

Prof. dr hab. Janusz Szemraj
Zakład, Katedra Biochemii Medycznej
Wydział Nauk o Zdrowiu
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

UNIwersytet Medyczny w ŁODZI
Katedra Biochemii Medycznej
Zakład Biochemii Medycznej
92-215 Łódź, ul. Mazowiecka 6/8
tel. 42-272-56-78, tel./fax 42-272-56-79

Recenzja rozprawy habilitacyjnej i całokształtu dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr. Eweliny Stelcer

Podstawa formalna

Przedstawiona recenzja została wykonana na podstawie decyzji Kanclerza Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. We wniosku o przeprowadzenie przewodu habilitacyjnego z dnia 15 września 2023 r. w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne dr Ewelina Stelcer wskazała Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu jako jednostkę organizacyjną do przeprowadzenia tego przewodu

Jako swoje osiągnięcie naukowe wskazała cykl publikacji pt. „*Wybrane aspekty molekularne raka nadnerczy w oparciu o hodowlę komórek nowotworowych in vitro i przeprowadzone badania transkryptomyczne*”.

Z przedłożonej dokumentacji wynika, że spełnione są wszystkie wymagania formalne niezbędne do przeprowadzenia recenzji. Poniższa recenzja opiera się na kryteriach określonych w Ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U.2023 poz742) i obejmuje trzy najważniejsze elementy składające się na jej dorobek, to jest:

- 1) „*Wybrane aspekty molekularne raka kory nadnerczy w oparciu o hodowlę komórek nowotworowych in vitro i przeprowadzone badania transkryptomyczne*” osiągnięcie naukowe będące przedmiotem postępowania habilitacyjnego,
- 2) pozostałe osiągnięcia naukowe,
- 3) dorobek dydaktyczny i organizacyjny

Wykształcenie i kariera zawodowa Habilitantki

Pani dr Ewelina Stelcer (dalej Habilitantka) ukończyła studia na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu broniąc w 2012 pracę licencjacką uzyskując tytuł inżyniera, a w 2013 pracę magisterską będąc w grupie 5% najlepszych studentów w przypadku obu stopni. W latach 2014-2019 była doktorantką międzynarodowego Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Stopień doktora nauk medycznych obroniła z wyróżnieniem w 2019 r na Wydziale Lekarskim, Centrum Biostruktury, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na podstawie pracy „Badanie mechanizmów różnicowania ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w procesie chondrogenyzy”

Dr Ewelina Stelcer po ukończeniu studiów w latach 2014-2021 pracowała na stanowisku młodszego asystenta w Pracowni Radiobiologii Wielkopolskiego Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej - Curie.

W latach 2019-2021 została zatrudniona na stanowisku post-doc w projekcie NCN Opus „Rola atropiny w regulacji funkcji fizjologicznej kory nadnercza szczura” w Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Od 2021 pracuje jako starszy specjalista naukowo-techniczny w Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Ocena osiągnięcia naukowego będącego przedmiotem postępowania habilitacyjnego

Tytuł osiągnięcia naukowego „Wybrane aspekty molekularne raka kory nadnerczy w oparciu o hodowlę komórek nowotworowych in vitro i przeprowadzone badania transkryptomiczne”.

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl powiązanych tematycznie trzech publikacji o łącznym IF 10,55.

„Atropin stimulates proliferation and inhibits adrenocortical steroidogenesis in the human adrenal carcinoma” opublikowana w czasopiśmie Front Endocrinol 2020 iF 5,555, 100 punktach MNiSW cytowań 16 (Web of Science)

“Biological response of adrenal carcinoma and mieloma cells to mitotane treatment” Oncol lett.2022 IF 2,9 70 punktach MNiSW cytowań 7 (Web of Science)

„ Gene expression profile of hiPSC-derived cells differentiated with growth factors, forskolin and conditioned medium from human adrenocortical cel line” Adv Clin Exp Med. 2023 IF 2,1 140 punktach MNiSW cytowań 1

Wszystkie pozycje dotyczą możliwości leczenia nowotworów nadnerczy. Przewodnim tematem zainteresowań naukowych Habilitantki a w konsekwencji przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego są nowotwory nadnerczy i ich wielokierunkowa zależność od aktywności hormonalnej rozwijającego się guza. Duże problemy związane z tego rodzaju guzami o złym rokowaniu powodują intensywne poszukiwanie nowych leków i terapii pomocnych w leczeniu chorych z nowotworami nadnerczy. Większość badań *in vitro* nowych leków prowadzi się na wyprowadzonych od pacjentów

liniach komórkowych. Badania w ramach osiągnięcia naukowego zależności złośliwości komórek nowotworowych, podatności na leczenie od ich aktywności hormonalnej *in vitro* Habilitantka przeprowadziła na linii ludzkich nowotworowych komórek nadnerczy HAC15 (ATCC, USA), mysiej linii Y1, pierwotnej hodowli komórek nowotworowych nadnerczy.

W pierwszej z cyklu trzech publikacji dr Ewelina Stelcer analizowała wpływ adropiny - hormonu peptydowego o wielokierunkowym działaniu na proliferację, steroidogenezę i aktywność wydzielniczą ludzkich komórek nowotworowych nadnerczy HAC15. Adropina wiążąc się z komórkami nadnerczy za pośrednictwem receptora GPR19 aktywuje szlak sygnałowy MAPK/ERK1/2. W publikacji przedstawiona została analiza wiązania adropiny z receptorem GPR19, ekspresji genów *GPR19*, *ENHO* w zdrowych i nowotworowych komórkach nadnerczy wykorzystując technikę reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym. W oparciu o przeprowadzone badania w tym analizie bioinformatyczną nie wykazano wpływu stymulatorów steroidogenezy: hormonu adrenokortykotropowego ACTH, forskoliny, adropiny, w stężeniach odpowiednio 10^{-7} M, 25mM, 10^{-8} M na ekspresję genów *ENHO*, *GPR 19* na poziomie mRNA, białka (technika Western blot, barwienie immunofluorescencyjne) ' Podanie adropiny w stężeniu 10^{-8} M obniżyło wydzielanie hormonów: aldosteronu, kortyzolu /kortykosteronu w badanych trzech liniach. Podczas gdy podanie adropiny komórkom HAC15 po wcześniejszej ich stymulacją agiotensyną II i forskoliną spowodowało hamowanie steroidogenezy. Analiza ekspresji genów zaangażowanych w steroidogenezę: *StAR*, *CYP11A1*, *CYP 112A* na poziomie mRNA, białka wykazała statystycznie istotne zmniejszenie. Uzyskane wyniki były bodźcem do przeprowadzenia analizy transkryptomicznej komórek HAC15 po 24 godzinnej stymulacji Adropiną, ACTH, forskoliną podanych w stężeniach fizjologicznych. Analiza uzyskanych wyników umiarkowany wpływ adropiny na transkryptom analizowanych komórek (ekspresja 6 genów uległa obniżeniu a 31 zwiększeniu). Wykorzystując bazę GO BP, analizę wzbogacenia grupy genów GSEA udowodniła wpływ podanej adropiny na ekspresję genów zaangażowanych w ścieżkę sygnałową TGF beta. Idąc tym tropem Habilitantka oznaczyła w badanych komórkach HAC15 poziom hormonów związanych ze steroidogenezą po podaniu adropiny i inhibitora kinazy TβR1 który redukuje działanie adropiny. Analiza z kolei wpływu adropiny na proliferację komórek HAC 15 z wykorzystaniem inhibitorów drogi sygnałowej ERK1/2, PI3/AKT, TGFβ wykazała działanie stymulujące podziały komórkowe za pośrednictwem ścieżki ERK1/2 i AKT niezależnie od TGF β. Uzyskane wyniki zostały zweryfikowane pod kątem możliwego wykorzystania w praktyce klinicznej posługując się analizą GEPIA. Przeprowadzona analiza wskazała na potencjalną możliwość analizy ekspresji genu *GPR19* jako negatywnego czynnika prognostycznego progresji nowotworów nadnerczy ze względu na fakt obniżonej ekspresji w komórkach prawidłowych versus podwyższonej w zmianach nowotworowych.

Druga praca cyklu trzech publikacji jest praca dotycząca wpływu głównego leku stosowanego w leczeniu raka nadnerczy mitotanu na komórki czerniaka i nowotworów nadnerczy. Przesłanką do przeprowadzenia tego rodzaju badań była publikacja w której opisano przypadek pacjenta u którego początkowo zdiagnozowano nowotwór nadnerczy – którego leczono mitotanem. W trakcie leczenia zweryfikowano diagnozę na przerzutowego czerniaka o nieznanym pochodzeniu i zaprzestano leczenia mitotanem, co spowodowało szybką progresję choroby. W przedstawionej do oceny pracy Pani doktor postanowiła zbadać wpływ mitotanu na ludzkie komórki czerniaka. W celu osiągnięcia założonych celów zaplanowała analizę proliferacji poddanych działaniu mitotanu komórek, badanie potencjału błony mitochondrialnej, apoptozy, nekrozy, naprawy podwójno-niciowych uszkodzeń DNA czy transkryptomu wymagało wyprowadzenia ludzkiej pierwotnej linii komórkowej przerzutowego czerniaka z lewego nadnercza chorego o zniewalanej pierwotnej lokalizacji. W realizacji badań wykorzystano trzy linie komórkowe: pierwotną linię komórkową czerniaka, komercyjnie dostępną linię metastatyczną czerniaka WM266-4, linię raka nadnerczy HAC15 poddawanych działaniu

mitotanu. Zahamowanie podziałów w badanych komórkach zależne od stężenia zaobserwowano w największym stopniu zaobserwowano w pierwotnej metastatycznej linii komórkowej czerniaka. (97,9%) versus linie WM266-4, HAC15 (63,6%, 16,1%). Analiza potencjału błony mitochondrialnej po dodaniu mitotanu (50 μ M, 24 godziny) wykazała najwyższy spadek w linii HAC15, WM266-4 przy nieistotnym statystycznie spadku w pierwotnej linii czerniaka. Zbliżoną tendencję pokazał pomiar dwuniciowych uszkodzeń DNA z największym przyrostem uszkodzeń dla linii HAC15 (40%), WM266-4 (10%) a nieistotnym statystycznie dla ludzkiej przerzutowej linii czerniaka. Zaobserwowane różnice mogą wynikać z uruchomienia różnych systemów naprawy dwuniciowych uszkodzeń DNA w analizowanych liniach komórkowych co potwierdza wykonana analiza ekspresji genów których produkty białkowe uczestniczą w naprawie DNA takich jak: *TP53, RAD51, BRCA2, PRKDC, XRCC4*. Przykładowo ekspresja genu *RAD51, BRCA1* uległa statystycznie znamiennej obniżeniu w pierwotnej przerzutowej linii czerniaka, podczas gdy *XRCC4* komórkach HAC15. Badanie mechanizmu śmierci komórkowej w badanych komórkach po podaniu mitotanu przeprowadzono analizując ekspresję białka proapoptotycznego BAX jak i antyapoptotycznego BCL-2. W analizowanych komórkach zdecydowanie w większym stopniu dochodzi do nekrozy w porównaniu z apoptozą: HAC15 (60%) WM266-4 (44%), pierwotne komórki raka przerzutowego (czerniaka (72%). Analiza cyklu komórkowego (ekspresji genów których białka zaangażowane są w kontrolę cyklu komórkowego) w komórkach poddanych działaniu mitotanu wykazała zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 we wszystkich analizowanych liniach komórkowych. Kolejnym założonym celem badań była analiza transkryptomowa komórek poddanych działaniu mitotanu. Najsilniejszy efekt mitotanu na strukturę transkryptomu zaobserwowano w przypadku linii HAC15 (zwiększona ekspresja 466 genów, obniżona 411). Zarówno w linii komórkowej HAC15 jak i WM266-4 spadki ekspresji dotyczyły genów których produkty białkowe związane są z podziałami komórkowymi, wzrost w przypadku linii HAC15 dotyczył genów związanych odpowiedzią na stres retikulum endoplazmatycznego, czy negatywną regulacją szlaku sygnałowego ERK1/2. Analiza danych zdeponowanych w bazie TCGA przypadków nowotworów nadnerczy (94) i czerniaków (470) wykazała możliwość wykorzystania obniżonej ekspresji genów *CCNA2, CDCA3, CDCA8, PLK1, CENP1, SGOL1* jako negatywnych czynników prognostycznych tych nowotworów

Ostania trzecia publikacja cyklu podlegająca ocenie dotyczyła otrzymania funkcjonalnej linii komórkowej posiadającej cechy komórek nadnerczowych poprzez różnicowanie ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w oparciu o egzo i endogenne czynniki wzrostowe. Długoterminowe (35-70 dniowe) różnicowanie komórek macierzystych dotyczyło etapu pośredniego polegającego na utworzeniu kul zarodkowych (3 listki zarodkowe) w obecności forskoliny, czynników wzrostowych, pożywki kondycjonowanej pozyskanej z komórek HAC15. Analiza transkryptomu komórek po 35 i 70 dniowym różnicowaniu wykazała istotne statystycznie zmiany w ekspresji genów. Ekspresja 62 genów po 70 dniach różnicowania uległa obniżeniu a 100 wzrosła w porównaniu z wyjściowymi komórkami pluripotencjalnymi. Największe różnice dotyczyły między innymi genów: *CGA, IRS4, PCK1, SYTL5, KLHL4, GABRE*. W oparciu o analizę Go wykazano, że 70 dniowe różnicowanie wpływa między innymi na ekspresję genów regulujących proces transkrypcji, wzrostu śródbłonna naczyń, regulację angiogenezy, śmierć komórki, a w przypadku 35 dniowych spadek ekspresji genów których białka uczestniczą w odpowiedzi na czynniki wzrostowe, regulację komunikacji wewnątrz komórkowej, migrację komórkową, czy rozwój naczyń krwionośnych. Badanie ekspresji genów związanych z różnicowaniem trzech listków zarodkowych endodermy, mezodermy związanych z macierzystością i steroidogenezą: *GATA4, α -SMA wimentyna, PAX6, CD44, CD117, SOX2, StAR, CYP11A2, CYP11B2* oraz zdolności do wydzielania hormonów w odpowiedzi na stymulację ACTH nie pozwalają na stwierdzenie, że otrzymana linia komórkowa z komórek totipotencjalnych posiada cechy komórek nadnerczowych.

Wybrane istotne wyniki trzech publikacji w ramach osiągnięcia naukowego dotyczą wpływu adropiny na komórki nowotworowe raka nadnerczy.

Adropina podana komórkom nowotworowym powoduje obniżenie wydzielania hormonów: kortyzolu, aldosteronu co wpływa na obniżenie ekspresji podstawowych genów dla steroidogenezy : StAR, CYP11A1 Hamowanie steroidogenezy wiąże się ze wzrostem proliferacji zależnej od ścieżek ERK1/2 i AKT w komórkach raka nadnerczy. Istnieje hipotetyczna możliwość wykorzystania oznaczeń ekspresji receptora GPR19 jako negatywnego czynnika prognostycznego u chorych z nowotworami nadnerczy

W kolejnej pracy zanalizowano skuteczność mitotanu w leczeniu raka nadnerczy . W oparciu o badaniach na trzech liniach komórkowych wykazano skuteczność wykorzystania mitotanu w leczeniu raka nadnerczy, zdecydowanie mniejszą w przypadku ustalonej linii komórkowej metastatycznego czerniaka. Na podstawie badań odnoszących się do pacjenta przerzutowego czerniaka o nieznanym pochodzeniu wykazano na wysoka skuteczność leczenia przerzutów czerniaka w nadnerczach cytostatykiem mitotanem

W ostatniej pracy podjęto próbę opracowania metody otrzymania komórek nadnerczowych podczas długoterminowego różnicowania wykazujących cechy komórek pochodzących z trzech listków zarodkowych. Otrzymana linia komórkowa z komórek totipotencjalnych nie pozwala na stwierdzenie , że posiada cechy komórek nadnerczowych Komórki otrzymane w oparciu o przedstawioną metodę mogą być w przyszłości wykorzystane jako prekursorzy endodermy np. komórek trzustkowych, czy opracowania protokołu wydajnego otrzymywania zróżnicowanych komórek z komórek macierzystych hiPSCs

Należy podkreślić, że w każdej przedstawionej do oceny prac w ramach Osiągnięcia naukowego Habilitantka wykazała w wysokim odsetku wkład autorski w postaci: opracowania koncepcji, metodyki badań, interpretacji, przygotowania manuskryptów.

W realizacji badań będących tematem Osiągnięcia dr Ewelina Stelcer wykorzystwała szeroki panel metod biologii molekularnej, które pozwoliły na trafną interpretację uzyskanych wyników. Moje obawy budzi słaba cytowalność poza pierwszą przedstawionych ocenie prac.

Prowadzone sumiennie i dociekliwie badania przez Panią Doktor mogą przełożyć się nie tylko na naukowe ale też praktyczne zastosowanie w leczeniu nowotworów raka nadnerczy.

Nie mam wątpliwości, że jest to wystarczająca podstawa merytoryczna do uznania tej pracy za spełniającą kryteria osiągnięcia naukowego, mogącego stanowić podstawę do nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu , w dyscyplinie nauki medyczne.

Ocena pozostałych osiągnięć naukowych

Dr Ewelina Stelcer posiada doświadczenie w kierowaniu projektami naukowymi. W tym grantu Preludium NCN „ Wpływ terapii przeciwnowotworowych na stabilność genetyczną chondrocytów zróżnicowanych z ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych” . W ramach przyznanego grantu zajmowała się bezpieczeństwem stosowania chondrocytów powstałych w wyniku różnicowania ludzkich komórek pluripotencjalnych macierzystych . Badania transkryptomyczne wykazały zwiększoną ekspresję genów uczestniczących w ścieżkach sygnałowych które podlegają kontroli przez białko p53.

Czterech grantów Dyrektora Wielkopolskiego Centrum Onkologii(WCO)

„Rola mikroRNA w odpowiedzi komórek zróżnicowanych z komórek macierzystych na promieniowanie jonizujące”

Wpływ promieniowania jonizującego na właściwości funkcjonalne chondrocytów pochodzących z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych

Three -dimensional organoid culture system

Ocena poziomu bezpieczeństwa komórek pochodzących z komórek macierzystych podczas terapii przeciwnowotworowych

W latach 2014-2021 brała udział jako wykonawca w grantcie Sonata Bis "Wykorzystanie indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych w regeneracji chrząstki stawowej". Celem projektu było opracowanie metody otrzymywania chondrocytów z ludzkich komórek macierzystych hiPSCs. Doktor Ewelina Stelcer. W trakcie projektu opracowała innowacyjny protokół otrzymywania chondrocytów pochodzących z samodzielnie wygenerowanej linii hiPSCs trwającej 3 tygodnie bez korzystania z konieczności stosowania etapów pośrednich.

Kolejnym etapem w rozwoju naukowym Habilitantki były szczegółowa analiza otrzymanych komórek macierzystych w prekursorzy chondrocytów wykorzystując techniki biologii molekularnej w badaniu transkryptomu. Przeprowadzone badania potwierdziły utratę zdolności do pluripotencji / samoodnowy podczas różnicowania w chondrocyty czynić je bezpieczne w podawaniu pacjentom. Realizując granty Dyrektora Wielkopolskiego Centrum onkologii analizowała wpływ promieniowania jonizującego w zakresie niskich i wysokich dawek na zróżnicowanie z macierzystych komórki. Badania obejmowały naprawę uszkodzeń w DNA i mechanizmy ich naprawy, analizy cyklu komórkowego, syntezy wolnych rodników, śmierci komórkowej, starzenia komórkowego. Zgodnie z oczekiwaniami doszło do specyficznej aktywacji procesów naprawy uszkodzeń DNA (DDR).

Dr Ewelina Stelcer jest współautorem 26 prac naukowych w tym 14 z pierwszym autorstwem. Łączny indeks Hirscha prac wynosi 9 a liczba cytowani 263 (Web of Science). Wyniki prac były prezentowane w postaci 2 doniesień i 8 plakatów na Zjazdach Zagranicznych i 10 krajowych.

Dr Ewelina Stelcer odbyła kilka kursów doszkalających krajowych, 2 zagraniczne.

Ocena dorobku dydaktycznego i organizacyjnego

Dorobek dydaktyczny Habilitantki jest skromny (wykładowca na kursie Podstawy Radiologii, opieka nad studentami odbywającymi staż w Pracowni Radiobiologii). W ramach osiągnięć organizacyjnych przedstawionych do oceny ton wpływ na rozwój Pracowni Radiobiologii. Drugim osiągnięciem była organizacja laboratorium do diagnostyki Covid 19

Współpraca naukowa z jednostkami zagranicznymi. Staże naukowe zagraniczne

Brak

Współpraca naukowa z jednostkami krajowymi

Centrum Biostruktury , Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Wnioski końcowe

Po wnikliwej analizie dostępnych materiałów, dokumentujących osiągnięcie naukowe w postaci trzech publikacji, oraz przedstawionej aktywności naukowej, dydaktycznej, organizacyjnej stwierdzam, że Kandydatka dr Ewelina Stecler spełnia zwyczajowe formalne wymogi określone w artykule 187 ustęp 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023.742) do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne. W związku z powyższym wnoszę do Komisji Habilitacyjnej w celu przeprowadzenia postępowania habilitacyjnego dr Eweliny Stelcer oraz do Rady Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu o podjęcie uchwały o nadaniu dr Ewelinie Stelcer stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

2024-04-19

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Janusz Szemraj
Prof. dr hab. n. med. Janusz Szemraj