

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Cieśli

pt.: „ZABURZONA HOMEOSTAZA ANDROGENOWA A FUNKCJE I MORFOLOGIA WĄTROBY – ZWIERZĘCY MODEL DOŚWIADCZALNY OPARTY NA MĘSKIM POKOLENIU POTOMNYM (F1) OD SAMCÓW (F0) Z FARMAKOLOGICZNIE WYWOŁANYM DEFICYTEM DHT”

Podstawą niniejszej recenzji jest rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Cieśli, wykonana w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie pod kierunkiem Pani dr hab. n. med. Agnieszki Kolasy. Przewodnim tematem przedłożonej do oceny dysertacji jest międzypokoleniowy wpływ narażenia na finasteryd na indukcję zależnych od zaburzonej homeostazy androgenowej zmian w morfologii i funkcji hepatocytów, które mogą prowadzić do niektórych zespołów metabolicznych tj.: hiperglikemia, insulinooporność, cukrzyca typu 2 lub stłuszczenie wątroby u męskiego potomstwa.

Postępująca chemizacja i skażenie środowiska naturalnego zwiększają narażenie na różne czynniki środowiskowe o negatywnym wpływie na zdrowie człowieka, w tym również na związki chemiczne zaburzające gospodarkę hormonalną tzw. *endocrine disrupting chemicals* (EDCs), które indukując deregulację homeostazy hormonalnej, wykazują niekorzystny wpływ na prawidłowy przebieg kluczowych procesów fizjologicznych w organizmie, leżąc tym samym u podstaw wielu fizjologicznych dysfunkcji, zespołów i schorzeń.

Jednym z najważniejszych gruczołów naszego organizmu o rozległych funkcjach syntezujących, metabolicznych, magazynujących, detoksykacyjnych i immunologicznych, które podlegają złożonym procesom kontrolnym, łącznie z regulacją przez związki, które interferując z układem endokrynnym destabilizują homeostazę androgenową, jest wątroba. Coraz więcej danych wskazuje na istotne znaczenie hormonów płciowych w regulacji funkcji wątroby. Coraz częściej mówi się nawet o zależnych od płci chorobach wątroby i ich rokowaniu. U mężczyzn w warunkach fizjologicznych testosteron działa poprzez receptory androgenowe (AR) zwiększając ekspresję receptora insuliny (InR) i syntezę glikogenu oraz zmniejszając wychwyt glukozy kontrolowany przez specyficzny dla wątroby transporter glukozy 2 (GLUT2). Wykazano, że mechanizm ten może być osłabiany przez finasteryd, popularny lek stosowany w urologii i dermatologii, hamujący 5 α -reduktazę typu 2, która przekształca testosteron (T) w dihydrotestosteron (DHT), zmieniając homeostazę androgenową organizmu. Wcześniejsze badania wykazały również, że potomstwo szczurów narażonych na finasteryd ma zmieniony stosunek T/DHT oraz zmiany w jądrach i najądrzach.

Na podstawie wieloletnich obserwacji wiadomo, iż w populacji męskiej z nieprawidłowościami w sygnalizacji receptora androgenowego (regulacja up-/down AR), zaburzoną homeostazą androgenową (wynikająca z deficytu/suplementacji T/DHT, bądź zahamowaniu aktywności NADPH-zależnej 5 α -reduktazy typu 2) stwierdza się liczne nieprawidłowości i zaburzenia metaboliczne w wątrobie. W szczególności deregulacja równowagi hormonalnej (obniżenie poziomu bądź niedobór testosteronu, deficyty 5 α -reduktazy) oraz zaburzona ekspresja receptora androgenowego i estrogenowego α (ER α) wpływają na zaburzony metabolizm wątrobowy zarówno węglowodanów i lipidów, będący przyczyną wielu fizjologicznych dysfunkcji, zespołów i chorób. Przykładowo, niskie stężenie testosteronu we krwi uznano za niezależny czynnik ryzyka rozwoju zarówno cukrzycy typu 2 (T2D), jak i rozwoju zespołu metabolicznego (MetS) w następstwie nasilonej wątrobowej glukogenezy (hiperglikemia). Obniżona ekspresja receptora androgenowego u mężczyzn może sprzyjać insulinooporności (IR), prowadząc dalej do rozwoju T2D. Również brak aktywności 5 α -reduktazy indukuje IR. Obniżony metabolizm glukozy, IR i hiperinsulinemię, wiążące się z rozwojem cukrzycy typu 2 oraz zespołu metabolicznego, obserwuje się również u mężczyzn z nieaktywnym ER α oraz z deficytami aromatazy. Z kolei, w kontekście wątrobowego metabolizmu lipidów należy podkreślić, iż wyłączenie ekspresji receptora ER α koreluje ze stłuszczeniem wątroby, wynikającym z nadekspresji genów lipogennych przy jednoczesnej obniżonej ekspresji genów przemiany lipidów. Również niskie stężenie testosteronu, deficyty aktywności 5 α -reduktazy, obniżona ekspresja receptora AR bądź deficyty aromatazy sprzyjają rozwojowi stłuszczenia wątroby oraz wzrostowi poziomu trójglicerydów (TG). Wszystkie te zaburzenia metaboliczne w wątrobie dotyczą populacji męskiej pokolenia bezpośrednio otrzymującego finasteryd. Brak natomiast danych, traktujących o ewentualnych skutkach ubocznych w męskim pokoleniu potomnym, będących konsekwencją przyjmowania przez pokolenie ojcowskie leków wpisujących się w definicję EDCs. Zgodnie z badaniami Trasler'a i Doerksen'a, nie tylko narażenie matki, ale także ojca na szkodliwe czynniki, w tym EDCs może pociągać za sobą patologiczne zmiany u potomstwa.

Mając powyższe dane na uwadze, zasadnym jest podjęte przez Doktorantkę zagadnienie, dotyczące wpływu wywołanego farmakologicznie (finasterydem) deficytu DHT u ojcowskich szczurów na funkcje i morfologię wątroby męskiego pokolenia potomnego w odniesieniu do grupy kontrolnej, co decyduje o nowatorskim charakterze badań. Z kolei ważność i aktualność podjętej przez Doktorantkę tematyki wynika z rosnącego narażenia na EDCs, a co za tym idzie zaburzonej gospodarki hormonalnej, która jest poważnym problemem zdrowia publicznego. Albowiem coraz częściej w etiologię wielu schorzeń takich jak m.in.: otyłość, insulinooporność, cukrzyca, niealkoholowe stłuszczenie wątroby, stanowiących globalny problem, wpisuje się właśnie rozchwianie fizjologii gruczołów endokrynych. Warto również nadmienić, iż skutki uboczne działania finasterydu tzw. *finaseride side effects*, w głównej mierze omawiane były dotąd w kontekście męskiej płodności oraz zaburzeń psychicznych.

Ponieważ podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza, jak również wyniki przeprowadzonych badań zostały zawarte w cyklu opublikowanych już prac, na który składają się praca pogładowa: „*Sex Hormone-Dependent Physiology and Diseases of Liver*”

opublikowana w International Journal of Environmental Research and Public Health 2020; jak również praca oryginalna: „*The Postnatal Offspring of Finasteride-Treated Male Rats Shows Hyperglycaemia, Elevated Hepatic Glycogen Storage and Altered GLUT2, IR, and AR Expression in the Liver*” opublikowana w IJMS 2021; przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest w przeważającej mierze syntetycznym streszczeniem oraz podsumowaniem i omówieniem informacji i wyników prezentowanych w wyżej wspomnianych pracach. Publikacje te są załącznikami w przedstawionej rozprawie i stanowią cykl tematycznie spójnych prac. Łączna ich punktacja to **9,598 IF** i **280 punktów MNiSW**. Dodatkowo powyższa dysertacja została wzbogacona przez Doktorantkę o nieopublikowane dotąd wyniki badań, dotyczące wpływu indukowanego farmakologicznie (finasteryd podawany ojcowskim samcom) deficytu DHT na poziom ekspresji receptora estrogenowego α (ER α) oraz aktywność mitotyczną hepatocytów w wątrobach pokolenia potomnego (F1:Fin) w odniesieniu do grupy zwierząt kontrolnych (F1:Control).

Przedstawiona do oceny Rozprawa ma typowy układ, na który składają się: notka informacyjna, wprowadzenie, główne założenia i cele pracy, opis modelu badawczego i stosowanych metod wraz z syntetycznym streszczeniem publikacji stanowiących pracę doktorską. Dodatkowy rozdział rozprawy stanowią nieopublikowane wyniki badań wraz z ich interpretacją, stanowiący uzupełnienie rozprawy doktorskiej. Całość liczy 109 stron, łącznie z wnioskami, streszczeniem w języku polskim i angielskim, oświadczeniami współautorów publikacji i piśmiennictwem. Pomiędzy poszczególnymi częściami pracy zostały zachowane właściwe proporcje.

Tematyka pracy doktorskiej jest bardzo aktualna a tytuł sformułowany został jasno i precyzyjnie; odpowiada w pełni tematyce przedstawionych badań.

Wstęp napisany jest zwięźle i rzeczowo, wprowadzając czytelnika w złożoność analizowanego zagadnienia oraz przedstawiając zasadność wybranej tematyki. Doktorantka opisuje w nim złożoność procesów i mechanizmów leżących u podstaw hormonozależnego metabolizmu lipidów i glukozy w wątrobie, które ulegają zaburzeniu w następstwie rozchwianej fizjologii układu endokrynnego, indukowanej m.in. EDCs. Doktorantka opisuje również rolę szlaku androgenowego, sygnalizacji estrogenowej w fizjologii komórek wątroby, w procesach związanych z regeneracją, degeneracją oraz karcynogenezą hepatocytów. W rozdziale tym Doktorantka wykazała się bardzo dobrą wiedzą i orientacją w analizowanym zagadnieniu.

Przesłanki do podjęcia badań, jak również główne założenia i cele pracy zostały jasno i precyzyjnie sformułowane. Poszczególne zadania badawcze podjęte przez Doktorantkę w celu wykazania międzypokoleniowego, negatywnego wpływu finasterydu na funkcję wątroby obejmowały w szczególności:

1. analizę kluczowych markerów metabolizmu węglowodanowo-lipidowego:
 - ✓ akumulację glikogenu w hepatocytach,
 - ✓ ekspresję na poziomie mRNA karboksylazy pirogronianowej (PC), glukokinazy (GK), karboksylazy α acetylo-CoA (ACACA), syntazy kwasów tłuszczowych (FANS), receptora gamma aktywowanego przez proliferator peroksosomów (PPARG) w wątrobie,

- ✓ ekspresję na poziomie mRNA receptora insulinowego (InR) oraz transportera glukozy 2 (GLUT2) w wątrobie,
- ✓ poziom glukozy, insuliny i TG we krwi,
- 2. analizę wrażliwości hepatocytów na hormony płciowe:
 - ✓ ekspresję receptora androgenowego (AR) na poziomie mRNA i białka,
 - ✓ ekspresję receptora estrogenowego α (ER α) na poziomie białka
- 3. analizę zdolności proliferacyjne komórek wątroby
 - ✓ immunoekspresja jądrowego antygenu komórek proliferujących (PCNA).

Rozdział „Model badawczy” zawiera dokładny opis zastosowanego modelu badawczego i wykorzystanego do badań materiału. Materiał do analizy stanowiły wątroby i surowica krwi, zebrane od potomnych samców (F1:Fin) urodzonych z samic, krytych przez samce otrzymujące finasteryd (F0:Fin) przez okres ok. 6 miesięcy w dawce 5mg/dzień. Grupę kontrolną stanowiły wątroby pochodzące od potomnych samców (F1:Control), których ojcowskie samce nie były poddane działaniu finasterydu (F0:Control). Męskie pokolenie potomne poddane analizie stanowiły szczury w różnym postnatalnym wieku rozwojowym (szczury 7-, 14-, 21-, 28- i 90-dniowe). Łącznie w badaniu poddano analizie wątroby pochodzące od n=50 osobników (po n=5 dla odpowiednio grupy badanej i kontrolnej w poszczególnych punktach czasowych). Na badania uzyskano pozwolenie Lokalnej Komisji Bioetycznej w Szczecinie. Liczba zwierząt objętych badaniami jest prawidłowa i wystarczająca do właściwego wnioskowania statystycznego.

Następnie w rozdziale „Metody Badań” Doktorantka opisuje zastosowaną metodykę: barwienia histologiczne i histochemiczne, reakcje immunohistochemiczne oraz technikę qRT-PCR celem analizy ekspresji badanych genów na poziomie mRNA. Metody badawcze zastosowane przez Doktorantkę są właściwe i nowoczesne. Do oceny statystycznej otrzymanych wyników Doktorantka zastosowała właściwe testy statystyczne tj.: test U Manna-Whitney’a i test Kruskal’a-Wallis’a z testem wielokrotności porównań Dunn’a post hoc ($p < 0.05$) do oceny istotności różnic pomiędzy analizowanymi grupami, poprzedzony testem normalności Shapiro-Wilka. W celu określenia siły korelacji pomiędzy badanymi poziomami T i DHT w surowicy z poziomami mRNA dla GLUT2, InR i AR użyto współczynnik korelacji rang Spearman’a. Ten sam test zastosowano w celu ustalenia korelacji zawartości glikogenu w hepatocytach z immunoekspresją GLUT2, stężenia glukozy w surowicy z wiekiem zwierząt oraz poziomem mRNA dla GLUT2, jak również immunoekspresji ER α z jądrowym antygenem komórek proliferujących (PCNA). W rozdziale tym zabrakło mi jednak informacji na temat metodyki pomiaru stężenia glukozy, trójglicerydów, insuliny w surowicy oraz metody pomiaru poziomu androgenów (T, DHT).

Rozdział „Syntetyczne streszczenia publikacji stanowiących rozprawę doktorską” jest przedstawiony w formie dwóch podrozdziałów (6.1. oraz 6.2.), odpowiadających dwóm publikacjom Doktorantki. Bardzo szczegółowy przegląd obszernej i wartościowej literatury przedmiotu, wnikliwa i bardzo dokładna ocena roli hormonów płciowych w metabolizmie węglowodanów i lipidów w wątrobie zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych (w szczególności zależny od zaburzeń równowagi hormonalnej oraz deregulacji ekspresji receptorów hormonów płciowych, dysfunkcyjny metabolizm glukozy i lipidów, jako przyczyna wielu zespołów czy chorób wątroby w aspekcie zależności od płci,

z uwzględnieniem czynników środowiskowych), a także krytyczna dyskusja dotychczasowych danych literaturowych poprowadzona w pracy pogładowej pt.: „*Sex Hormone-Dependent Physiology and Diseases of Liver*” dowodzi bardzo dobrej znajomości podjętej przez Doktorantkę tematyki badawczej, jak również znajomości aktualnego stanu wiedzy, dotyczącego analizowanego przez Doktorantkę zagadnienia, dowodząc tym samym niezwyklej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Podrozdział 6.2 stanowi zaś podsumowanie wyników przedstawionych w pracy wynikowej 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*” i dowodzi, iż stosowanie finasterydu przez pokolenie ojcowskie (dorosłe szczury płci męskiej w wieku reprodukcyjnym) powoduje u męskiego pokolenia potomnego spadek ekspresji mRNA i poziomu białka dla transportera GLUT2, receptorów insulinowego (InR) i androgenowego (AR) w hepatocytach, które korelują z poziomami krążących we krwi androgenów (T i DHT) (statystycznie znamienne, negatywna korelacja pomiędzy poziomem T oraz DHT a ekspresją AR), prowadząc tym samym do niekorzystnych zmian w wątrobowym metabolizmie węglowodanów i lipidów, skutkując wzrostem kumulacji glikogenu w hepatocytach w następstwie hiperglikemii, insulinooporności, łącznie z niektórymi objawami zespołu metabolicznego czy stłuszczeniem wątroby.

Ponadto, w dalszej części niniejszej dysertacji (rozdział 8) Doktorantka prezentuje nieopublikowane wyniki badań stanowiące jej dopełnienie, które dowiodły wpływ finasterydu na zmiany wrażliwości hepatocytów na estrogeny (wykazana nadekspresja ER α) wraz z obniżeniem aktywności mitogennej hepatocytów (wykazany spadek ekspresji PCNA) w wątrobach pokolenia potomnego (F1:Fin), uzyskanego od samic, krytych szczurami (F0:Fin) z indukowanym finasterydem deficytem DHT w odniesieniu do zwierząt kontrolnych (F1:Control).

Zaprezentowane przez Doktorantkę rezultaty badań oraz wynikające z nich wnioski zostały poprawnie sformułowane i stanowią przejrzyistą odpowiedź na założone cele.

Przedstawiona do oceny praca doktorska dowodzi bardzo dobrej znajomości analizowanego tematu, warsztatu badawczego, olbrzymiego wkładu pracy i umiejętności interpretacyjnych niezbędnych do uzyskania założonych celów. Na uwagę zasługuje fakt, iż wyniki badań Doktorantki zostały opublikowane w renomowanych, specjalistycznych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku oddziaływania. Wysokie wskaźniki bibliometryczne dowodzą wysokiej wartości merytorycznej prac, jak również aktualności podjętej przez Doktorantkę tematyki badawczej. We wszystkich pracach stanowiących podstawę dysertacji, Pani mgr Paulina Cieśla ma wiodący wkład w ich powstanie (jest pierwszym autorem).

Reasumując, całość rozprawy Pani mgr Pauliny Cieśli oceniam bardzo dobrze. Przedstawiona do oceny dysertacja wnosi nowe, cenne dane, z których możemy wnioskować, iż finasteryd ma międzypokoleniowe i prawdopodobnie epigenetyczne skutki uboczne, o negatywnym wpływie dla funkcjonowania wątroby męskiego potomstwa, które mogą indukować niektóre zespoły metaboliczne tj.: hiperglikemia, insulinooporność, cukrzyca typu

2, bądź stłuszczenie wątroby u mężczyzn. Otrzymane wyniki badań stanowią o oryginalności i nowatorskim charakterze dysertacji. Sugerują również, iż finasteryd powinien stać się przedmiotem badań farmakoepigenomiki. Dane te wydają się mieć bardzo duże znaczenie w aspekcie zdrowia publicznego, albowiem coraz częściej w etiologię wielu chorób cywilizacyjnych (globalny wzrost otyłości, insulinooporność, cukrzyca czy też niealkoholowe stłuszczenie wątroby) wpisuje się właśnie rozchwianie gospodarki hormonalnej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. z 2017 r, poz. 1789 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Wydziału Medycyny i Stomatologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego (PUM) w Szczecinie o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Cieśli do dalszych etapów przewodu doktorskiego, wnioskując jednocześnie o wyróżnienie pracy.

Z poważaniem,

Dr hab. n. med. Magdalena Gąssowska-Dobrowolska

