

**Ocena rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Leciejewskiej
w związku postępowaniem o nadanie stopnia doktora
w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo**

Pani mgr inż. Natalia Leciejewska ukończyła w 2017 roku studia magisterskie na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Uprzednio nie ubiegała się o nadanie stopnia doktora. W okresie 02.2019 - 30.09.2020 była zatrudniona na etacie starszego referenta technicznego w Katedrze Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt, a następnie tj. od października 2020 jest asystentką w tej Katedrze na UP w Poznaniu. Doktorantka przedłożyła do oceny rozprawę doktorską w formie cyklu dwóch oryginalnych artykułów wymienionych na str. 3 rozprawy, opublikowanych w indeksowanych czasopismach naukowych, podsumowanych w formie pracy doktorskiej (w zasadzie autoreferatu, gdyż manuskrypt nie zawiera szczegółowych wyników badań, większości rycin i tabel) pod wspólnym tytułem p.t. „Selektywny modulator receptora androgenowego - ostarina (enobosarm, GTx024) jako regulator funkcji tkanki mięśniowej - badania *in vivo* i *in vitro*”. Promotorką tej rozprawy jest pani dr hab. Ewa Pruszyńska-Oszmałek. Praca doktorska została opracowana w Katedrze Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Jak wynika z dokumentacji postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora toczy się w oparciu przepisy Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (nazywanej w dalszej części recenzji Ustawą). Badania będące przedmiotem rozprawy zostały przeprowadzone przy wsparciu finansowym z dwóch projektów badawczych: własnego grantu doktorantki Preludium 18 NCN nr 2019/35/N/NZ7/00738 oraz dodatkowo były wsparte finansowaniem z projektu Regionalna Inicjatywa Doskonałości MNiSW dla Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Fakt zdobycia w trybie konkursowym projektu NCN jest znaczącym osiągnięciem, pozytywnie wyróżniającym doktorantkę, świadczącym także o umiejętności właściwego planowania badań wnioskującego zespołu.

W skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską wchodzi następujące publikacje:

- Leciejewska Natalia, Kołodziejcki 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.

- Leciejewska Natalia, Pruszyńska-Oszmałek Ewa, Nogowski Leszek, Sassek Maciej, Strowski Mathias Z, Kołodziejcki Paweł A. Sex-specific cytotoxicity of ostarine in cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2023 Aug 3;577:112037.

Łącznie te publikacje odpowiadają wartości współczynnika *Impact Factor* 9.7 i 240 punktom MEiN. Te dane bibliometryczne wskazują, że teksty artykułów zostały ulokowane w czasopismach o wysokim poziomie naukowym. *International Journal of Molecular Science* należy do pierwszego kwartyła (Q1) w dziedzinie BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, czasopismo *Molecular and Cellular Endocrinology* należy w kilku dziedzinach do 2 kwartyła (Q2). Pierwsza publikacja z roku 2022 została już trzykrotnie cytowana (wg. Web of Science).

Dwie publikacje stanowi cykl będący rozprawą doktorską są opublikowane w języku angielskim i opisują wykonane eksperymenty, przedstawione w typowym dla badań biomedycznych układzie tj. z podziałem na streszczenie, wstęp, opis materiału badawczego i metod, wyników oraz dyskusję i wykaz cytowanego piśmiennictwa. Wyniki badań opisanych w tych publikacjach są podsumowane pracą w języku polskim, ze streszczeniami w językach polskim i angielskim, o podobnym podziale tekstu na główne części. Na koniec pracy doktorskiej zamieszczone są oświadczenia współautorów publikacji pani Leciejewskiej, wskazujące na rolę jaką pełnili w przygotowaniu tych artykułów, a z treści tych oświadczeń wynika, że udział doktorantki w przeprowadzeniu badań, analizie wyników i przygotowaniu tekstu publikacji był dominujący, co jest oczekiwane w przypadku przygotowania doktoratu na podstawie prac wieloautorskich. Nie mam zastrzeżeń do przedstawionej dokumentacji. Należy też stwierdzić, że sam tekst pracy doktorskiej jest przygotowany starannie, zgodnie z kanonami przygotowania rozpraw naukowych. Drobne uchybienia literowe i interpunkcyjne wskazują na końcu recenzji. Tekst rozprawy (autoreferatu) obejmuje 75 stron. Dwie publikacje liczą dodatkowo 15 i 10 stron wydruku, co jest objętością standardową dla artykułów naukowych w ocenianej dziedzinie.

Badania pani mgr Leciejewskiej dotyczą skutków działania ostariny; jest to związek zwany również Enobosarm lub MK-2866, który należy do grupy SARMów – selektywnych modulatorów receptorów androgenowych, o działaniu anabolicznym. Jak podkreśla w autoreferacie doktorantka, ostarina budzi zainteresowanie farmakologii, ale także jest stosowana przez osoby trenujące w zasadzie bez nadzoru, a w Internecie jest reklamowana jako środek powodujący poprawę kondycji, wzrost masy mięśniowej i siły oraz wytrzymałości (co zasadzie jest pewną sprzecznością). Niemniej liczba badań na temat jej działania jest stosunkowo niewielka – w PubMed pod hasłem „ostarine” można znaleźć na dzień przygotowania recenzji zaledwie 61 publikacji, „enobosarm” – 81 publikacji, lub „MK-2866” – 62 publikacje (są to w większości tożsame). Dla kontrastu, pod hasłem „Anadrol” (jest to nazwa handlowa jednego z silniejszych leków androgennych) w PubMed można znaleźć ponad 500 publikacji. Fakty te uzasadniają celowość prowadzenia badań nad działaniem ostariny. Dodatkowo, potrzebę badań skutków działania tej substancji podkreśla możliwość

jej wykorzystania jako potencjalnego leku przeciwdziałającego spadkowi masy mięśniowej, obecnemu w różnych chorobach czy pojawiającemu się w procesie starzenia się organizmu, czy też jako leku wspomagającego rehabilitację. Wreszcie, jako temat do dyskusji na obronie pozostaje potencjalne wykorzystanie tego związku (lub innych o działaniu anabolicznym) w produkcji zwierzęcej, nie poruszane w rozprawie, a zapewne interesujące na macierzystym wydziale doktorantki.

Autorka rozprawy przyjęła hipotezę badawczą, że ostaryna moduluje metabolizm komórek mięśni szkieletowych i serca. Wyniki badań opublikowane w dwóch artykułach potwierdzają tę hipotezę.

Celem pierwszego z dwu artykułów stanowiących rozprawę doktorską pani Leciejewskiej było zbadanie wpływu ostaryny na różnicowanie i metabolizm mięśni szkieletowych. W tym celu badano komórki C2C12 i L6 oraz mięśnie uzyskane od szczurów. Wykazano, że ostaryna (podawana testowo w różnych dawkach) stymuluje proliferację komórek C2C12 i L6 oraz zwiększa ich żywotność, oraz że w tym działaniu pośredniczą receptor androgenowy (AR) i aktywacja kinazy ERK1/2. Autorzy badań odkryli również, że ostaryna stymuluje różnicowanie komórek mięśniowych poprzez zwiększenie miogeniny, MyoD i ekspresję MyH w obu badanych typach komórek. Dodatkowo wykazano, że 30-dniowe podawania ostaryny zwiększa ekspresję miogeniny, MyoD i MyH, a także masę mięśniową u badanych szczurów. Badania podsumowano stwierdzeniem, że ostaryna stymuluje proliferację i różnicowanie tkanki mięśniowej poprzez receptor androgenowy. Badania w ramach tych eksperymentów prowadzono na samcach szczurów. W dyskusji publikacji, w omówieniu ograniczeń badań fakt wykonania doświadczeń na zwierzętach jednej płci – samcach, wskazano jako jedną ze słabości. Mam więc do tej części rozprawy pytanie, czy i jak różnice międzypłciowe np. składu włókien mięśniowych, hormonów czy masy mięśni mogą wiązać się z potencjalnym zróżnicowaniem wpływu ostaryny na mięśnie osobników różnej płci.

Z kolei w drugim artykule badania skupiły się na efektach podawania ostaryny w odniesieniu do serca. Badania te były inspirowane obserwacjami, że nadużywanie tego środka w większych dawkach może prowadzić do poważnych skutków ubocznych w odniesieniu także do tego organu. W badaniach wykorzystano linię komórkową kardiomiocytów H9C2, wyizolowane pierwotne żeńskie i męskie komórki fibroblastów serca, a także same serca uzyskane od szczurów doświadczalnych. Wykazano interesujący i zróżnicowany płciowo efekt, mianowicie ostaryna zwiększała akumulację dwóch markerów białek zwłóknienia, α SMA i fibronektyny w męskich komórkach fibroblastów, ale nie w żeńskich. Ostaryna zwiększała także ekspresję markera kardiomiopatii β Mhc w linii komórkowej H9C2 i w sercu szczurów. Te niekorzystne zmiany zaobserwowano przy wysokich dawkach ostaryny. Ponadto, już przy najniższej zastosowanej dawce ostaryny (1 nmoL/l) obserwowano spadek żywotności i wzrost markera cytotoksyczności LDH. Badania

podsumowano sugestią, że badany związek jest kardi toksyczny, co może być bardziej istotne dla mężczyzn niż dla kobiet.

Wyniki badań uzyskane w ramach obu serii doświadczeń na komórkach mięśniowych i mięśniach szkieletowych, jak i na komórkach sercowych lub sercach zwierząt doświadczalnych są oryginalne, poszerzają w istotny sposób wiedzę o działaniu ostaryny na organizm. Badania te niewątpliwie należą do badań podstawowych, ale wyniki badań przyczyniają się także do potencjalnego wykorzystania tych badań w odniesieniu do zastosowania farmakologicznego ostaryny. W związku z powyższym można stwierdzić, że przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, czyli poszerzenie wiedzy w zakresie działania ostaryny na mięśnie szkieletowe i serce. Wyniki doświadczeń przedstawionych w obu publikacjach mają charakter komplementarny, więc można też bez wątpliwości uznać, że razem obie przedstawione do oceny publikacje stanowią cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Te spostrzeżenia pozwalają podsumować, że ustawowe wymogi określone w par. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. są spełnione.

W ocenie rozprawy doktorskiej pani Leciejewskiej należy także zwrócić uwagę na wysoki poziom badań laboratoryjnych i fakt wykorzystania około 20 różnych technik badawczych. Wskazuje to na staranne i wieloaspektowe rozpracowanie problemu, oraz podnosi ocenę wyników badań. Ponadto, pozytywnie należy ocenić fakt, że cytowane piśmiennictwo (w autoreferacie) - 114 pozycji, jest bardzo aktualne, w zdecydowanej większości opublikowane po roku 2000, w większości w ostatniej dekadzie. Wskazuje to, że problem badawczy pani Leciejewskiej jest aktualny, pracują nad tą problematyką także inne, dość liczne zespoły i dlatego można oczekiwać, że wyniki badań spotkają się dużym zainteresowaniem środowiska naukowego. Wreszcie, pozytywnie zwraca uwagę czytelne, graficzne przedstawienie podsumowania wyników w postaci ryc. 6 (na str. 61 autoreferatu). Tego typu opracowania prostej, graficznej prezentacji głównego wyniku dla niespecjalistów coraz częściej wymagane są przez redakcje ambitnych czasopism naukowych.

W dyskusji wyników badań zarówno w publikacjach jak i autoreferacie rozprawy doktorskiej brakuje w moim przekonaniu dogłębnego omówienia znaczenia wyników w kontekście przeniesienia obserwacji z modeli zwierzęcych i badań *in vivo* lub *in vitro* na ludzi, a także ich wykorzystania w praktyce farmakologicznej oraz w relacji do konsekwencji i skutków stosowania jako ostaryny w celu dopingowania sportowego lub suplementacji w treningu amatorskim. Te tematy chciałbym przedyskutować podczas obrony. Mam także pewne wątpliwości natury formalnej, dotyczące przedstawienia części wyników badań wyłącznie w autoreferacie (rozdział 7.3. Wyniki dodatkowe, na stronie 48). Ustawa w art. 187 p. 3 przewiduje, że „Rozprawę doktorską może stanowić praca pisemna, w tym monografia naukowa, zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych...” więc dla czystości proceduralnej byłoby lepiej poprzestać na przedłożeniu wyników

opublikowanych „w powiązanych tematycznie artykułach naukowych” pomijając dodatkową formę „pracy pisemnej” – w tym przypadku autoreferatu rozprawy doktorskiej dla prezentacji części wyników.

Podczas lektury rozprawy dostrzegłem drobne uchybienia edytorskie, z obowiązku recenzenta wskazuję kilka przykładowych:

- w publikacji “Ostarine-Induced Myogenic Differentiation...” afiliacja Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu jest podana w dwóch różnych wersjach (¹ Poznan University of Life Sciences, lub ² University of Life Sciences);

- w autoreferacie, który jest w języku polskim forma cytowania piśmiennictwa wieloautorskiego powinna być raczej „i wsp.” niż zgodna z językiem angielskim „et al.”, a także „i” zamiast dwóch stosowanych form: „and” lub „&;”;

- autoreferat str. 14 „za pośrednictwem, którego ligandy” powinno być bez przecinka;

- w kilkunastu miejscach brak spacji np. przed myślnikami str. 19 „badań- od 20%” czy przy podawaniu dat str. 21 „1999r.” lub „2018r”, lub jednostek str. 30 „10 000nM”, str. 34 „10μM”;

- błędy literowe np., str. 41 „jadrami”, str. 50 „w tanach”, str. 53 „badan”;

- brak zamknięcia nawiasu, str. 50 „(Pi et al. 2015 Aktywacja kinazy ERK...” lub nieprawidłowe cytowanie str. 56 „(Machek et al. 2020) (Machek B 2020).”;

- dla poz. 41 piśmiennictwa w autoreferacie brakuje wskazania czasopisma.

Tego typu błędy, których trudno ustrzec się w długim tekście, nie obniżają merytorycznej wartości pracy doktorskiej.

Uwagi końcowe

Podsumowując ostatecznie ocenę rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Leciejewskiej należy uznać, że nie tylko stanowi bez zastrzeżeń wypełnienie ustawowych wymogów (określonych w art. 187 Ustawy), ale jej wartość naukowa przekracza przeciętny poziom rozpraw doktorskich i środowiskowe oczekiwania formułowane wobec kandydatów do stopnia doktora. Ta konkluzja wiąże się z wysokim poziomem prowadzonych badań, ich oryginalnością, wykorzystania licznych technik laboratoryjnych. Pewną słabością rozprawy są drobne uchybienia redakcyjne, czy wątpliwości odnoszące się podania części wyników w rozprawie, a części w publikacjach z ocenianego cyklu, nie wpływające jednak merytorycznie na jej wartość naukową, a wyrażone w recenzji uwagi to głównie pytania recenzenta do dyskusji na obronie. W związku z powyższym uważam, że pozytywnie oceniam przedłożoną rozprawę i uważam, że pani mgr Natalia Leciejewska powinna być dopuszczona do końcowych etapów postępowania doktorskiego. Ze względów przedstawionych powyżej uważam także, że przedstawioną pracę można uznać za wyróżniającą się.



Poznań, 26 października 2023