



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra Podstaw Nauk Medycznych i Immunologii

Zakład Podstaw Nauk Medycznych

Kierownik: dr hab. Ewa Barg prof. UMW

Wrocław 22.07.2024

Ocena rozprawy doktorskiej na stopień doktora nauk medycznych o nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne lek. Marty Sumińskiej

Sekrecja, metabolizm i wydalanie kortykosteroidów u dzieci i młodzieży z otyłością w relacji do ich cech klinicznych

Promotor prof. dr hab. Marta Fichna

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Rafał Podgórski

Praca została wykonana w Klinice Diabetologii, Auksologii i Otyłości Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

WHO przewidywało występowanie otyłości i nadmiernego przyrostu masy ciała epidemią XXI blisko 50 lat temu. Narastająca ilość osób na świecie budzi przerażenie, jest to ponad 400mln. Tym bardziej, że u osób z tym schorzeniem zdecydowanie częściej występują choroby metaboliczne, ale także istnieje zwiększone ryzyko chorób nowotworowych. Wyniki przeprowadzonych badań w Polsce wykazały, że liczba dzieci i młodzieży zwiększa z roku na rok. Przyczyną jest nieprawidłowa dieta, duża ilość spożywanej przetworzonej żywności oraz mała aktywność ruchowa. Należy jednak pamiętać o pozytywnych aspektach obecności tkanki tłuszczowej w organizmie. Jest ona uważana za aktywny biologicznie gruczoł wydzielania wewnętrznego syntetyzujący hormony, czynniki wzrostu, cytokiny (również prozapalne) i liczne adipokinami, działające zarówno w obrębie tkanki tłuszczowej (działanie auto- i parakryne), jak i w odległych narządach (klasyczne działanie hormonalne). Tkanka tłuszczowa odgrywa również bardzo istotną rolę w sekwestracji oraz metabolizmie krążących hormonów steroidowych kory nadnerczy. Steroidy, głównie glikokortykosteroidy i androgeny, pełnią szczególną rolę w utrzymaniu prawidłowej homeostazy energetycznej organizmu poprzez regulację metabolizmu glukozy, tłuszczów i białek.

abc

Wydaje się zatem celowe podejmowanie badań nad podstawowymi mechanizmami związanymi z regulacją bilansu energetycznego u osób z nadwagą i otyłością.

Doktorantka podjęła się próby oceny sekrecji, metabolizmu i wydalania kortykosteroidów u dzieci i młodzieży z otyłością w relacji do ich cech klinicznych

Celem przeprowadzonych badań było rozpoznanie potencjalnych zaburzeń steroidogenezy i zmian metabolizmu steroidów u dzieci i młodzieży, ze zwiększoną masą ciała, ale z uwzględnieniem płci oraz stopnia dojrzewania płciowego. Równie istotny w ocenie doktorantki wydawał się też wpływ nadmiaru tkanki tłuszczowej, zwłaszcza trzewnej, na czynność wątroby, a tym samym jej udział w metabolizmie steroidów.

Badania zostały przeprowadzone u blisko 200 dzieci, w wieku od 5 do 18 lat, pacjentów Kliniki Diabetologii, Auksologii i Otyłości Wiekowej Uniwersyteckiego Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Autorka przyjęła jako kryteria kwalifikacji do badań : otyłość wartość BMI powyżej 97 centyla wg norm dla polskich dzieci, IR rozpoznano u dzieci, które charakteryzowały się wskaźnikiem insulinooporności (HOMA-IR) > 97. centyla wraz z towarzyszącym stężeniem insuliny na czczo w osoczu (FPI) > 15 mU/ml. Grupę kontrolną stanowiły dzieci normowagowe, z wartością BMI pomiędzy 15. a 85. centylem tych samych kanałów referencyjnych dla polskich dzieci i nastolatków. Kryteriami wykluczenia były: choroby przewlekłe lub otyłość wtórna do rozpoznanych zaburzeń endokrynologicznych lub zespołów uwarunkowanych genetycznie, farmakoterapia i specjalistyczna dieta. Wszyscy pacjenci przeszli rutynową ocenę kliniczną, w tym wywiad, ogólne badanie fizykalne, podstawowe pomiary antropometryczne i ocenę stadium pokwitania na podstawie skali Tannera. Badanie zostało poprzedzone 24-godzinną zbiórką moczu wykonaną zgodnie ze standardowym protokołem, przeprowadzonym w domu, co znacznie ograniczyło stres związany z hospitalizacją.

Projekt badawczy został przeprowadzony zgodnie z Deklaracją Helsińską i zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (decyzja nr 866/20, 10 grudnia 2020 r.). Świadoma zgoda została uzyskana od dzieci w wieku co najmniej 16 lat, a w przypadku osób małoletnich od ich przedstawicieli ustawowych.

Cykl prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej stanowią 4 prace opublikowane w recenzowanych czasopismach. Z załączonych oświadczeń współautorów wynika, że są Oni świadomi włączenia publikacji do rozprawy doktorskiej i że Doktorantka odgrywa w nich wiodącą rolę, co potwierdzone jest pozycją pierwszego autora i wkładem pracy. Pod tym względem nie mam żadnych uwag i zastrzeżeń dotyczących prawidłowości przygotowania dokumentacji.

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowią 4 prace:

1. Sumińska M, Bogusz-Górna K, Wegner D, Fichna M Non-Classic Disorder of Adrenal Steroidogenesis and Clinical Dilemmas in 21-Hydroxylase Deficiency Combined with Backdoor Androgen Pathway. Mini-Review and Case Report.

Int J Mol Sci. 2020 Jun 29;21(13):4622. doi: 10.3390/ijms21134622.

IF 5,9, MNiE 140 pkt

CB 2.

2. **Sumińska M**, Podgórski R, Fichna P, Fichna M

Steroid Metabolism in Children and Adolescents With Obesity and Insulin Resistance: Altered SRD5A and 20 α /20 β HSD Activity.

Front Endocrinol (Lausanne). 2021 Oct 26;12:759971. doi: 10.3389/fendo.2021.759971

IF 6.0 MNiE 100pkt

3. **Sumińska M**, Podgórski R, Fichna P, Mazur A, Fichna M The Impact of Obesity on the Excretion of Steroid Metabolites in Boys and Girls: A Comparison with Normal-Weight Children.

Nutrients. 2023 Apr 1;15(7):1734. doi: 10.3390/nu15071734

IF 5.9 MNiE 140 pkt

4. **Sumińska M**, Podgórski R, Fichna P, Mazur A, Fichna M. Assessment of steroid enzymes action in children and adolescents with obesity.

Steroids. 2023 Dec;200:109325. doi: 10.1016/j.steroids.2023.109325

IF 2.7. MNiE 70pkt

Ad1. Autorka włączyła tę pracę, by przedstawić informacje o analizie profilu wydalania steroidów z moczem. Jak trudna bywa interpretacja tego badania wiedzą wszyscy którzy zajmują się tymi zagadnieniami. Praca ta wprowadza w niuanse interpretacji profilu metabolitów steroidowych w moczu z podkreśleniem tzw. szlaku „back-door pathway” biosyntezy androgenów. Analiza wyników tego pacjenta ilustruje złożoność sekrecji i metabolizmu kortykosteroidów w przełożeniu na kliniczną sytuację pacjenta. Autorka opisuje również zaburzenia kliniczne związane z nieprawidłową aktywnością 21-hydroksylazy, trudności prowadzonej diagnostyki, wskazując istotne punkty. Jest to niezmiernie istotne, bo cechy androgenizacji u pacjentów są przyczyną stanowią dość często przyczynę wizyty u endokrynologa.

Rysunek zamieszczony przez Doktorantkę w tej pracy jest bardzo istotny, gdyż pokazuje drogę syntezy poszczególnych sterydów nadnerczowych, co znacznie ułatwia zrozumienie procesów sterydogenezy.

W pracy przedstawiono opis 17-letniej pacjentki, u której stwierdzono zaburzenia miesiączkowania, cechy nadmiernego trądziku i hirsutyizmu, początkowo wysuwając podejrzenie zespołu policystycznych jajników (PCOS), a następnie prowadzono diagnostykę w kierunku chorób nadnerczy i innych przyczyn hiperandrogenizacji. Wykonanie odpowiedniej diagnostyki, szczególnie profilu steroidowego w moczu dobowym, pozwoliło na postawienie właściwego rozpoznania i wdrożenia odpowiedniego leczenia.

Z własnego doświadczenia jako endokrynologa wiem, jaki problem stanowi diagnostyka nadmiernej androgenizacji. Konieczne jest wykonanie szeregu badań laboratoryjnych oraz testów stymulacyjnych, aby ustalić przyczynę obserwowanych objawów i zaproponować odpowiednie kroki terapeutyczne w celu zapewnienia optymalnego leczenia. Doktorantka przedstawiła to w sposób przejrzysty i jasny.

Ad2.

W tej pracy Autorka opisała insulinooporność, która połączona jest zwykle z nadmiarem tkanki tłuszczowej, wydzielanymi przez nią adipokinami, wspomniała również o czynniku TNF-alfa. Poruszyła problem wpływu zastosowanej sterydoterapii na występowanie insulinooporności, o czym warto pamiętać, szczególnie gdy przyczyną podania nie są schorzenia endokrynologiczne.

Doktorantka porównała stężenia metabolitów steroidowych, ale także oceniła aktywności najważniejszych enzymów zaangażowanych w biosyntezę, metabolizm i wydalanie hormonów nadnerczowych u dzieci i młodzieży z otyłością oraz ich rówieśników z otyłością i insulinoopornością. Jest to istotne spostrzeżenie, gdyż nie wszystkie dzieci z otyłością wykazują insulinooporność. W badanej grupie dzieci bazując na proporcji androsteronu do etiocholanolonu (An/Et) wykazała wzrost aktywności 5 α -reduktazy (SRD5A) ale tylko u chłopców z IR, natomiast nie udało się potwierdzić tej obserwacji w grupie dziewczynek. Może to sugerować nasilenie obwodowej aktywacji androgenów. Zaobserwowano ją w grupie męskiej prawdopodobnie ze względu na fakt stosunkowo małego znaczenia SRD5A w metabolizmie glikokortykosteroidów, a zdecydowanie większego w aktywacji androgenów w tkankach obwodowych. Ciekawe spostrzeżenie dotyczy spadku aktywności dehydrogenazy 20 α -hydroksysteroidowej (20 α HSD) i dehydrogenazy 20 β -hydroksysteroidowej (20 β HSD) w grupie dziewczynek z otyłością i IR. Oba te enzymy są szeroko rozpowszechnione w narządach, Autorka nie jest w stanie jednoznacznie stwierdzić czy ich aktywność jest wykładnikiem funkcji jajników, czy również nadnerczy. Insulinooporność, a więc upośledzenie wrażliwości na insulinę, w różnym stopniu dotyka poszczególne tkanki, dlatego zwiększona obecność insuliny we krwi może oznaczać odmienne efekty w różnych narządach. Autorka podsumowując stwierdza potrzebę dalszych badań zależności między steroidami a IR, z odpowiednim podziałem na grupy chorych, gdyż zwykle trudno jest oddzielić od siebie równolegle otyłość i insulinooporność. Problem poruszony przez Doktorantkę jest istotny, dalsze badania są potrzebne, szczególnie u pacjentów z insulinoopornością, ale bez współistniejącej otyłości. Z klinicznego punktu widzenia tym bardziej, że zdarzają się pacjenci z problemem insulinooporności bez otyłości. W ocenie recenzenta ciekawe byłoby przeprowadzenie badań w fizjologicznym okresie wzmożonego wydzielania insuliny czyli w okresie dojrzewania u osób bez nadwagi i otyłości. Przeprowadzone badania Doktorantki wnoszą istotny wkład w poznawanie procesów zachodzących u dzieci i młodzieży.

Ad 3. Rutynową metodą oceniającą metabolizm steroidów, zwłaszcza w pediatrii, stała się chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas. Metoda charakteryzuje się doskonałą rozdzielczością, czułością i swoistością diagnostyczną. W przeciwieństwie do oznaczeń jednopunktowych pozwala na analizę wielu metabolitów jednocześnie.

Dodatkowo techniki chromatograficzne umożliwiają jednoczesny pomiar wielu związków chemicznych w próbce, a następnie określenie stosunku prekursora do produktu, co znacznie zmniejsza ryzyko uzyskania wyniku fałszywie dodatniego, również u wcześniaków i

gbcg 4.

zestresowanych noworodków, czy starszych dzieci. Dodatkową zaletą używania tej metody w diagnostyce chorób nadnerczy, poprzez oznaczanie metabolitów w moczu, jest fakt, że nie wiąże się ona z wystąpieniem stresu związane z pobraniem krwi, co w przypadku oznaczeń niektórych hormonów ma istotne znaczenie i może być przyczyną postawienia nieprawidłowego rozpoznania.

W tej pracy celem była analiza wydalania metabolitów steroidowych z moczem w grupie dzieci z otyłością w porównaniu do dzieci z prawidłową masą ciała. Grupy dodatkowo zostały stratyfikowane według płci i etapu dojrzewania. Doktorantka w omówieniu stwierdziła, że dotychczas przeprowadzane badania dotyczące biologii steroidów obejmowały mniejsze kohorty pacjentów, bez rozróżnienia ich wieku i płci, a także oznaczano również mniej metabolitów steroidowych, niż zostało wykonane w badaniach Doktorantki. Autorka wykazała znaczące różnice między dziećmi z prawidłową masą ciała, a ich rówieśnikami z otyłością, szczególnie w wieku przedpokwitaniowym. W tej grupie wystąpiła zwiększona biosynteza we wszystkich szlakach sterydogenezy nadnerczowej u dzieci z otyłością. Autorka nie stwierdziła znaczących różnic w wydalaniu kortyzolu i kortyzonu, ale wydalanie ich charakterystycznych tetrahydropochodnych różniło się istotnie między grupami. Wykazała również, że ich dalsze metabolity takie jak α -kortol, a zwłaszcza α -kortolon wydają się być wydalane w większej ilości niż β -kortol lub β -kortolon w grupie młodszych dzieci z otyłością. Ponadto w tej grupie zaobserwowała zwiększone wydalanie androgenów, pochodzące głównie ze szlaku alternatywnego. Wraz z postępem dojrzewania odnotowała u badanych pacjentów znaczne zmniejszenie różnic pomiędzy nastolatkami z i bez nadmiernej masy ciała. Wyniki przeprowadzonych badań mogą wskazywać mechanizm dostosowujący stężenie wolnego kortyzolu w krążeniu do poziomu równowagi zbliżonego u dzieci z otyłością, jak i szczupłych. Autorka sugeruje, że mechanizm ten oparty jest na zwiększonym metabolizmie kortyzolu i kortyzonu do ich tetrahydropochodnych oraz następnie do α -kortolu i α -kortolonu. Co więcej pomimo stabilnych stężeń kortyzolu we krwi oraz w moczu, jego powstawanie w nadnerczach wydaje się być nasilone u dzieci z nadmierną masą ciała wraz z aktywacją alternatywnego toru powstawania androgenów. Doktorantka uważa, że różnice mogą odpowiadać wcześniejszemu występowaniu adrenarche u dzieci z otyłością.

Ad4. Przedstawiając ostatnią publikację z cyklu prac stanowiących podstawę do uzyskania tytułu doktora Autorka szczegółowo opisała rolę wybranych enzymów sterydogenezy (dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej, 5 α -reduktazy, dehydrogenaza 3 α -hydroksysteroidowej, dehydrogenazy 20 α -hydroksysteroidowej i dehydrogenazy 20 β -hydroksysteroidowej, 11 β -hydroksylazy, dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowej), odniosła się także do innych zaburzeń metabolicznych np. PCO, otyłości .

W przeprowadzonym badaniu Doktorantka przeanalizowała aktywność wybranych enzymów biorących udział w metabolizmie steroidów w grupie dzieci normowagowych oraz z otyłością, które zostały podzielone ze względu na płeć i stopień dojrzewania. U dzieci z otyłością wykazała szereg zmian w aktywności enzymów przemian steroidowych w porównaniu z rówieśnikami o prawidłowej masie ciała. U dziewcząt zaobserwowano istotny

wzrost aktywności 11 β HSD1 i kompleksu 5 β -reduktaza+3 α HSD. U chłopców natomiast poza istotnym wzrostem znaczenia kompleksu 5 β -reduktaza+3 α HSD, zaobserwowała również wzrost aktywności 20 α HSD. W obu grupach stwierdziła spadek efektywności 11 β -hydroksylazy. W podsumowaniu Autorka stwierdziła, że zmiany w funkcjonowaniu wybranych enzymów mogą być mechanizmem kompensacyjnym ograniczającym ekspozycję kluczowych tkanek docelowych na glikokortykosteroidy, a także poprawiającym kontrolę metaboliczną dla zmniejszania ryzyka długoterminowych powikłań wynikających z nadmiaru tych steroidów w przebiegu otyłości u dzieci i młodzieży.

Dyskusja została przeprowadzona przez Doktorantkę do każdej z prac w sposób świadczący o znajomości tematu. W opinii recenzenta mogłaby być ona bardziej obszerna, aczkolwiek zdają sobie sprawę z pewnych ograniczeń.

Autorka podsumowała swoje wyniki badań w 5 zbiorczych wnioskach, aczkolwiek w każdej z prac wyniki badań były podsumowane. Doktorantka wykazała, że

1. „Przeprowadzone badanie sugeruje wzmożenie steroidogenezy nadnerczowej przy paradoksalnie mniejszej aktywności CYP11B1, zbiegającej się ze zwiększonym obwodowym metabolizmem steroidów, w tym nasilonym nieodwracalnym metabolizmem kortyzolu w wątrobie (wzrost aktywności 5 β -reduktazy+3 α HSD i 20 α HSD) do jego tetrahydropochodnych i kortoli.
2. Odnotowany wzrost aktywności 11 β HSD1 powoduje zwiększenie dostępności kortyzolu co może stanowić lokalny mechanizm adaptacyjny wobec jego szybkiego metabolizowania, albo też być przyczyną nadmiernej masy ciała (o ile współgeneruje np. insulinooporność) lub wtórnym efektem otyłości centralnej. Rozstrzygnięcie które z tych zjawisk mają tu pierwotne bądź wtórne znaczenie oczekuje na kontynuację badań.
3. U dzieci z otyłością równolegle do wzmożenia wstępnych etapów nadnerczowej steroidogenezy prowadzącej ku kortyzolowi, nasileniu ulega także biosynteza androgenów nadnerczowych obserwowana wraz ze wzrostem aktywności SRD5A (zwłaszcza w przypadku otyłości współistniejącej z insulinoopornością). Wyniki przedstawionego cyklu badań wskazują na liczne powiązania tych dwóch szlaków. Zwiększone wydalanie z moczem androsteronu sugeruje nasilenie u dzieci z otyłością alternatywnego szlaku biosyntezy androgeów, który swój początek bierze od 17 α OH-progesteronu, czyli pośredniego metabolitu w drodze wiodącej też do kortyzolu. Z kolei zwiększone wydalanie etiocholanolonu można wiązać z klasycznym szlakiem androgenyzy, jednak w zdecydowanie większym stopniu powstaje on jako metabolit tetrahydrokortyzolu.
4. Znaczne zwiększenie wydalania trzech głównych metabolitów kortykosteronu: tetrahydro-11-dehydrokortykosteron, tetrahydrokortykosteronu i 5 α -

tetrahydrokortykosteronu u przedpokwitaniowych dzieci i młodzieży z otyłością potwierdza wzmożenie steroidogenezy nadnerczowej również w szlaku mineralokortykosteroidów.

5. Niewątpliwie u dzieci i młodzieży z otyłością obserwuje się zmiany w nasileniu steroidogenezy nadnerczowej oraz modyfikację obwodowego metabolizmu steroidów. Zmiany te, najczęściej przebiegające subklinicznie, można interpretować jako mechanizmy adaptacyjne wobec zwiększonej masy ciała, które mają za zadanie utrzymywać steroidową homeostazę organizmu. „

Wnioski zostały sformułowane w sposób właściwy, dość ostrożny, ale „oddają” wyniki przeprowadzonych badań. Takie przedstawienie wniosków potwierdza dobrą znajomość tematu i krytyczność wobec uzyskanych wyników, ale także zrealizowanie celu pracy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się z wykazu publikacji wchodzących w skład cyklu, wykazu symboli oraz rozdziałów: wstęp, założenia i cele pracy, materiał i metody badań, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim, opinię Komisji Bioetycznej, publikacje cyklu wraz z oświadczeniami współautorów. Przygotowana została na 48 stronach, napisana jest językiem poprawnym, choć zdarzają się niewielkie lapsusy językowe. Nie ma to zasadniczego wpływu na zawartość merytoryczną przedstawianej pracy.

Cykl prac Doktorantki wnosi istotny wkład w poszerzeniu wiedzy na temat udziału kory nadnerczy w otyłości i towarzyszących zaburzeń. Uważam, że uzyskane wyniki badań powinny być zaprezentowane także innym grupom zawodowym, które opiekują dziećmi z nadwagą i otyłością np. dietetykom.

W ocenie recenzenta cykl przedstawionych prac stanowi podstawę do ubiegania się o stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne, a także zasługuje na wyróżnienie, zarówno ze względu na zawartość merytoryczną jak i ocenę bibliometryczną (IF 20,5, pkt MNiE 450).

Dodatkowo przedstawiona analiza bibliometryczna oceniająca dorobek lek. Marty Sumińskiej jest znacząca (IF 60, MNiE 1346, Indeks Hirscha 5), co świadczy o dużym potencjale naukowym doktorantki.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. Marty Sumińskiej spełnia warunki określone w art.187 ust 1i2 ustawy z dnia 20.lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce roku (Dz.U 2022 poz.574) i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Stawiam wniosek do Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie lek. Marta Sumińska do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

gbcy 4.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy lek. Marty Sumińskiej za wniesienie nowej wiedzy o procesach sterydogenezy u dzieci i młodzieży z otyłością w relacji do ich cech klinicznych.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Podstaw Nauk Medycznych i Immunologii
ZAKŁAD PODSTAW NAUK MEDYCZNYCH
kierownik

dr hab. n. med. Ewa Barg, profesor uczelni

dr hab. n. med. EWA BARG
specjalista endokrynolog
specjalista endokrynolog
i diabetolog dziecięcy
specjalista pediatra
2718129