Prof. dr hab. Jacek Malejczyk
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel./fax: 22 629 52 82
jacek.malejczyk@wum.edu.pl

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR JOANNY STELMASZEWSKIEJ PT. „FUNKCJONALNA EKSPRESJA RECEPTORA FSH W KOMÓRKACH ENDOTELIALNYCH ORAZ KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH RAKA PROSTATY."

Przedstawiona mi do oceny rozprawa mgr Joanny Stelmaszewskiej dotyczy ciekawego ze względów poznawczych i klinicznych problemu ekspresji receptorów dla hormonu folikulotropowego (FSHR) w komórkach raka prostaty i komórkach śródbłonka. Problem ten dotychczas nie był rozstrzygnięty dlatego uważam, że podjęcie badań w celu ustalenia, czy FSHR ulega ekspresji w komórkach tego typu nowotworu i związanych z nim naczyniach krwionośnych uważam za uzasadniony. Zakładając, że ekspresja ta może mieć miejsce, mgr Stelmaszewska podjęła również próbę zbadania efektywności terapii przeciwnowotworowej opartej na koniugacie syntetycznego peptydu litycznego Phor21 z podjednostką β FSH (Phor21-FSHβ33-53CS).

Rozprawa mgr Stelmaszewskiej ma układ typowy dla prac doktorskich. Składa się ze wstępu, celu pracy, materiału i metod, wyników, dyskusji oraz wniosków. Części te uzupełnia streszczenie w języku polskim i angielskim, lista skrótów, spis rycin i tabel oraz piśmiennictwo.

We wstępie Doktorantka opisała budowę funkcję FSH i jego receptora zwracając szczególną uwagę na szlaki przekazywania sygnałów. Odniosła się również do biologicznego i klinicznego znaczenia polimorfizmów i mutacji ich genów. Podała również informacje dotyczące dotychczasowej wiedzy na temat ekspresji FSHR w tkankach nie należących do układu rozrodczego.

Co zrozumiałe, istotną część wstępu stanowi też analiza potencjalnego związku pomiędzy układem FSH/FSHR i prostatą, szczególnie w kontekście nowotworów wywodzących się z tego gruczołu. W części tej opisała pokrótce budowę i funkcję prostaty oraz odniosła się do podstawowych informacji dotyczących biologii raków prostaty i modeli stosowanych w badaniu ich rozwoju i patogenezy. Ta ostatnia część jest istotna ponieważ Doktorantka opisała w niej linie komórkowe powszechnie stosowane w badaniach raka prostaty, również te, które sama stosowała w swojej pracy doktorskiej.

W kolejnych podrozdziałach mgr Stelmaszewska podsumowała dotychczasową wiedzę na temat ekspresji FSHR w komórkach śródbłonka oraz roli układu FSH/FSHR w angiogenezie. Odniosła się też do innych biologicznych efektów tego hormonu, między innymi do jego potencjalnej roli w patogenezie otyłości i kościotworzenia.

Biorąc pod uwagę, że jednym z celów pracy było badanie wpływu Phor21-FSHβ33-53CS na komórki śródbłonka oraz przeszczepione komórki nowotworowe, w ostatniej części wstępu Doktorantka opisała peptydy lityczne, ich budowę i mechanizm działania, skupiając się szczególnie na syntetycznych peptydach Phor14 i Phor21.

Podsumowując, informacje zawarte we wstępie wynikają z istoty badań przedstawionych w rozprawie, stanowią dobre, teoretyczne wprowadzenie do celu pracy i pomagają zrozumieć jej założenia.

Cel pracy został sformułowany w postaci czterech celów szczegółowych:

1. Analiza ekspresji *FSHR* w komórkach raka prostaty i liniach komórkowych raka prostaty zależnych i niezależnych od androgenów.
2. Zbadanie potencjału przeciwnowotworowego koniugatu Phor21-FSHβ33-53C/S w ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej niszczącej komórki śród-błonka naczyń krwionośnych guza wykazujących ekspresję FSHR w modelu LNCaP.
3. Analiza ekspresji *FSHR* w pierwotnych komórkach śródbłonka żyły sznura pępowinowego (HUVEC) i unieśmiertelnionej linii HUVEC (HUV-ST) oraz określenie funkcjonalnego znaczenia tej ekspresji.
4. Zbadanie potencjału przeciwnowotworowego koniugatu Phor21-FSHβ33-53C/S w ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej guzów wykazujących ekspresję FSHR w modelu HEK293-FSHR.

W kolejnym rozdziale Doktorantka opisała materiał i stosowane w badaniach metody. Jako materiał wykorzystano kilka linii komórkowych raka prostaty oraz fragmenty tkanek prostaty pobranych w czasie zabiegu operacyjnego. Do badań użyto również komórek śródbłonka

izolowanych z żyły pępowinowej oraz komórki ziarniste pozyskiwane z pęcherzyków jajnikowych od kobiet poddanych leczeniu wspomaganymi technikami rozrodu. W badaniach *in vivo* wykorzystano natomiast komórki LNCaP oraz stabilnie transfekowane komórki HEK-293.

Ekspresję FSHR mgr Stelmaszewska badała ilościową metodą RT-PCR, metodą hybrydyzacji *in situ* oraz metodą immunohistochemiczną. Wpływ FSH na różne rodzaje komórek badała natomiast testem proliferacji opartym na ilościowej analizie DNA, testem angiogenezy *in vitro* (tube formation assay), testem migracji komórek (wound healing) oraz testem produkcji tlenku azotu. Analizę aktywacji szlaku przekazywania sygnału przez receptor FSHR badała oceniając produkcję cAMP metodą radioizotopową oraz oceniając aktywację kinazy AKT metodą Western-blot z przeciwciałami przeciwko fosforylowanej formie AKT.

Ocenę potencjalnego działania terapeutycznego koniugatu Phor21-FSHβ33-53CS przeprowadzono w układzie *in vivo* z wykorzystaniem modelu myszy NUDE Crl:NUFoxn1^{nu}.

Zastosowanie wyżej wymienionych metod było uzasadnione celem i zakresem badań. Opis użytych metod jest poprawny, chociaż w przypadku rozprawy doktorskiej mógłby być bardziej obszerny. Nie zmienia to jednak faktu, że Doktorantka wie o czym pisze i niewątpliwie posiadła umiejętność stosowania opisanych metod w praktyce.

Opis uzyskanych wyników również oceniam pozytywnie. Zostały one przedstawione w zwięzły i zrozumiały sposób i właściwie zilustrowane odpowiednimi mikrofotografiami lub wykresami. Wykresy są czytelne i estetyczne. Mam drobne zastrzeżenie do jakości mikrofotografii ilustrujących reakcje immunohistochemiczne i hybrydyzację *in situ*, zdaję sobie jednak sprawę, że są one spowodowane przyczynami technicznymi, wynikającymi z druku na zwykłym papierze. W tym przypadku Autorka mogłaby pokusić się o wklejenie mikrofotografii wydrukowanych na papierze fotograficznym.

Podsumowując uzyskane wyniki, Doktorantce nie udało się potwierdzić wcześniejszych doniesień o ekspresji FHSR w tkankach poza układem rozrodczym. Brak tej ekspresji w tkance raka prostaty i komórkach śródbłonka został przez nią rzetelnie udowodniony i w mojej opinii jest absolutnie przekonujący. Można tylko wyrazić z tego powodu żal, ponieważ Doktorantka udowodniła jednocześnie, że w przypadku gdyby ekspresja FSHR istniała, mogłaby być obiecującym celem terapii za pomocą testowanego koniugatu Phor21-FSHβ33-53CS.

Uzyskane wyniki mgr Stelmaszewska przedyskutowała w świetle wyników uzyskanych przez innych badaczy oraz ogólnej wiedzy na temat ekspresji i mechanizmu działania receptorów dla FSH w różnych tkankach i układach doświadczalnych. Dyskusję tę oceniam dobrze, chociaż Doktorantka nie wspomniała, że uzyskane przez nią wyniki są ograniczone do bardzo specyficznych modeli badawczych. Dotyczy to głównie komórek śródbłonka. W swoich

badaniach użyła ona komórek śródbłonka z żyły pępowinowej. Nie są to komórki, które można by uznać za reprezentatywne dla wszystkich rodzajów komórek śródbłonka. Ponadto, wyizolowane i hodowane *in vitro* komórki mogą zmieniać swój fenotyp, a guzy utworzone przez komórki PC-3 w warunkach ksenoprzeszczepu nie muszą odpowiadać swoją budową i fizjologią „normalnym" guzom prostaty. Różnice te mogłyby być odpowiedzialne za zagadkową ekspresję FSHR w komórkach śródbłonka w raku prostaty i żyle pępowinowej wykrytą za pomocą swoistego przeciwciała (Ryc. 5C i 11C). Przy okazji dodam, że w przypadku tak niejednoznacznych wyników wypadałoby jednak zbadać swoistość zastosowanego przeciwciała metodą Western-blot z użyciem ekstraktów tkankowych i z komórek hodowanych *in vitro*.

Rozprawa doktorska Pani mgr Stelmaszewskiej zakończona jest trzema wnioskami:

1. Układ FSH-FSHR nie wpływa na biologię komórek raka prostaty i nie uczestniczy w rozwoju unaczynienia wokół ognisk nowotworowych.
2. Układ FSH-FSHR nie odgrywa roli w fizjologicznych procesach angiogenezy.
3. Koniugat peptydu litycznego i podjednostki β FSH-Phor21-FSHβ33-53C/S o specyficznym działaniu można wykorzystać w leczeniu nowotworów z błonową ekspresją FSHR.

Wnioski te wynikają z założonych celów pracy i zostały prawidłowo sformułowane w oparciu o rzeczywiste wyniki uzyskane przez Doktorantkę.

Podsumowując, przedstawiona mi dysertacja spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych z dyscypliny biologia medyczna. Doktorantka wykazała się dużą erudycją i umiejętnością przygotowania pracy naukowej oraz posiadła bogaty warsztat badawczy oparty na bardzo nowoczesnej metodologii badań doświadczalnych. Uwagi zawarte w mojej recenzji mają raczej charakter dyskusyjny i nie mają wpływu na ogólną wysoką ocenę jej rozprawy. Uważam, że Doktorantka osiągnęła stopień dojrzałości naukowej uprawniający ją o ubieganie się o stopień doktora i w związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Odziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Joanny Stelmaszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 10/04/2018

Jacek Malejczyk