

Prof. dr hab. Krystyna Kozić
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt ” **Selektywny modulator receptora androgenowego- ostaryna (enobosarm, GTx024) jako regulator funkcji tkanki mięśniowej- badania *in vivo* i *in vitro***” wykonanej przez **mgr Natalię Leciejewską**
w Katedrze Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
pod kierunkiem promotora Pani dr hab. Ewy Pruszyńskiej-Oszmałek
w dyscyplinie naukowej: zootechnika i rybactwo

Charakterystyka przebiegu pracy naukowej Doktorantki

Pani Natalia Leciejewska uzyskała tytuł magistra w 2017 roku na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, po ukończeniu studiów kontynuowała wykształcenie jako słuchaczka studiów doktoranckich Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W okresie od lutego 2019 roku do września 2020 roku była zatrudniona w Katedrze Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu jako starszy referent techniczny. W październiku 2020 roku zatrudniono Panią mgr Leciejewską na stanowisku asystenta w macierzystej Katedrze, na którym nadal pracuje. Zgodnie z informacjami zamieszczonymi w ResearchGate Doktorantka jest współautorką 21 prac naukowych opublikowanych w indeksowanych czasopismach o szerokim zasięgu, które były cytowane w ponad 130 innych opracowaniach naukowych. Obliczony na podstawie tych danych indeks Hirscha wynosi 6. Niewątpliwie, ten duży dorobek naukowy wymagał nie tylko ogromnego zaangażowania Doktorantki, ale także wszechstronnej pomocy ze strony Kierownictwa Katedry i Opiekuna naukowego/Promotora pracy doktorskiej. Należy także podkreślić, iż koszty prowadzenia doświadczeń do pracy doktorskiej były współfinansowane z projektu kierowanego przez mgr Leciejewską uzyskanego w ramach konkursu Preludium 18 nr 2019/35/N/NZ7/00738 organizowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Oceniana rozprawa doktorska składa się z dwóch oryginalnych prac opublikowanych w 2022 i 2023 roku, w których mgr Leciejewska jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. Pozostali współautorzy potwierdzili wiodący udział mgr Leciejewskiej na każdym etapie tworzenia tych publikacji-planowania doświadczeń, wykonywania analiz, interpretacji oraz dyskusji wyników, pisania manuskryptów i ich korekty. Naukometryczne wskaźniki dotyczące publikacji są wysokie: łączny IF wynosi 9,7, liczba punktów MEiN wynosi 240.

1. Leciejewska Natalia, Kołodziejski Paweł A., Sassek Maciej, Nogowski Leszek, Małek Emilian, Pruszyńska-Oszmałek Ewa. Ostarine-Induced Myogenic Differentiation in C2C12, L6, and Rat Muscles. *International Journal of Molecular Science*. 2022 Apr 15;23(8):4404. MEiN= 140, Impact factor: 5,6.

2. Leciejewska Natalia, Pruszyńska-Oszmałek Ewa, Nogowski Leszek, Sassek Maciej, Strowski Mathias Z, Kołodziejski Paweł A. Sex-specific cytotoxicity of ostarine in cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2023 Aug 3;577:112037. MEiN= 100 , Impact factor: 4,1.

Ponadto, mgr Leciejewska dołączyła do tych publikacji obszerne uzasadnienie celu pracy wskazując na konieczność prowadzonych badań, formułując hipotezę badawczą oraz przedstawiając istniejący stan wiedzy w zakresie badanego problemu. Na podkreślenie zasługuje szczegółowy opis metod i metodyk stosowanych podczas analiz laboratoryjnych oraz logiczny opis i dyskusja uzyskanych wyników.

Zgodnie z zapisami ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne a publikacje wchodzące w jej skład istotnie poszerzają wiedzę o działaniu ostariny w regulacji funkcji mięśni poprzecznie prążkowanych i mięśnia sercowego.

Ocena merytoryczna celu i etapów realizacji pracy doktorskiej

Ostarina, selektywny modulator receptora androgenowego, została odkryta w wyniku intensywnych poszukiwań substancji, które mogłyby działać troficznie w mięśniach ale z ograniczonym działaniem androgennym. Długoletnie badania nad poznaniem mechanizmu oddziaływania ligandów ze specyficznymi receptorami pozwoliły na syntezę selektywnych modulatorów receptora androgenowego (ang. selective androgen receptor modulator, SARM). W ostatnich latach ubiegłego wieku zsyntetyzowano wiele takich niesteroidowych związków jednak ze względu na negatywne/nieprzewidywalne skutki uboczne żaden z nich nie uzyskał akceptacji przez amerykańską Agencję Żywności i Leków lub Europejską Agencję Leków

jako środek leczniczy. Niestety są one nielegalnie stosowane jako anaboliki w sporcie lub jako związki wspomagające metabolizm lipidów i zwiększenie wytrzymałości fizycznej organizmu. Rozpoczęto też wielokierunkowe badania kliniczne, wśród których ostaryna (enobosarm) była i jest najczęściej badanym przedstawicielem SARMów. Na uwagę zasługują wyniki wskazujące na niewielką poprawę insulinowrażliwości, pozytywny wpływ na wzrost gęstości kości, istotny wzrost masy mięśniowej u pacjentów z kacheksją nowotworową, ale odnotowano także skutki uboczne takie jak nasilenie przerzutowania nowotworu, neutropenia i zapalenie płuc. Wnioski z wielu badań klinicznych, oprócz optymistycznych doniesień o pozytywnym działaniu ostaryny jako skutecznym i bezpiecznym terapeutycznym, wskazują na konieczność dalszych długoterminowych badań także z udziałem modeli zwierzęcych.

Pani mgr Leciejewska opracowała obszerny przegląd literatury naukowej kolejno opisując: fizjologiczną i patofizjologiczną rolę androgenów, funkcje i specyfikę mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego oraz działanie selektywnych modulatorów receptora androgenowego. W interesujący sposób przedstawiła zarówno pozytywne, potencjalnie terapeutyczne działanie ostaryny jak i negatywne skutki uboczne występujące u ludzi zażywających ten związek jako środek anaboliczny.

Uzasadniając przyczyny skłaniające do podjęcia badań w tym zakresie Doktorantka stwierdziła, że przy istniejącym stanie prawnym jedynym źródłem wiedzy o skutkach nadużywania tych substancji mogą być eksperymenty z wykorzystaniem linii komórkowych i modeli zwierzęcych. Zwróciła także uwagę, że niewiele jest wiadomo o molekularnych mechanizmach działania SARMów, a powszechna opinia o możliwości wnioskowania o skutkach ich stosowania na podstawie analogii do efektów wywieranych przez steroidy anaboliczno-androgenne jest błędna. Pani mgr Leciejewska sugeruje, iż działanie SARMów wymaga odmiennej rekrutacji białek regulatorowych w tkankach.

Doktorantka odważnie podjęła się bardzo trudnego zadania chcąc poznać anaboliczny efekt ostaryny (enobosarmu, Gtx-024, MK-2866) w mięśniach szkieletowych oraz ewentualne negatywne skutki działania na komórki mięśnia sercowego. Ponadto, Doktorantka sformułowała hipotezy badawcze dość szczegółowo wskazujące na:

1. anaboliczne, prawdopodobnie poprzez receptor androgenowy, działanie ostaryny, stymulowanie proliferacji i różnicowanie komórek mioblastów linii C2C12, L6 oraz komórek mięśnia szkieletowego szczura (doświadczenie 1, badania *in vivo* i *in vitro*);

2. promowanie przez ostarinę patologicznych, uzależnionych od płci, zmian w komórkach serca zapoczątkowujących kardiomiopatię i włóknienie tkanki prawdopodobnie zachodzących poprzez receptor androgenowy (doświadczenie 2, badania *in vivo* i *in vitro*);
3. istotny wpływ egzogennej ostariny na ogólnoustrojowe zmiany testosteronu oraz frakcji cholesterolu (badania *in vivo*).

Przystępując do weryfikacji hipotez Doktorantka zaplanowała zadania badawcze zrealizowane w doświadczeniu *in vivo* przy użyciu szczurów i dwóch doświadczeniach *in vitro*, w których modelem doświadczalnym były komórki linii C2C12 i L6 (mioblasty gryzoni) oraz kardiomiocyty szczura H9C2. Zarówno zadania badawcze jak i doświadczenia zostały szczegółowo przedstawione w opisie rozprawy doktorskiej oraz w obydwu publikacjach.

Opiniując cel, hipotezy badawcze oraz zadania badawcze uważam, że zostały one prawidłowo zaplanowane, tym samym potwierdzając szeroką wiedzę Doktorantki na temat roli ostariny w modulowaniu pozytywnego jak i negatywnego wpływu na funkcje komórek mięśni poprzecznie prążkowanych i mięśnia sercowego.

Ocena wyboru materiałów i metod badawczych

Doświadczenie *in vivo* przeprowadzono na szczurach (samcach) otrzymujących podskórne iniekcje 0,4 mg/kg m.c. ostariny przez 30 dni. W pobranych tkankach-mięśniu czworogłowym oraz mięśniu poprzecznie prążkowanym serca określano wpływ ostariny na:

- zmiany ekspresji genów – przy użyciu metody qPCR;
- zmiany w ekspresji białek – przy użyciu metody Western blot oraz testu immunoenzymatycznego ELISA;
- zmiany morfologiczne w tkance mięśnia szkieletowego – przy użyciu metod immunohistochemicznych i immunofluorescencji.

Natomiast w surowicy krwi określano - zmiany w stężeniu testosteronu (ELISA) oraz zmiany w koncentracji cholesterolu całkowitego, frakcji LDL i HDL (testy kolorymetryczne).

Doktorantka wykonała także dwa doświadczenia w warunkach *in vitro*:

1. Model komórkowy – zastosowano linie komórkowe mioblastów C2C12 (szczurzych) oraz L6 (mysich). Ocenę żywotności i stopnia proliferacji komórek przeprowadzono na komórkach niezróżnicowanych w podstawowym medium eksperymentalnym testami kolorymetrycznymi odpowiednio z zastosowaniem 5'-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU) oraz

testem MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazoliowy). Ponadto wykonano procedurę różnicowania i blokowano ekspresję receptora androgenowego oraz aktywność kinazy ERK1/2.

Podczas eksperymentu oceniano wpływ ostaryny na:

- zmiany ekspresji genów w procesie różnicowania – metodą qPCR;
- zmiany ekspresji białek w procesie różnicowania oraz fosforylację kinazy ERK – metodą Western blot;
- zmiany morfologiczne w procesie różnicowania – metodą immunohistochemiczną.

2. W drugim eksperymencie użyto modelu komórkowego kardiomiocytów, którym była szczurza linia komórkowa H9C2 pozyskana z serca embrionu samicy szczura. Podobnie jak w eksperymencie pierwszym wykonano procedurę różnicowania, a pozyskane komórki poddano analizie. Ponadto, wykonano hodowlę pierwotną fibroblastów serca izolowanych z serc samic i samców szczurów stada nie krewniaczego Wistar.

Podczas eksperymentu oceniano wpływ ostaryny na:

- zmiany ekspresji genów w procesie różnicowania komórek H9C2 – metodą qPCR;
- zmiany ekspresji białek w procesie różnicowania komórek H9C2 – metodą Western blot;
- zmiany ekspresji receptora androgenowego w niezróżnicowanych i zróżnicowanych komórkach H9C2;
- zmiany ekspresji receptora androgenowego w komórkach fibroblastów serca pozyskanych od samców i samic szczura;
- zmiany ekspresji genów i białek związanych z procesem włóknienia w komórkach serca – przy użyciu metod qPCR i Western blot;
- zmiany aktywności dehydrogenazy mleczanowej – przy użyciu testu kolorymetrycznego;
- zmiany w przeżywalności komórek H9C2 oraz serca – przy użyciu testu MTT.

We wszystkich eksperymentach Doktorantka analizowała i oceniała zmiany ekspresji aż 13 genów (szczurzych) i 3 genów mysich zaangażowanych w procesy różnicowania, proliferacji bądź włóknienia komórek.

Wyniki zostały poddane analizie statystycznej przy zastosowaniu odpowiednich metod, czytelnie przedstawione graficznie w publikacjach i dokładnie opisane w streszczeniu rozprawy doktorskiej. Uzyskane wyniki opublikowano w dwóch pracach, oddzielnie dla mięśni szkieletowych i sercowego. W obu publikacjach zaprezentowano układ *in vivo* i *in vitro* doświadczeń, procedury przygotowania materiału badawczego oraz analizy badanych parametrów.

Mgr Natalia Leciejewska zastosowała adekwatne i nowoczesne metody oraz metodyki badawcze do realizacji założonego celu: inkubacje i hodowle komórek w *in vitro* warunkach, metody molekularne do oceny ekspresji genów, metodę immunofluorescencyjną i immunoenzymatyczną. Zwracam także uwagę na doskonale opanowanie przez Doktorantkę wszystkich zastosowanych metod. Wybór zwierzęcego modelu doświadczalnego – szczura oraz linii komórkowych był trafny, adekwatny do założonych celów badań. Uzyskane wyniki są istotne nie tylko dla badaczy zajmujących się mechanizmami funkcjonowania mięśni, ale stanowią także ważny wkład w poznanie procesów fizjologicznych i patologicznych w tak trudnym materiale badawczym jakim jest serce i mięśnie szkieletowe.

Ocena uzyskanych wyników, ich interpretacji oraz wniosków

Ze względu na merytorycznie uzasadniony układ prezentowania wyników w obydwu publikacjach i dokładną ich dyskusję już ocenioną przez recenzentów manuskryptów, nie będę oddzielnie analizowała uzyskanych wyników, lecz zaopiniuję adekwatność tych rezultatów do założonego celu rozprawy doktorskiej.

W pierwszej publikacji Doktorantka przedstawiła wyniki dotyczące roli ostaryny w modulowaniu proliferacji, żywotności oraz różnicowaniu komórek linii C2C12 and L6 . Stwierdzono, że ostaryna stymulowała te procesy za pośrednictwem receptora androgenowego, ponadto ostaryna potęgowała proces proliferacji komórek bez wpływu na ich przeżywalność. Doktorantka podkreśliła odmiennosc tych wyników w porównaniu do doniesień literaturowych tłumacząc je zróżnicowaną aktywnością zdrowych i patologicznych komórek. Pani mgr Leciejewska zwróciła uwagę na ograniczenia przeprowadzonych badań wskazując między innymi na brak identyfikacji specyficznych szlaków wewnątrzkomórkowych modulowanych przez ostarynę, zastosowanie tylko chemicznej blokady receptora androgenowego, prowadzenie badań z użyciem komórek jednej płci, brak badań w warunkach *in vivo*. Dlatego też wniosek z prezentowanych w tej publikacji wyników jest bardzo ostrożny potwierdzający wpływ ostaryny na proliferację, żywotność i proces różnicowania komórek mięśniowych z jednoczesnym wskazaniem na konieczność prowadzenia dalszych szeroko zakrojonych badań.

W drugiej publikacji mgr Leciejewska przedyskutowała wyniki dotyczące wpływu ostaryny na toksemię oraz proces zwłóknienia serca otrzymane z doświadczeń z użyciem linii komórkowej kardiomiocytów oraz pierwotnych fibroblastów pozyskanych z serca szczura.

Uzyskane wyniki wskazały, że ostaryna zwiększa ekspresję receptora androgenowego w sercu samców w doświadczeniu *in vivo* oraz w komórkach fibroblastów pozyskanych z serc samców w doświadczeniu *in vitro*; stymuluje różnicowanie kardiomioblastów H9C2 oraz zmiany włóknieniowe w komórkach fibroblastów pozyskanych z serc samców. Stwierdzono także obniżenie pod wpływem ostaryny żywotności fibroblastów pozyskanych z serc samców oraz kardiotoksyczne działanie tego SARMu poprzez promocję zmian kardiomiopatycznych i włóknieniowych w komórkach serca. Podobnie jak w poprzedniej pracy Doktorantka przedstawiła ograniczenia tych badań, które polegały na braku możliwości pozyskania odpowiedniego materiału badawczego. Należy jednak podkreślić, że pomimo tych problemów uzyskane wyniki po raz pierwszy udowodniły niepożądany wpływ ostaryny na rozwój patologicznych procesów w sercu.

Na podstawie wyników przedstawionych w opublikowanych pracach Doktorantka szczegółowo sformułowała stwierdzenia dla każdego eksperymentu, które są bardziej podsumowaniem uzyskanych wyników niż wnioskami.

Najważniejszymi uogólnionymi wnioskami są stwierdzenia:

1. ostaryna jest modulatorem czynności komórek tkanki mięśniowej szkieletowej poprzez wpływ na procesy przeżywalności, proliferacji i różnicowania;
2. ostaryna może regulować w tkance mięśniowej serca procesy przeżywalności i różnicowania;
3. działanie ostaryny w mięśniu sercowym charakteryzuje się nasileniem zmian kardiomiopatycznych i włóknieniowych;
4. ostaryna jest związkiem o działaniu anabolicznym i potencjalnie toksycznym dla komórek serca.
5. ostaryna działa poprzez receptor androgenowy stąd też jej efekt należy studiować równoległe u obu płci zwierząt.

Wyniki badań *in vivo* i *in vitro* zostały przez mgr Leciejewską logicznie i przejrzysto zwizualizowane na schemacie (Ryc. 6) zamieszczonym w uzasadnieniu.

Najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawione w rozprawie doktorskiej uważam:

1. wykazanie istotnego wpływu ostaryny na komórki mięśniowe i fibroblasty serca zarówno w warunkach *in vivo* i *in vitro*;
2. wskazanie drogi działania ostaryny poprzez receptor androgenowy;
3. sugestię dotyczącą mechanizmu ogólnoustrojowego działania ostaryny sformułowaną na podstawie obniżonego stężenia testosteronu i cholesterolu w krwi szczurów;
4. wskazanie przez Doktorantkę czynników limitujących wyciąganie ostatecznych wniosków dotyczących działania ostaryny.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na kilka elementów, które mogłyby udoskonalić dalszą pracę nad tymi związkami:

1. uściślenie roli ostaryny jako agonisty bądź antagonisty receptora androgenowego, termin „modulator” pomimo jego powszechnego stosowania jest dość ogólny;
2. odważniej sformułować ostateczny wniosek odpowiadając na pytanie: dlaczego do tej pory ostaryna nie ma prawnego statusu związku terapeutycznego;
3. próbować nakreślić kierunek dalszych badań nad tym SARMem przełamujący obecne bariery eksperymentalne.

Powyższe uwagi nie są zarzutami lecz próbą rozpoczęcia dyskusji z Doktorantką podczas obrony rozprawy doktorskiej.

Podsumowanie

Te drobne uwagi zamieszczone w powyższej opinii nie umniejszają mojej wysokiej oceny uzyskanych wyników, ich dyskusji i sposobu przedstawienia w dwóch publikacjach oraz obszernym opracowaniu, które w pełni odpowiadają tematowi rozprawy doktorskiej. Pani mgr Leciejewska zweryfikowała hipotezy badawcze oraz zrealizowała zaplanowany cel badań uzyskując interesujące wyniki.

Ponadto, podjęcie przez Doktorantkę próby zmierzenia się z tak trudnym problemem jakim było określenie wpływu ostaryny na modulowanie metabolizmu komórek mięśniowych i sercowych zarówno na poziomie molekularnym, komórkowym jak i ogólnoustrojowym w warunkach *in vivo* i *in vitro* uznaję za celowe i nowatorskie. Poza aspektami poznawczymi wyniki mogą być przydatne dla specjalistów zajmujących się poprawą kondycji wycieńczonych chorobą pacjentów, a także przyczynić się do ograniczenia dostępu do niedozwolonych anaboliów.

Wniosek końcowy

Uważam, że oceniana praca spełnia wszelkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016 r. poz. 882 z późn. zm.) , w związku z art. 179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r.poz.1669) oraz w paragrafie 6 ust. 5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z prośbą o dopuszczenie Pani mgr Natalii Leciejewskiej do dalszych etapów przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim wszczętym w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Biorąc pod uwagę zakres wykonywanych doświadczeń, analiz oraz bardzo dobrą interpretację nowatorskich wyników opublikowanych w czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z prośbą o rozważenie wyróżnienia rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Leciejewskiej.

Krzysztof Kosić

Krzysztof Kosić 6. listopada 2023r.