

Prof. dr hab. Stanisław Okrasa  
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
UWM w Olsztynie  
10-719 OLSZTYN  
ul. Oczapowskiego 1A

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Natalii Leciejewskiej  
pt.: Selektywny modulator receptora androgenowego – ostarina  
(enobosarm, GTx024) jako regulator funkcji  
tkanki mięśniowej – badania *in vivo* i *in vitro***

Doktorantka jest absolwentką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, który ukończyła w roku 2017, uzyskując tytuł magistra. Następnie podjęła studia doktoranckie w macierzystej Uczelni (1.10.2017 r.), które realizowała do 30.09.2023 r. W okresie 02.2019-30.09.2020 była zatrudniona jako starszy referent techniczny, a od października 2020 r. do chwili obecnej jest asystentem w tej Katedrze.

**OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ ORAZ INFORMACJE  
O DOROBKU PUBLIKACYJNYM DOKTORANTKI**

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Natalii Leciejewskiej została wykonana w Katedrze Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Ewy Pruszyńskiej-Oszmałek. Na rozprawę doktorską składają się dwie prace oryginalne, opublikowane w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania (IF) wynosi 9,7, a punktacja wg MEiN – 240.

1. 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; 15; 23(8): 4404.  
**MEiN = 140, Impact factor = 5,6**
2. 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; 3; 577:112037.  
**MEiN = 100, Impact factor = 4,1**

Wkład Doktorantki w przeprowadzenie badań i przygotowanie wymienionych publikacji w obu przypadkach wynosił: 70%. Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu *Preludium* i częściowo ze środków przyznanych przez MNiSW w ramach programu „Regionalna Inicjatywa Doskonałości”. Rozprawa doktorska mgr Natalii Leciejewskiej, oprócz kopii w/w publikacji, zawiera autorskie opracowanie (w języku polskim) badań przeprowadzonych przez Doktorantkę oraz oświadczenia współautorów dotyczące ich procentowego udziału

w realizacji badań i/lub przygotowaniu publikacji, uwzględniające również rodzaj wniesionego przez nich wkładu. Autorskie opracowanie rozprawy, obejmujące 75 stron, zawiera: *Wprowadzenie* – opisujące najważniejsze aspekty podjętego tematu badawczego, *Hipotezy i cele pracy* – odnoszące się do dwóch przeprowadzonych eksperymentów, *Materiały i metody* – przedstawiające zastosowane modele doświadczalne, procedury badawcze i wykonane analizy statystyczne, *Wyniki* oraz *Dyskusję i jej Podsumowanie* uwzględniające końcowe wnioski. Ponadto, opracowanie zawiera *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, *Spis treści*, *Wykaz stosowanych skrótów*, zestawienie cytowanego piśmiennictwa (114 pozycji) oraz *Spis tabel i rycin*, jak również *Spis identyfikatorów badań klinicznych*.

Na podkreślenie zasługuje duże zaangażowanie Doktorantki w prace badawcze prowadzone w Katedrze Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt (UP Poznań). Oprócz dwóch prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, jest Ona współautorką 16 publikacji; 15 uwzględnionych w wykazie bazy *Scopus* oraz jednej, która jest obecnie w druku w *Nutrition Reviews* (2023 Aug., doi: 10.1093/nutrit/nuad093). W dwóch publikacjach (spośród 16) jest Ona pierwszym autorem. Jej dorobek publikacyjny wg bazy *Scopus* był cytowany 111 razy, a po wyłączeniu autocytowań – 78-krotnie (dane z dnia 31.10.2023 r.).

#### **MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Utrata masy mięśniowej towarzysząca niektórym chorobom oraz występująca u ludzi w starszym wieku jest poważnym problemem, ograniczającym samodzielne funkcjonowanie. Wiadomo, że zachowaniu prawidłowej masy mięśniowej m.in. sprzyjają: zdrowy styl życia, aktywność fizyczna i odpowiednia dieta. Spełnienie tych warunków nie zawsze zapobiega nadmiernej utracie masy ciała w wyżej przytoczonych okolicznościach. Stosowanie w takich przypadkach hormonów steroidowych (głównie testosteronu lub jego pochodnych) o właściwościach anabolicznych, działających za pośrednictwem receptorów androgenowych, wydawało się być metodą pozwalającą skutecznie kontrolować masę mięśniową organizmu. Jednakże okazało się, że hormony należące do tej grupy, wykazując znacznie szerszy zakres działania biologicznego (obejmujący m.in. wątrobę, skórę, prostatę i układ nerwowy), mogą wywoływać niekorzystne efekty uboczne w organizmie. Duże nadzieje w poszukiwaniu środka skutecznie i bezpiecznie działającego w tym zakresie stworzyły prace nad wytworzeniem selektywnych modulatorów receptora androgenowego (ang. *selective androgen receptor modulator*, SARM), które wykazywałyby działanie troficznie w mięśniach z ograniczoną aktywnością androgenową. Ostaryna jest jednym z lepiej poznanych niesteroidowych, selektywnych modulatorów receptora androgenowego. Substancja ta nie uzyskała jeszcze statusu środka terapeutycznego, ponieważ ciągle wymagają dokładniejszego przebadania uboczne efekty jej działania. Podjęcie przez mgr Natalię Leciejewską – w ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej – badań nad anabolicznym działaniem ostaryny oraz potencjalnie niebezpiecznym jej wpływem na komórki mięśnia sercowego wychodzi naprzeciw pilnej potrzebie uzupełnienia wiedzy o tej substancji. Potrzeba ta dodatkowo wynika z faktu rozpowszechniania się ostaryny jako środka wspomagającego, używanego w sporcie amatorsko uprawianym i nielegalnie – w sporcie wyczynowym.

We *Wprowadzeniu*, Doktorantka rozważa najważniejsze zagadnienia powiązane z podjętym tematem rozprawy. Zamieszcza w nim krótki opis rozwoju badań z zakresu andrologii, następnie przedstawia fizjologię androgenów oraz następstwa ich niedoboru w organizmie, a także – fizjologię mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego (z uwzględnieniem patologii procesu włóknienia). Dalszą część *Wprowadzenia* Doktorantka poświęca selektywnym modulatorom receptora androgenowego, dokonuje ich przeglądu, a szczegółowiej opisuje ostarinę wyszczególniając badania kliniczne, w których była ona rozpatrywana. Ponadto, Doktorantka porusza problem doping w sporcie z wykorzystaniem selektywnych modulatorów receptora androgenowego. Moim zdaniem, na wysoką ocenę zasługuje staranne opracowanie *Wprowadzenia*, w którym zostały przystępnie i zwięźle wyjaśnione najważniejsze zagadnienia powiązane z tematyką podjętych badań.

Przyjęta przez Doktorantkę ogólna hipoteza badawcza zakłada, że ostarina moduluje metabolizm komórek mięśni szkieletowych i serca. Z kolei, głównym celem podjętych przez Doktorantkę badań było określenie potencjalnego wpływu ostariny na funkcjonowanie komórek mięśni szkieletowych i serca. Doktorantka przedstawiła również szczegółowe hipotezy i cele badawcze odnoszące się do dwóch zaplanowanych eksperymentów. Pozwoliło to Doktorantce precyzyjnie i przejrzysto konstruować przebieg badań, co – moim zdaniem – ułatwiło ich realizację.

Generalnie, cele pierwszego eksperymentu obejmowały: określenie wpływu ostariny na proliferację i różnicowanie komórek mioblastów linii C2C12 oraz L6 (pochodzących odpowiednio od myszy i od szczura) z uwzględnieniem wewnątrzkomórkowego mechanizmu jej działania, a także określenie wpływu ostariny na mięśnie szkieletowe szczurów. Bardzo ważne było uwzględnienie w tym doświadczeniu blokowania receptorów androgenowych przy określaniu wpływu ostariny m.in. na poziom fosforylacji kinazy ERK1/2 w komórkach linii C2C12 i L6 oraz na ich przeżywalność, które umożliwiło weryfikację działania ostariny poprzez te receptory. Z kolei blokowanie kinazy ERK1/2 przy pomocy specyficznego inhibitora (U0126) pozwoliło potwierdzić rolę tej kinazy jako pośrednika w działaniu ostariny na badane komórki.

W drugim eksperymencie, postanowiono zbadać: wpływ ostariny na ekspresję receptora androgenowego oraz na procesy profibrotyczne i ekspresję wybranego markera kardiomiopatii (ciężkiego łańcucha  $\beta$ -miozyny) w warunkach *in vivo* i *in vitro*, jak również potencjalnie toksyczny wpływ ostariny na komórki linii komórkowej H9C2 (pozyskanej z serca embrionu samicy szczura i stosowanej jako model komórkowy kardiomiocytów) oraz fibroblasty serca pozyskane od samic i samców szczurów. Cennym uzupełnieniem badań podstawowych przeprowadzonych w ramach powyższych eksperymentów było dodatkowe określenie wpływu podawania ostariny na stężenie testosteronu całkowitego, cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL i HDL w surowicy krwi szczurów. Procedury doświadczalne oraz metody analityczne wykorzystane podczas realizacji doświadczeń były przeprowadzane według standardowych protokołów stosowanych w macierzystej Katedrze i zostały przejrzysto opisane przez Kandydatkę w autorskim opracowaniu, będącym częścią rozprawy doktorskiej.

Na podkreślenie i uznanie zasługuje zastosowanie w badaniach różnych modeli doświadczalnych (*in vivo* i *in vitro*) oraz bardzo licznych metod, takich jak: Real-Time qPCR (określanie ekspresji różnych genów), Western blot (określanie ekspresji różnych białek), test ELISA (oznaczanie testosteronu w surowicy krwi), testy kolorymetryczne (oznaczanie cholesterolu oraz frakcji LDL i HDL), test kolorymetryczny Pointe Scientific LDH (oznaczanie aktywności dehydrogenazy mleczanowej), test kolorymetryczny BrdU (określanie zmian w proliferacji komórek), test MTT (określanie zmian w przeżywalności komórek), barwienie metodą Jennera-Giemsy (określanie zmian morfologicznych w procesie różnicowania komórek), barwienie hematoksyliną i eozyną preparatów histologicznych (badanie zmian morfologicznych w tkance mięśnia szkieletowego).

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej, Kandydatka przedstawiła w dwóch pracach oryginalnych, które ukazały się czasopismach naukowych posiadających wysokie współczynniki oddziaływania (IF: 5,6 i 4,1) oraz opisała je w załączonym autorskim opracowaniu. Najważniejsze efekty badań Doktorantki skrótkowo przedstawia poniższe zestawienie.

W badaniach opisanych w publikacji 1 (*Eksperyment 1*), m.in. stwierdzono następujące efekty działania ostariny w odniesieniu do komórek mięśni szkieletowych:

- 1) stymulację przeżywalności i proliferacji komórek mioblastów linii C2C12 i L6;
- 2) stymulację fosforylacji kinazy ERK oraz proliferacji za pośrednictwem receptora androgenowego w komórkach linii C2C12 i L6;
- 3) stymulację procesu różnicowania mioblastów C2C12 i L6 poprzez wzrost ekspresji czynników regulujących ten proces (miogeniny, MyoD i Myh), przy czym efekt ten był znoszony po zablokowaniu receptora androgenowego;
- 4) anaboliczny wpływ na mięśni szkieletowe szczurów.

W badaniach przedstawionych w publikacji 2 – przeprowadzonych w ramach *Eksperymentu 2* – stwierdzono, że ostaryna:

- 1) zwiększa ekspresję receptora androgenowego w sercu samców w doświadczeniu *in vivo* oraz w komórkach fibroblastów pozyskanych z serc samców w doświadczeniu *in vitro*, nie zwiększając ekspresji tego receptora w pozostałych modelach doświadczalnych tj. fibroblastach pozyskanych z serc samic i komórkach linii H9C2;
- 2) zmniejsza żywotność fibroblastów pozyskanych z serc samców nie wykazując cytotoksycznego efektu w komórkach pochodzących od samic;
- 3) stymuluje różnicowanie kardiomioblastów H9C2;
- 4) promuje zmiany kardiomiopatyczne w komórkach H9C2;
- 5) stymuluje zmiany włóknieniowe w komórkach fibroblastów pozyskanych z serc samców (↑ fibronektyny i  $\alpha$ SMA), jednocześnie nie wykazując takiego działania w komórkach pochodzących od samic;
- 6) wykazuje kardiotoksyczne działanie w mięśniu sercowym, charakteryzujące się nasileniem zmian kardiomiopatycznych i włóknieniowych, które potwierdza wzrost ekspresji określonych markerów (tj.  $\beta$ Mhc oraz fibronektyny,  $\alpha$ SMA, BNP i TGF $\beta$ ) w sercu szczurów otrzymujących ostarinę przez okres 30 dni.

W dodatkowo przeprowadzonych badaniach, pod wpływem działania ostaryny stwierdzono: obniżenie stężenia testosteronu całkowitego, koncentracji cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL i HDL w surowicy krwi szczurów.

Generalnie, uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że ostaryna jest modulatorem czynności komórek tkanki mięśniowej szkieletowej oraz tkanki mięśniowej serca. W przedstawionych badaniach wykazano, że ostaryna może wpływać na procesy przeżywalności, proliferacji i różnicowania komórek tkanki mięśni szkieletowych i w tym przypadku działa ona za pośrednictwem receptora androgenowego oraz kinazy ERK. Z kolei w tkance mięśnia sercowego może ona oddziaływać na procesy przeżywalności i różnicowania komórek oraz wykazywać efekty kardiotoksyczne prowadzące do zmian kardiomiopatycznych i włóknieniowych. Uzyskane wyniki badań zostały w sposób wnikliwy przedyskutowane w opublikowanych pracach oraz autorskim opracowaniu Doktorantki zamieszczonym w rozprawie. W dyskusji, Doktorantka zwraca uwagę na możliwość działania ostaryny nie tylko poprzez receptory androgenowe (co zostało udokumentowane w Jej badaniach), ale również poprzez receptory sprzężone z białkami G (GPCR). Poza genomową (poprzez receptor androgenowy) odpowiedzią na ostarynę, wskazuje również możliwość uruchomienia przez nią innych ścieżek sygnalizacyjnych opartych o rekrutację różnych białek regulatorowych, np. kinaz MAPK (oprócz wcześniej wspomnianej kinazy ERK). Rozpatrując działanie anaboliczne ostaryny, Doktorantka porównuje je z działaniem różnych steroidów anaboliczno-androgennych (SAA) oraz wyjaśnia przyczyny większej wrażliwości na ostarynę komórek linii L6 od komórek C2C12. W dyskusji poświęconej kardiotoksycznemu działaniu ostaryny, Doktorantka omawia wyniki przeprowadzonych badań w kontekście zmian patologicznych w mięśniu sercowym pod wpływem steroidów anaboliczno-androgennych (opisywanych przez innych autorów), zwracając uwagę na różne możliwości kardiotoksycznego działania ostaryny i różnice mogące wystąpić w tym zakresie, m.in. zależnie od płci oraz intensywności wysiłku fizycznego. W zakończeniu dyskusji zamieszczonej w publikacji 2, Doktorantka wskazuje ograniczenia związane z realizacją badań dotyczących tej problematyki, co moim zdaniem jest przejawem obiektywnego podejścia do prowadzonych badań.

W zakończeniu autorskiego opracowania, Doktorantka dokonuje podsumowania dyskusji, przypominając główne efekty przeprowadzonych badań i przedstawia końcowy wniosek ogólnie stwierdzający, że ostaryna jest związkiem o działaniu anabolicznym i potencjalnie toksycznym dla komórek serca. Za dobry pomysł Doktorantki uznaję graficzne podsumowanie – zamieszczone w tej części opracowania – wpływu ostaryny na funkcjonowanie tkanki mięśni szkieletowych i serca, jak również koncentrację testosteronu oraz cholesterolu i jego frakcji (LDL i HDL) w surowicy krwi szczurów.

#### **PYTANIA i UWAGI**

Po zapoznaniu się z treścią ocenianej rozprawy doktorskiej i załączonych publikacji nasunęło mi się kilka pytań/uwag, które przedstawiam poniżej.

1. Działanie kardiotoksyczne SAA i ostaryny (w określonych warunkach) może prowadzić do wydzielania cytokin, które mogą indukować lub nasilać niekorzystną

przebudowę serca. Czy na podstawie piśmiennictwa może Pani wskazać możliwe efekty działania cytokin w mięśniu sercowym?

2. Wykazała Pani w swoich badaniach wzrost ekspresji receptora androgenowego w sercach samców szczura otrzymujących podskórne iniekcje ostaryny przez 30 kolejnych dni i równocześnie stwierdziła Pani m.in. obniżenie stężenia testosteronu całkowitego w surowicy krwi tych szczurów. Jakie mogą być potencjalne skutki takiego działania ostaryny w odniesieniu do mięśnia sercowego oraz funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka-gonady?
3. W autorskim opracowaniu rozprawy w języku polskim, poprawnie przygotowanym przez Doktorantkę, występują drobne i stosunkowo nieliczne błędy redakcyjne, które nie obniżają jego merytorycznej wartości. Prawdopodobnie z takiego powodu nie jest w pełni zrozumiałe następujące zdanie (str. 55, wiersze 13-15): „W przeciwieństwie do fibroblastów pozyskanych z serc samców – spadek przeżywalności jak i wzrost aktywności dehydrogenazy obserwowany był po 48 h.”

#### **PODSUMOWANIE**

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Natalii Leciejewskiej zawiera bardzo liczne i wartościowe wyniki badań, które dotyczą wpływu niesteroidowego, selektywnego modulatora receptora androgenowego – ostaryny na funkcjonowanie komórek mięśni szkieletowych i serca ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnie kardi toksycznego jej działania. W badaniach zastosowano różne modele i procedury doświadczalne oraz liczne metody analityczne. Wykazano, że ostaryna stymuluje procesy anaboliczne w mięśniach szkieletowych i sercu oraz wykazuje działanie toksyczne i profibrotyczne w sercu. Między innymi stwierdzono, że ostaryna zmniejsza żywotność fibroblastów pozyskanych z serc samców i stymuluje w nich zmiany włóknieniowe, nie wykazując cytotoksycznego efektu w fibroblastach pochodzących od samic. Z kolei, w kardiomiocytach (tj. komórkach linii H9C2) pobudza zmiany kardiomiopatyczne, nie wpływając istotnie na ich przeżywalność. Powyższe obserwacje są niezwykle ważne, ponieważ po raz pierwszy wskazują na niekorzystne zmiany, które mogą wystąpić w sercu pod wpływem ostaryny. Ponadto wykazano, że ostaryna powoduje obniżenie stężenia testosteronu całkowitego i cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL i HDL w surowicy krwi szczurów. Wyniki przedstawionych badań opublikowano w renomowanych czasopismach naukowych. Doktorantka wykazuje się również bardzo dobrym dorobkiem publikacyjnym, który – po wyłączeniu prac stanowiących Jej rozprawę doktorską – obejmuje 16 artykułów opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Rozprawa doktorska oraz dorobek publikacyjny mgr Natalii Leciejewskiej wskazują na Jej pracowitość oraz bardzo dobre opanowanie wielu technik badawczych i wiedzy z zakresu prowadzonych badań.

#### **WNIOSEK KOŃCOWY**

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa zatytułowana **”Selektywny modulator receptora androgenowego – ostaryna (enobosarm, GTx024) jako regulator funkcji tkanki mięśniowej – badania *in vivo* i *in vitro*”** spełnia wymagania

– określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2022 r. poz. 574) – stawiane rozprawom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny *Zootechnika i rybactwo* Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie mgr **Natalii Leciejewskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**Równocześnie przedkładam wniosek o rozważenie możliwości wyróżnienia rozprawy doktorskiej mgr Natalii Leciejewskiej.** W uzasadnieniu tego wniosku pragnę zwrócić uwagę na szeroki zakres przeprowadzonych badań i ich nowatorskość (tj. określenie kardiotoksycznego działania ostaryny) oraz wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników, które zostały opublikowane w wysoko notowanych czasopismach naukowych. Ponadto, Doktorantka wykazała się dużym zaangażowaniem w prowadzenie innych badań realizowanych w Katedrze Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt (UP Poznań), które zaowocowało znaczącym i wartościowym dorobkiem publikacyjnym, obejmującym 16 prac (poza pracami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej), w tym dwóch – z Jej pierwszoplanowym współautorstwem.

Olsztyn 3.11.2023 r.



Stanisław Okrasa