat.

We **Wstępie** pracy, na 16 stronach, Doktorantka w sposób przystępny i przemyślany, posługując się informacjami zaczerpniętymi z najnowszych doniesień naukowych, przedstawiła najważniejsze zagadnienia, niezbędne do zrozumienia wyników badań swojej pracy oraz ich interpretacji. Wstęp pracy podzieliła na 5 podrozdziałów, w których opisała: prostatę jako narząd androgeno – zależny, receptor androgenowy, z klasyczną i nieklasyczną drogą działania androgenów, nowotworowe linie komórek prostaty, połączenia przylegania i flutamid. Na wysoką ocenę zasługuje zamieszczenie we wstępie 12, dobrze dobranych, kolorowych rycin, dzięki którym odbiór wstępu pracy był bardzo jasny i komunikatywny. Szczególnie w prosty i merytoryczny sposób zostały przedstawione na rycinach 6 – 8, klasyczne i nieklasyczne drogi działania androgenów. Klasyczna droga działania testosteronu, poprzez cytoplazmatyczny, klasyczny receptor androgenowy przedstawiona została na ryc. 6. Natomiast na rycinach 7 i 8 zostały bardzo jasno przedstawione nieklasyczne ścieżki działania testosteronu: poprzez receptor błonowy związany z białkiem G i za pośrednictwem cytoplazmatycznego AR poprzez aktywację ścieżki MAPK (kinaz białkowych aktywowanych mitogenami). Również dużo uwagi Autorka poświęciła „nowotworowym liniom komórek

prostaty” jako modelowi badawczemu pozwalającemu na poznanie molekularnych procesów zachodzących w komórkach prostaty poprzez nieklasyczne drogi działania androgenów. Doktorantka także w sposób zwięzły opisała połączenia przylegania, a na ryc.10 przedstawiła bardzo prosty i czytelny schemat budowy tych połączeń tworzonych przez kadheryny i kateniny. W ostatnim rozdziale wstępu Autorka opisała antyandrogen flutamid i jego metabolit 2-hydroksyflutamid, a bardzo prosty i czytelny schemat działania flutamidu przedstawiła na ryc.12.

Podsumowując mogę stwierdzić, że informacje przedstawione we wstępie świadczą o odczuciu i dużej wiedzy Doktorantki. Świadczą również o dobrej znajomości i umiejętności wykorzystania aktualnej literatury anglojęzycznej i umożliwiają zrozumienie istoty tematyki pracy.

Rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Górowskiej - Wójtowicz, dotycząca roli androgenów w regulacji czynności prostaty knura, jest pracą opartą na odpowiednim, bardzo precyzyjnie zaplanowanym modelu doświadczalnym, co jest dużą zasługą Pani Promotor, Profesor Barbary Bilińskiej, która w swoim Zakładzie Endokrynologii od wielu lat zajmuje się badaniem roli androgenów w regulacji czynności gonady męskiej i najądrza.

Materiał do badań w systemie *in vivo*, stanowiły prostaty pobrane od dojrzałych płciowo knurów. Zwierzęta podzielono na 2 grupy badane. W grupie 1 (PD2), knurom podawano flutamid w okresie neonatalnym, od 2 - 10 dnia po urodzeniu, a w grupie 2 (PD90) w okresie prepubertalnym, od 90-98 dnia po urodzeniu. Flutamid podawano knurom podskórnie, w dawce 50mg/kg masy ciała. Autorka do przedstawionego opisu załączyła bardzo czytelny schemat przebiegu doświadczenia na knurach eksponowanych na działanie flutamidu. (Ryc. 1). Prostaty knurów Doktorantka otrzymała z Zakładu Fizjologii i Rozrodu Uniwersytetu Rzeszowskiego dzięki prowadzonej współpracy pomiędzy Zakładami. Otrzymane prostaty podzielono na fragmenty. Część wykorzystano do wykonania badań histologicznych i immunohistochemicznych. Doktorantka wykonała klasyczne barwienie hematoksyliną i eozyną w celu histologicznej oceny prostaty. Wykonała również reakcje immunohistochemiczne do oceny immunoekspresji i lokalizacji receptora androgenowego AR oraz białek połączeń przylegania E-kadheryny i β -katenu. Pozostałe fragmenty prostat knurów zamrażano w ciekłym azocie i izolowano z nich RNA w celu wykonania analiz RT-PCR w czasie rzeczywistym oraz sporządzano homogenaty do analiz Western blot.

W systemie **in vitro** materiał do badań stanowiły ludzkie linie komórek prostaty LNCaP – wrażliwe na androgeny, posiadające AR oraz ludzkie linie komórek prostaty PC3 – niewrażliwe na androgeny, nie posiadające AR. Komórki obu badanych linii były inkubowane z hydroksylutamidem. W celu lokalizacji AR w hodowanych komórkach prostaty linii LNCaP oraz lokalizacji badanych kinaz białkowych w hodowli komórek prostaty obu linii LNCaP i PC3 wykonano analizę immunocytochemiczną. Przeprowadzono również analizę Western blot do analiz poziomu fosforylacji badanych białek. Ludzkie linie komórkowe prostaty otrzymano dzięki współpracy Zakładu Endokrynologii z Katedrą Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Zgodnie z celami badań Doktorantka trafnie dobrała metody badawcze z zakresu morfologii, biologii molekularnej i biochemii, które opisała w sposób bardzo staranny i wyczerpujący. Procedury, przeciwciała pierwszorzędowe i ich rozcieńczenia oraz wykaz sond stosowanych w qRT-PCR opisała w 7 tabelach (tabele 1-7). Tak szczegółowo opisane metody i protokoły dają gwarancję na powtórzenie przeprowadzonych badań. Nie mam zastrzeżeń merytorycznych do przedstawionych tabel i protokołów. Analiza statystyczna uzyskanych danych została przeprowadzona w oparciu o prawidłowo dobrane testy. W badaniach **in vivo** i **in vitro**, w celu sprawdzenia jednorodności wariancji, stosowano test Levene’a natomiast do sprawdzenia normalności rozkładu zastosowano test Shapiro-Wilka. Dodatkowo w badaniach **in vivo** wpływ flutamidu na ekspresję białek połączeń przylegania na poziomie transkryptu i białka analizowano parametrycznym testem post – hoc Tukey’a Natomiast w badaniach **in vitro** uzyskane wyniki kolejno podawano analizie nieparametrycznym testem Kruskala-Walisa. Na przeprowadzenie badań Doktorantka uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (numer zgody 34/2008r.).

Wyniki swoich badań Autorka opisała w sposób przejrzysty i wyczerpujący. Przedstawiła je w formie tekstowej oraz w formie starannie przygotowanych 6 tablic (tablice 1-6), 20 figur i 1 tabeli (Tabela nr 8). Tablice ilustrują wyniki reakcji histologicznych, immunohistochemicznych i immunocytochemicznych. Na szczególne uznanie zasługuje bardzo dobra jakość zdjęć, zarówno histologicznych (HE), (Tablica 1) jak i immunohistochemicznych przedstawiających lokalizację AR (Tablica 2) i lokalizację E-kadheryny i β -kateniny (Tablica 3). Bardzo dobrej jakości są również zdjęcia z **badania in vitro**, przedstawiające immunocytochemiczną lokalizację AR w kontrolnych i inkubowanych z HF

komórkach prostaty linii LNCaP (Tablica 4) jak i lokalizację badanych kinaz w komórkach linii LNCaP (Tablica 5) i linii PC3 (Tablica 6). Doktorantka wyniki swoich badań dotyczących analizy Western blot – eksperymenty *in vivo* i *in vitro* oraz analizy real-time RT-PCR przedstawiła również bardzo czytelnie i prawidłowo na 20 figurach (Figury 1-20) wraz z dobrymi opisami.

W przeprowadzonych badaniach *in vivo*, w wyniku ekspozycji na flutamid, w preparatach histologicznych w grupie PD2 Autorka wykazała obecność ognisk zapalnych w zrębie prostaty i zmniejszenie się przedziału luminalnego, a w grupie PD90 obecność zmian dysplastycznych i hiperplastycznych w komórkach wydzielniczych nabłonka. W badaniach immunohistochemicznych stwierdziła, że flutamid zaburza lokalizację AR i β - kateniny w komórkach prostaty knura. Natomiast na podstawie analizy qRT-PCR i Western blot Doktorantka wykazała podwyższoną ekspresję β - kateniny na poziomie białka oraz obniżoną ekspresję genów kodujących AR i E-kadheryny zarówno na poziomie mRNA jak i białka.

W przeprowadzonych badaniach *in vitro*, analiza Western blot i ocena densytometryczna wykazały, że w komórkach prostaty linii LNCaP, po inkubacji z HF, stwierdzono spadek fosforylacji AR oraz wzrost fosforylacji E - kadheryny. Natomiast w komórkach linii PC3, po inkubacji z HF, wykazano spadek poziomu fosforylacji N - kadheryny i β - kateniny. Otrzymane wyniki mogą świadczyć o zaburzeniu funkcjonowania białek połączeń przylegania.

Doktorantka w podsumowaniu swoich badań stwierdziła, że zarówno zablokowanie przez flutamid klasycznej drogi działania androgenów przez AR jak i zaburzenie przez HF sygnalizacji z udziałem kinaz białkowych może być przyczyną zmian funkcjonowania połączeń przylegania w prostatie.

Pozytywnie oceniam prezentowane w pracy wyniki. Zostały one przedstawione w logiczny sposób oraz udokumentowane zdjęciami bardzo dobrej jakości. Sposób prezentacji wyników świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu metodycznego niezbędnego do przedstawienia swoich wyników badań. Jako recenzent chciałabym również podkreślić ogromny wkład pracy Doktorantki w celu uzyskania tak rozbudowanych wyników badań.

W rozdziale **Dyskusja**, liczącym 19 stron, Doktorantka bardzo ciekawie podjęła próbę interpretacji uzyskanych wyników, umiejętnie porównując je z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, w różnych warunkach doświadczalnych. Rozdział ten napisała czytelnie i

merytorycznie i podzieliła go na 8. podrozdziałów. W sposób rzeczowy omówiła i przedyskutowała wyniki swoich badań. W trzech pierwszych podrozdziałach przedyskutowała wyniki swoich badań *in vivo*: wpływ flutamidu na morfologię prostaty szczura, na ekspresję i lokalizację AR w prostacie szczura oraz na ekspresję i lokalizację E – kadheryny i β - kateniny w prostacie szczura. W kolejnych pięciu podrozdziałach Autorka przedyskutowała wyniki swoich badań *in vitro*: wpływ HF na lokalizację AR w komórkach prostaty linii LNCaP, na lokalizację kinaz białkowych w komórkach protaty linii LNCaP i PC3, na zmiany poziomu fosforylacji AR w komórkach prostaty linii LNCaP, na zmiany poziomu fosforylacji E-kadheryny, N-kadheryny i β - kateniny w komórkach prostaty linii LNCaP i PC3. W ostatnim, 8 podrozdziale dyskusji, który jeszcze dodatkowo podzieliła na dalsze 4 podrozdziały, przedyskutowała wpływ HF na zmiany poziomu fosforylacji badanych kinaz białkowych w komórkach prostaty linii LNCaP i PC3.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała cztery merytoryczne wnioski, które w pełni odpowiadają na postawione cele badań:

Do pracy nie wnoszę zastrzeżeń merytorycznych. Po przeczytaniu rozprawy, z obowiązku Recenzenta, chciałabym przedstawić swoje uwagi: 1. Doktorantka w swojej pracy nie zamieściła osobno spisu tabel, rycin figur i tablic, co ułatwiłoby czytanie pracy i pisanie recenzji; 2. W niektórych cytowanych pracach są drobne nieścisłości, szczególnie w różnym sposobie cytowania stron publikacji np. publikacje 1, 2, 6, 12, w porównaniu do dobrze cytowanych stron w publikacjach np. 7. 11, 13, 14. Przedstawione w recenzji uwagi dotyczą szczegółów i nie mają wpływu na bardzo dobrą ocenę pracy.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska mgr Eweliny Górowskiej - Wójtowicz dotyczy ważnych zagadnień związanych z poszerzeniem wiedzy na temat roli androgenów w regulacji czynności prostaty knura w badaniach *in vivo* jak i *in vitro*. Zastosowanie różnorodnych technik badawczych i umiejętność interpretacji uzyskanych wyników dowodzi o dojrzałości naukowej Autorki pracy. Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Eweliny Górowskiej - Wójtowicz, którą oceniam bardzo dobrze, napisana jest poprawnym językiem polskim i wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki w zakresie przeprowadzonych badań. W pełni spełnia warunki stawiane na stopień naukowy doktora w *obszarze nauk przyrodniczych, w dziedzinie nauk biologicznych i dyscyplinie biologii*. Rozprawa spełnia również warunki określone w artyku 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o

stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003r., nr 65, poz.595, Dz.U. z 2005r., nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 20011 r. nr 84, poz. 455 z późn. zmianami).

Dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Eweliny Górskiej - Wójtowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, ze względu na jej wysoki poziom, oryginalność uzyskanych wyników oraz dlatego, że część wyników została już opublikowana w 2 czasopismach naukowym indeksowanych w bazie Web of Science, w których Doktorantka jest pierwszym autorem: Andrology 2014,2:186-197 i Toxicol in Vitro 2017,40:324-335.



Prof. dr hab. n. med. Maria Laszczyńska