



UNIwersYTET ROLNICZY
im. Hugona Kollątaja w Krakowie



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

Kraków, 30.01.2023 r.

Prof. dr hab. Małgorzata Kotula-Balak
Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR
Kierownik Zakładu Histopatologii
Ośrodek Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Pauliny Cieśli w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki medyczne przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, pt. *Zaburzona homeostaza androgenowa a funkcja i morfologia wątroby - model zwierzęcy oparty na męskim pokoleniu potomnym (F1) od samców (F0) z farmakologicznie wywołanym deficytem DHT*

Oś podwzgórze-przysadka odgrywa kluczową i integrującą rolę w regulacji endokrynologicznej organizmów ssaków, a jednym z jej zadań jest utrzymanie homeostazy funkcji rozrodczych. Badania epidemiologiczne ostatnich 50 lat dostarczyły dowodów na szkodliwy wpływ na zdrowie rozrodcze ludzi i zwierząt substancji środowiskowych zakłócających syntezę, wydzielanie, transport, metabolizm, wiązanie receptorów lub eliminujących funkcje endogennych hormonów, (ang. *endocrine disrupting chemicals*; wg. definicji amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska; EPA z włączeniem kryteriów Komisji Europejskiej). Badania patofizjologiczne w układzie hormonalnym i homeostatycznym potwierdziły ingerencje tych substancji w procesy ekspresji genów, epigenetyczne (m.in. metylacja DNA i/lub acetylacja i modyfikacje histonów) ale także efekty pozagenowe. Należy zaznaczyć, że działanie środowiskowych substancji czynnych hormonalnie nie ogranicza się do pojedynczego narządu/układu. Każda oś endokrynną może być celem dla działania tych związków. Na przykład w wyniku zakłócenia homeostazy metabolicznej tkanki



UNIwersYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

tłuszczowej czy wątroby dochodzi do rozwoju otyłości, zespołów metabolicznych oraz cukrzycy. Choroby te także nie pozostają bez wpływu na działanie układu rozrodczego.

1. Wartość naukowa rozprawy

Oryginalność badań

Rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Cieśli, dotyczy powyżej wspomnianego **niezwykle ważkiego i „gorącego” tematu**. W Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie **od wielu lat prowadzono badania** funkcjonowania męskiego układu rozrodczego (najądrzy) w stanie zdrowia. Temat zainicjowała Pani prof. dr hab. Lidia Wenda-Rożewicka a następnie rozszerzyła badania na stany chorobowe w układzie rozrodczym i innych organach Pani prof. dr hab. Barbara Wiszniewska i Jej wychowanka Pani Promotor dr hab. Agnieszka Kolasa. W niniejszej dysertacji Doktorantka poszukuje odpowiedzi jak stosowany powszechnie w terapii przerostu raka prostaty antyandrogen - finasteryd równocześnie będący modelem działania hormonalnego związku środowiskowego wpływa na status funkcjonalny wątroby. **Po raz pierwszy** w pracy zostają podjęte wstępne analizy na poziomie komórkowym oraz molekularnym (białek i genów) w wątrobie potomstwa zwierząt traktowanych finasterydem. Autorka stara się wyjaśnić m.in., czy u samców, których ojcowie byli traktowani finasterydem może dochodzić do zależnego od androgenów i ich metabolitów (estrogenów) zakłócenia metabolizmu glukozy, oporności na insulinę i metabolizmu lipidów co w konsekwencji prowadzić może do niealkoholowej stłuszczeniowej choroby/zapalenia wątroby oraz raka wątrobowokomórkowego.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, składającego się z **jednej oryginalnej i jednej przeglądowej publikacji, w których Kandydatka jest pierwszym autorem**. Ponadto, w pracy zostały przedstawione **dotyżące w/w tematu**. Wyniki zawarte w dysertacji stanowią **oryginalny wkład**



UNIwersytet ROLNICZY
im. Hugona Kollątaja w Krakowie



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

naukowy i są cennym dodatkiem w procesie wyjaśniania patogenezy chorób wątroby o podłożu hormonalnym.

Wartość naukowa

Rozprawa doktorska składa się z następujących części: wykaz stosowanych skrótów, notka informacyjna, wprowadzenie, główne założenia i cele pracy oraz spodziewane korzyści badania, metody badań, syntetyczne streszczenia publikacji, publikacje stanowiące rozprawę doktorską, dodatkowe niepublikowane wyniki badań stanowiące uzupełnienie rozprawy doktorskiej, wnioski, streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim i angielskim, oświadczenia współautorów publikacji oraz piśmiennictwo. Oryginalne prace naukowe stanowiące rozprawę doktorską mgr Pauliny Ceśli zostały opublikowane w latach 2020-2021 odpowiednio w *International Journal of Environmental Research and Public Health* (IF 3.390; MEN 140 pkt.) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (IF: 6.208; NEN 140 pkt.).

W pierwszej pracy mającej charakter przeglądowny Kur (obecnie Cieśla) *et al.*, *Int J Environ Res Public Health* 2020 pt.: *Sex Hormone-Dependent Physiology and Diseases of Liver* przedstawiono obecny stan wiedzy na temat tkankowo-specyficznej regulacji genów przez hormony płciowe ze szczególnym uwzględnieniem wątroby ze względu na ekspresję klasycznych receptorów estrogenowych (ER α i ER β), błonowego receptora estrogenowego sprzężonego z białkiem G oraz receptora androgenowego (AR) w hepatocytach mężczyzn i kobiet. Autorka prezentuje także informacje o wpływie różnic w koncentracji hormonów płciowych i ekspresji genów specyficznych dla hormonów płciowych na występowanie chorób wątroby m.in. raka wątrobowokomórkowego (częściej u mężczyzn) oraz autoimmunologicznej choroby wątroby i ostrzejszych objawów niewydolności wątroby w alkoholowej chorobie wątroby u kobiet. Ponadto, Doktorantka przedstawia dane na temat niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby w kontekście płci (schorzenie to występuje przede wszystkim u mężczyzn i kobiet po menopauzie). Praca została opracowana na podstawie 166 pozycji literatury światowej z ostatnich lat. **W drugiej pracy** Kur



UNIwersYTET ROLNICZY
im. Hugona Kollątaja w Krakowie



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

(obecnie Cieśla) *et al.*, *Int J Mol Sci*, 2021 pt.: *The Postnatal Offspring of Finasteride-Treated Male Rats Shows Hyperglycaemia, Elevated Hepatic Glycogen Storage and Altered GLUT2, IR, and AR Expression in the Liver* badania przeprowadzono na wątrobach 7, 14, 21, 28 i 90-dniowych samców szczurów rasy Wistar (pokolenia F1) urodzonych przez samice zapłodnione przez szczury traktowane finasterydem. Na skrawkach histologicznych wątroby wykonano barwienie kwasem nadjodowym Schiffa (PAS) (w celu uwidocznienia glikogenu) oraz barwienie immunohistochemiczne (w celu wykrycia wątrobowo-specyficznego transportera glukozy 2; GLUT-2), receptora insuliny (IR) oraz AR. Metodą qRT-PCR zbadano ekspresję mRNA dla w/w białek. W surowicy oznaczono stężenie glukozy, testosteronu i dihydrotestosteronu. Autorka otrzymała następujące wyniki: niezależnie od grupy wiekowej badanych szczurów z pokolenia F1 wykazano nagromadzenie glikogenu jednak niekorelujące ze zmianą ekspresji GLUT-2. Poziomy transkryptów GLUT-2, IR i AR oraz ich immunoreaktywność spadła u zwierząt F1. U szczurów F1 poziomy androgenów w surowicy były ujemnie skorelowane z mRNA AR oraz zwierzęta te miały podwyższony poziom glukozy. Dodatkowo, u dorosłych szczurów F1 obserwowano stłuszczenie wątroby. **W przedstawionych w pracy dodatkowych niepublikowanych badaniach** Doktorantka kontynuowała badania eksperymentalne na pobranych tkankach wątroby szczurów F1 i zajęła się analizą ekspresji ER α oraz indeksu mitotycznego (jądrowy antygen komórek proliferujących; PCNA) hepatocytów używając techniki immunohistochemicznej. Autorka stwierdziła podwyższoną ekspresję ER α niezależnie od wieku zwierząt z jej najwyższymi wartościami u zwierząt 28-dniowych. Odwrotną korelację ujawniono w ekspresji PCNA. U zwierząt po finasterydzie PCNA wykazywało niższą ekspresję niezależnie od wieku w stosunku do kontroli z wyjątkiem zwierząt 28 dniowych, u których nie stwierdzono różnic w ekspresji tego antygenu.



UNIwersYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

2. Wartość merytoryczna rozprawy

W mojej opinii **rozprawa jest poprawna** pod względem merytorycznym. Doktorantka wprowadziła czytelnika w tematykę badawczą. Użyte rutynowe techniki badawcze są poprawnie opisane. Na tej podstawie można stwierdzić, że Kandydatka opanowała stosowany warsztat badawczy, a także umiejętnie posługuje się narzędziami statystycznymi do analizy uzyskanych danych. Sposób przedstawienia wiedzy oraz wyników wraz z ich krytyczną analizą podlegały już ocenie przez recenzentów czasopism w których zostały opublikowane artykuły a dodatkowe wyniki badawcze stanowią ich spójną kontynuację. Tym niemniej, na podstawie Dyskusji dysertacji można stwierdzić, że Doktorantka potrafi właściwie analizować wyniki i dyskutować je na tle piśmiennictwa. Jednak umiejętności formułowania wniosków nie mogę ocenić ponieważ Doktorantka zamiast szczegółowych wniosków przedstawiła bardzo ogólne interpretacyjne podsumowanie.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Dysertacja została poprawnie skonstruowana w oparciu o zalecenia Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie i uwzględnia wszystkie wymagane elementy rozprawy doktorskiej przygotowanej w formie zbioru artykułów. Jednakże Doktorantka nie uniknęła rutynowych uchybień typu: użycia skrótów w tytule pracy i abstraktach; niezręcznego tłumaczenia skrótów używanych w języku angielskim np. ESRRG to gen receptora pokrewnego receptorom estrogenowym typu γ a nie „błonowy receptor estrogenowy γ ”, PPARG jest to receptor aktywowany proliferatorami peroksysomów typu γ a nie „proliferator peroksysomów γ ”, NK to komórki - naturalni zabójcy a nie „naturalni zabójcy”, niektóre podtytuły pracy np. str. 20, 27, tablice str. 82, 84 są podane w języku angielskim (w przypadku tytułów artykułów oryginalnych warto byłoby je przetłumaczyć bądź wyraźnie zaznaczyć z podaniem danych publikacyjnych artykułów, że ich zawartość jest teraz opisywana



UNIwersytet ROLNICZY
im. Hugona Kollątaja w Krakowie



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

w pracy; przejęzyczenia np. „metabolizm cukrowcowo-lipidowy”; użycie spolszczonych słów angielskich np. „partycypują” lepiej biorą udział; nadmiernego uproszczenia opisu np. str. 11 „udowodnionej roli receptora androgenowego w rozwoju i progresji chorób wątroby” raczej roli androgenów/sygnalizacji androgenowej; podobnie str. 14 „sygnalizacja estradiolem” tutaj po prostu „działanie estrogenów”, czy str. 81 „brązowy odczyn raczej” immunosygnal reakcji.

4. Uwagi krytyczne

a) w przedstawionej syntetycznej dysertacji oraz w opublikowanej pracy eksperymentalnej (praca druga; tutaj tylko odnośniki do wcześniej opublikowanych prac Zespołu) nie opisano szczegółowo eksperymentu podania finasterydu zwierzętom. Należałoby podać: sposób przygotowania dawki, informacje o przeprowadzonych badaniach wstępnych, uzasadnienie wyboru dawki, miejsce iniekcji, długość podawania iniekcji, jakie iniekcje dostawały zwierzęta kontrolne etc.

b) Autorka podaje, że spodziewanym rezultatem badania będzie ustalenie czy finasteryd przyjmowany przez młodych mężczyzn (należałoby podkreślić - w wieku rozrodczym) będzie wpływał na funkcje wątroby u męskiego potomstwa (zmiany międzypokoleniowe czy raczej wielopokoleniowe). Warto byłoby dodać informacje z poprzednich prac Zespołu jak dokładnie lek ten wpływał na struktury męskiego układu rozrodczego tych zwierząt, czy obserwowano jakieś korelacje wyników badań z tymi otrzymanymi z badań w wątrobie?

c) Jak dokładnie Doktorantka ma na myśli epigenetyczne mechanizmy działania finasterydu? Czy istnieją dane literaturowe dotyczące innych leków hormonalnych z zakresu ich farmakoepigenomiki?

5. Ocena końcowa

Oceniana rozprawa doktorska zawiera interesujące wyniki, które noszą cechy odkryć naukowych. Rozprawa wskazuje na odczytanie Doktorantki w temacie, umiejętność



UNIwersYTET ROLNICZY
im. Hugona Kollątaja w Krakowie



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

interpretacji wyników i niewątpliwie wnosi nowe elementy do nauki. Pragnę wyraźnie zaznaczyć, że nieliczne krytyczne uwagi zawarte w recenzji nie wpływają na moją pozytywną ocenę całości dysertacji przedłożonej mi do recenzji.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana **rozprawa doktorska mgr Pauliny Cieśli spełnia** warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie **mgr Pauliny Cieśli** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Makula-Balala