



Poznań, 10 marzec 2022 roku

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. Sylwii Bednarskiej

pt. „Analiza stężeń wybranych cytokin uczestniczących w procesach adipogenezy u chorych z zespołem policystycznych jajników – korelacja z parametrami metabolicznymi”.

Promotor: dr hab. n. med. Agnieszka Siejka, prof. UM, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,  
Klinika Endokrynologii.

Zespół policystycznych jajników (PCOS) po raz pierwszy został opisany przez Steina i Leventhala w 1935 r. Choroba jest obecnie uważana za jedną z najczęstszych endokrynopatii wieku rozwojowego. Biorąc pod uwagę rodzaj dominujących zaburzeń w zespole PCOS, można rozróżnić 3 fenotypy tej choroby: metaboliczny, hiperandrogeniczny oraz reprodukcyjny.

Objawy kliniczne u kobiet cierpiących na PCOS mogą mieć miejsce w każdym okresie ich życia, jednakże największe spektrum objawów obserwuje się w wieku reprodukcyjnym. Patogeneza PCOS jest wciąż niejasna, co znacznie utrudnia skuteczne leczenie tej choroby. Główna przyczyna tej choroby jest powiązana z steroidogenezą przebiegającą w jajnikach. U około 93% kobiet z PCOS obserwuje się zaburzenia miesiączkowania oraz anowulacyjne nieregularne cykle. U kobiet z PCOS wykazano nadmierną syntezę androgenów powiązaną z hirsutyzmem, łysieniem, przyrostem masy mięśniowej, obniżeniem barwy głosu oraz trądzikiem. U cierpiących na PCOS obserwuje się również wysokie stężenie LH, zwiększony wskaźnik LH/FSH, podwyższone stężenie estrogenów, prolaktyny, AMH, a także obniżone stężenie SHBG. Wysokie stężenie LH usuwa pik LH, co powoduje, że rzadko występują owulacje.

Androgeny należą do grupy hormonów steroidowych. W organizmie kobiety głównymi androgenami są testosteron, androstendion, DHT oraz siarczan dehydroepiandrosteronu. Testosteron oraz androstendion u kobiet są głównie syntetyzowane w komórkach tekalnych jajników, nadnerczach, a także w niektórych tkankach podczas

obwodowej konwersji ich prekursorów. W komórkach ziarnistych jajników aromataza przekształca androgeny w estrogeny, co ma również miejsce w tkance tłuszczowej oraz innych tkankach obwodowych. W skórze  $5\alpha$ -reduktaza przekształca testosteron w bardziej aktywny androgen DHT.

Androgeny u kobiet są prekursorami estrogenów i odpowiadają za rozwój cech płciowych, płodność, funkcje seksualne, wzrost masy mięśniowej, prawidłową pracę układu mięśniowo-szkieletowego, funkcjonowanie układu krwiotwórczego, retencję sodu, potasu, wapnia, chlorków, owłosienie ciała oraz rozmieszczenie tkanki tłuszczowej, a także barwę głosu. Zaledwie 1–3% testosteronu wykazuje aktywność biologiczną, znaczna jego część, tj. od 97 do 99%, jest nieaktywna biologicznie i związana z SHGB oraz albuminami.

Androgeny i estrogeny należą do grupy hormonów steroidowych. Jako lipofilne cząsteczki dyfundują przez błony komórek docelowych, w cytozolu wiążą się z swoistym receptorem. Ponadto oddziałują na komórki docelowe, wykorzystując klasyczną „genomową ścieżkę”, w której kompleks hormon-receptor przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie oddziałuje ze swoistymi sekwencjami DNA. Androgeny oraz estrogeny wpływają też na komórki docelowe, wykorzystując szlak niegenomowy, który polega na połączeniu się hormonu z receptorami trwale związanymi z błoną komórkową.

Synteza oraz uwalnianie androgenów i estrogenów są regulowane przez oś podwzgórze-przysadka-gonady. Podwzgórzowa gonadoliberyna pobudza przysadkę mózgową do sekrecji lutropiny, która stymuluje biosyntezę androgenów i progesteronu. Komórki tekalne pod wpływem lutropiny przekształcają cholesterol do androgenów, które w komórkach ziarnistych jajników pod wpływem FSH ulegają aromatyzacji do estrogenów.

Badania prowadzone w grupie kobiet z PCOS wykazały, że patogeneza tej choroby jest wynikiem złożonej interakcją między czynnikami genetycznymi, epigenetycznymi oraz środowiskowymi. Zaobserwowano, że podczas hiperandrogenizacji prenatalnej dochodzi do zmian metylacji DNA w obrębie genów uczestniczących w procesie steroidogenezy.

Nadmiar androgenów jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój zespołu PCOS. Wskazuje się, że nadmierna synteza androgenów może być spowodowana wysoką aktywnością cytochromu P450C17, która może mieć związek z nieprawidłowym stężeniem gonadoliberyny oraz lutropiny. Inne badania sugerują, że rozwój PCOS może mieć związek z brakiem uwalniania przez podwzgórze dopaminy, co odpowiada za wysokie stężenie

prolaktyny oraz gonadoliberyny. U pacjentek z PCOS wykazano również zwiększoną aktywność 5- $\alpha$  reduktazy, która przekształca testosteron do DHT.

Hiperinsulinemia oraz insulinooporność również odgrywa kluczową rolę w patogenezie zespołu PCOS. Cukrzycę typu 2 oraz hiperinsulinemię stwierdza się u około 40% kobiet z PCOS. Insulina działa synergistycznie z lutropiną, zwiększając steroidogenezę jajnikową u kobiet z PCOS. Insulina może również stymulować wydzielanie gonadoliberyny oraz pulsy lutropiny a tym samym zwiększać syntezę androgenów.

W patogenezie PCOS istotną rolę odgrywają również czynniki środowiskowe. Do czynników tych należą m.in. produkty powstałe w wyniku glikacji białek tzw. AGEs, które mogą być tworzone endogennie lub egzogennie np. z diety. AGEs zmieniają aktywność enzymów, indukują syntezę czynników prozapalnych oraz stres oksydacyjny, co prowadzi do wielu chorób. Do czynników środowiskowych należy również bisfenol A, składnik opakowań żywności oraz butelek. Czynniki te wykazują właściwości estrogenowe, które zaburzają funkcjonowanie osi podwzgórze-przysadka-jajnik. Patogenezę PCOS wiąże się również z autoimmunizacją, która może mieć związek z niedoborem witaminy D oraz pierwiastków śladowych.

W ostatnim czasie zwrócono uwagę na możliwy udział czynników wzrostu fibroblastów (FGFs) oraz ich receptorów i koreceptorów w patogenezie PCOS. Nieprawidłowa ekspresja tych białek może prowadzić do zaburzeń metabolizmu lipidów oraz cukrów, jak też do rozwoju wielu chorób, w tym nowotworowych. Szczególną uwagę w kontekście PCOS zwrócono na FGF 1,7,10,19 oraz 21, ich rozpuszczalne formy receptorów oraz koreceptor  $\beta$ -Klotho.

Rozprawa doktorska lek. Sylwii Bednarskiej podejmuje próbę wyjaśnienia związku pomiędzy stężeniem czynników wzrostu fibroblastów, ich rozpuszczalnych form receptorów i koreceptora  $\beta$ -Klotho z występowaniem zespołu PCOS. Doktorantka postanowiła również zbadać zależność pomiędzy stężeniami badanych FGFs, FGFRs oraz  $\beta$ -Klotho a parametrami metabolicznymi i hormonalnymi. Lek. Sylwia Bednarska podjęła się również oceny różnic w stężeniach FGFs pomiędzy grupą szczupłych i otyłych kobiet chorujących na PCOS. Kandydatka postanowiła również znaleźć wśród czynników wzrostu fibroblastów, ich rozpuszczalnych form receptorów i koreceptorów takie, które mogą być wykorzystane jako markery w diagnostyce zespołu PCOS.

Praca doktorska lek. Sylwii Bednarskiej liczy 98 stron, w tym 31 stron zajmuje „Wstęp”, 2 strony „Cel pracy”, 9 stron „Materiały i metody”, 19 stron „Wyniki”, 5 stron „Dyskusja” oraz 1 strona „Wnioski”. W pracy Autorka zamieściła 273 pozycje piśmiennictwa, 11 tabel, 17 rycin, 3 strony zawierające skróty.

We „Wstępie” lek. Sylwia Bednarska opisała anatomię i fizjologię jajnika, szczególnie zwracając uwagę na jego położenie, budowę oraz cykl jajnikowy. Przedstawiła również mechanizm działania androgenów w komórkach docelowych, budowę ich receptorów, a także funkcje biochemiczne i fizjologiczne androgenów u kobiet. Doktorantka scharakteryzowała również kryteria rozpoznania oraz objawy kliniczne PCOS, tj. hiperandrogenizm, zaburzenia owulacji oraz ultrasonograficzny obraz jajnika policystycznego.

Lek. Sylwia Bednarska we „Wstępie” zaprezentowała szczegółowy opis patogenezы PCOS, zwróciła uwagę na rolę czynników genetycznych, epigenetycznych, środowiskowych w rozwoju tej choroby. Ponadto dokładnie scharakteryzowała wpływ hiperinsulinemii w patogenezie zespołu PCOS. Końcowa część „Wstępu” zawiera opis roli wybranych czynników wzrostu fibroblastów (FGF1, FGF7, FGF10, FGF19, FGF21), ich receptorów (FGFR1, FGFR2, FGFR4) oraz koreceptora  $\beta$ -Klotho w rozwoju człowieka, metabolizmie oraz ich związku z różnymi chorobami.

Celem pracy była ocena stężeń czynników wzrostu fibroblastów, ich rozpuszczalnych form receptorów i koreceptora  $\beta$ -Klotho u kobiet z PCOS oraz kobiet zdrowych.

Szczegółowe cele badań obejmowały:

- Zbadanie różnic pomiędzy stężeniem wybranych FGFs, FGFRs i  $\beta$ -Klotho w grupie badanej i w grupie kontrolnej.
- Ocenę zależności pomiędzy stężeniami FGFs, FGFRs i  $\beta$ -Klotho a parametrami metabolicznymi i hormonalnymi.
- Zbadanie różnic FGFs pomiędzy grupą szczupłych i otyłych kobiet z PCOS.
- Próbę znalezienia czynników wzrostu fibroblastów, ich receptorów i koreceptorów jako markerów w diagnostyce kobiet z zespołem PCOS.

W sekcji „Materiały i metody” doktorantka dokładnie opisała grupę badawczą oraz kontrolną. Część „Metody” zawiera opis metod diagnostycznych, badań obrazowych, podmiotowych i przedmiotowych pacjentek oraz grupy kontrolnej. Ponadto uwzględnia też opis badań laboratoryjnych, testów hormonalnych i biochemicznych oraz testów

immunoenzymatycznych oznaczania czynników wzrostu fibroblastów, ich receptorów oraz koreceptora  $\beta$ -Klotho. Metody zostały opisane bardzo starannie, a dokumentacja przedstawiona w części wynikowej świadczy o doskonałej znajomości użytych metod oraz technik laboratoryjnych.

Lek. Sylwia Bednarska wykazała, że niektóre FGFs i  $\beta$ -Klotho mogą być istotnymi statystycznie predyktorami występowania zespołu PCO. Doktorantka, wykorzystując test immunoenzymatyczny, zaobserwowała pomiędzy grupą pacjentek z PCOS a grupa kontrolną istotne statystyczne różnice stężeń dla FGFR1, FGF19 oraz  $\beta$ -Klotho w surowicy krwi żyłnej. Następnie, wykorzystując wyniki badań laboratoryjnych, lek. Sylwia Bednarska wykazała wyższe stężenia LH, 17-OH progesteronu, androstendionu, testosteronu, DHEA-S oraz PRL w grupie pacjentek, natomiast wyższe stężenia FSH, aTG, SHBG i triglicerydów zaobserwowała we krwi żyłnej kobiet zdrowych. Ponadto w grupie badanej wykazano istotne statystycznie dodatnie korelacje pomiędzy stężeniem PRL a stężeniem FGFR2, FGFR4, FGF1, FGFR1, FGF19, FGF10 i  $\beta$ -Klotho oraz pomiędzy aTG a stężeniami FGFR4, FGF19, FGF10 i  $\beta$ -Klotho. Aktywność aminotransferazy alaninowej we krwi żyłnej korelowała ujemnie ze stężeniem FGF7/KGF i FGF21, a stężenie kwasu moczowego korelowało ujemnie ze stężeniem we krwi FGFR2, FGFR4, FGF1, FGFR1, FGF19, FGF7/KGF i FGF21. W doustnym teście obciążenia glukozą stężenie tej ostatniej po 60 minutach ujemnie korelowało ze stężeniem FGFR2, FGFR4, FGF1, FGFR1, FGF7/KGF, FGF10, FGF21 i  $\beta$ -Klotho w osoczu krwi żyłnej. Stężenie glukozy na czczo korelowało ujemnie z  $\beta$ -Klotho.

W „Dyskusji” lek. Sylwia Bednarska umiejętnie omówiła wyniki badań własnych w odniesieniu do danych z literatury światowej. „Dyskusja” dowodzi dojrzałości naukowej Doktorantki.

Praca została zakończona 6 wnioskami, które są związane z celem pracy. Piśmiennictwo jest obszerne oraz dobrze dobrane. Świadczy to o bardzo dobrym rozeznaniu Doktorantki w literaturze dotyczącej roli wybranych czynników wzrostu fibroblastów, ich receptorów oraz koreceptora  $\beta$ -Klotho w patogenezie PCOS u kobiet.

Do obowiązków recenzenta należy wskazanie uchybień i istniejących nieścisłości, które w odniesieniu do recenzowanej rozprawy mają charakter drobnych uwag.

Doktorantka powinna jasno na początku pracy wyjaśnić, że oznaczała w osoczu krwi stężenie rozpuszczalnych form receptorów dla FGFs. Następnie używać w innych rozdziałach skrótu FGFRs, gdzie litera „s” oznacza formę rozpuszczalną.

W rozdziale „Materiały i Metody” opis pobierania krwi żyłnej jest niejasny. Nie wiadomo, czy krew była pobierana do próbek z heparyną lub EDTA, a może do szklanych fiolek? Ponadto, czy oznaczenia testem immunoenzymatycznym były wykonane w surowicy, czy osoczu krwi.

W rozdziałach „Materiały i metody”, „Wyniki” oraz „Dyskusja” nie dookreślono, w jakiej grupie wykonano korelacje pomiędzy stężeniem FGFs a wynikami badań laboratoryjnych, tj. czy to była grupa pacjentek z PCOS, czy pacjentki oraz grupa kontrolna. Użyte określenie grupa badana nie jest jednoznaczne.

Te drobne uwagi w żaden sposób nie obniżają wartości naukowej pracy. Pragnę również podkreślić, że pod względem edytorskim praca jest dopracowana. Napisano ją w sposób przejrzysty, wszystkie rozdziały są podzielone na niewielkie podrozdziały, co bardzo ułatwia czytanie i analizowanie informacji zebranych w częściach „Wyniki” i „Dyskusja”.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Sylwii Bednarskiej podejmuje próbę wyjaśnienia czynników wzrostu fibroblastów, ich receptorów i koreceptorów w patogenezie zespołu PCOS, co może w przyszłości pomóc w opracowaniu następnej generacji leków stosowanych w terapii tej choroby.

Praca jest bardzo nowatorska, wnosi nieznane i istotne informacje do nauki światowej oraz spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Całość pracy świadczy o dużej dojrzałości naukowej i wysokich kwalifikacjach naukowych lek. Sylwii Bednarskiej.

Zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. Sylwii Bednarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Kierownik Katedry i Zakładu  
Biochemii i Biologii Molekularnej

*Prof. dr hab. Paweł P. Jagodziński*

.....  
Kierownik Katedry i Zakładu  
Biochemii i Biologii Molekularnej