

Łódź, dnia 12.09.2023 r.

dr hab. Michał Bijak, prof. UŁ
Kierownik Centrum Zapobiegania
Zagrożeniom Biologicznym

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Adama Wróblewskiego pt.:
„Modyfikacje epigenetyczne genów związanych z procesem zapalnym i
insulinoopornością w wisceralnych adipocytach hodowanych w hiperglikemii i
wisceralnej tkance tłuszczowej pacjentów z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej”

Promotor pracy – Prof. dr hab. n. med. Janusz Szemraj

Przedłożona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych jest cyklem tematycznych publikacji, na który składają się trzy prace naukowe w języku angielskim. Są dwie prace eksperymentalne i jedna praca przeglądowa. Prace zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). We przedstawionych pracach Doktorant jest pierwszym Autorem, jak również jest wskazany jako Autor korespondencyjny. Łączna punktacja opublikowanych prac włączonych w cykl stanowiący podstawę rozprawy doktorskiej stanowi 420 pkt. MNiSW według wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych z dnia 17.07.2023. Łączny współczynnik oddziaływań Impact Factor (wg. wykazu za rok 2022) dla opublikowanych prac wynosi 14,6. Badania zostały sfinansowane m.in. ze środków

Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu naukowego OPUS 9, którego Kierownikiem jest promotor pracy doktorskiej prof. dr hab. Janusz Szemraj.

Tkanka tłuszczowa (łac. *textus adiposus*) zaliczana jest u zwierząt do tkanki łącznej, która znajduje się głównie w warstwie podskórnej. Jej znaczenie fizjologiczne jest obserwowane głównie u zwierząt stałocieplnych, choć w rozwoju filogenetycznym tkanka ta pojawia się już u stawonogów. U ludzi rozróżniamy dwa rodzaje tkanki tłuszczowej: tkankę tłuszczową białą (ang. *white adipose tissue* – WAT), jak również brunatną tkankę tłuszczową (ang. *brown adipose tissue* – BAT). Biała tkanka tłuszczowa w fizjologicznych warunkach ma głównie za zadanie magazynować energię dla organizmu (w formie trójglicerydów) oraz w związku z tym, że jest również największym gruczołem wydzielania wewnętrznego ma produkować hormony, które wydzielane są do krwi. Dodatkowo, WAT wypełnia przestrzeń pomiędzy narządami i organami, pomagając w utrzymaniu stałej lokalizacji organów wewnętrznych, jak również posiada właściwości izolacyjne, ułatwiając termoregulację organizmu w chłodnym klimacie. Tkanka tłuszczowa zbudowana jest z komórek tłuszczowych zwanych adipocytami oraz macierzy łącznotkankowej, która zawiera naczynia krwionośne i komórki układu immunologicznego. Tkanka tłuszczowa jest bogato unerwiona przez układ nerwowy współczulny.

Jednymi z głównych substancji efektorowych (zwanymi adipokinami), produkowanych przez białe komórki tłuszczowe (adipocyty) są leptyna, adiponektyna, interleukina 6 oraz rezystyna. Te bioaktywne peptydydy wywierają kluczowy wpływ na procesy metaboliczne, uwrażliwiają tkanki na działanie insuliny, są odpowiedzialne za metabolizm lipidów oraz nieswoistą odpowiedź immunologiczną. W momencie, gdy w organizmie występuje nadmiar białej tkanki tłuszczowej dochodzi do zaburzenia poziomu wydzielania tych peptydów, co skutkuje większą zapadalnością na choroby metaboliczne i cukrzycę typu 2.

Cukrzyca typu 2 jest jedną z najpoważniejszych chorób cywilizacyjnych, zgodnie z szacunkami na rok 2045, przewidywana liczba osób cierpiących na tę chorobę przewlekłą wyniesie prawie 800 mln. Dlatego też, badania przeprowadzone przez Doktoranta w ramach przedstawionej dysertacji wpisują się w nurt naukowy, który ma na celu zrozumienie molekularnego mechanizmu powstawiania zjawiska insulinooporności oraz powiązania go

z WAT, co ze względu na możliwość przyszłego terapeutycznego zastosowania zasługuje na szczególną pochwałę.

Za cel główny realizowanych badań Doktorant postawił sobie zbadanie epigenetycznych modyfikacji genów związanych z procesem zapalnym i insulinoopornością w warunkach zaburzonej gospodarki węglowodanowej, w modelach *in vitro* oraz *ex vivo*. Cel główny Doktorant podzielił na pięć celi szczegółowych (3 cele badań w warunkach *in vitro* oraz 2 cele w warunkach *ex vivo*), które zostały przez Niego osiągnięte w trakcie realizacji badań. Dodatkowo, opisane cele szczegółowe przedstawiają kompleksowe podejście badawcze do tematu dysertacji.

W wprowadzeniu do pracy Doktorant szczegółowo przedstawia znaczenie białej tkanki tłuszczowej w rozwoju insulinooporności. Pozwala to zrozumieć cel prac badawczych podjętych w ramach dysertacji. Następnie przedstawione są molekularne mechanizmy epigenetyczne wskazujące w sposób wyczerpujący problematykę przedłożonej dysertacji. Niewielkie zastrzeżenia budzą jedynie nieliczne błędy natury edytorskiej (np. stosowanie różnych skrótów VAT albo WAT). Niemniej, Doktorant bardzo płynnie porusza się w zagadnieniach związanych z rolą epigenetyki w chorobach metabolicznych. Dowodem tego jest opublikowana i włączona w skład rozprawy doktorskiej praca przeglądowa, gdzie na uwagę zasługuje rycina pierwsza obrazująca model regulacji za pomocą miRNA szlaków sygnałowych, indukowanych przez leptyny.

Część doświadczalna przedłożonej pracy doktorskiej obejmuje badania, które przeprowadzone były w warunkach *in vitro* na komórkach wisceralnych preadipocytów człowieka (HPA-v) hodowanych w warunkach chronicznej hiperglikemii (ChHG) i przejściowej hiperglikemii (PrHG) w porównaniu do kontrolnej hodowli w warunkach normoglikemii (NG). Kolejnym materiałem badawczym była biała tkanka tłuszczowa pobrana od pacjentów z T2DM i IFG oraz osób z prawidłowym metabolizmem glukozy przyjętych na Oddział Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej w Centralnym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Na badania została wydana zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Materiał został odpowiednio zabezpieczony przed degradacją cząsteczek RNA. Bardzo wysoko oceniam kryteria włączenia oraz wykluczenia zastosowane podczas doboru pacjentów do badań.

Badania dotyczące analizy poziomu ekspresji cząsteczek miRNA jak również mRNA przeprowadzone zostały z wykorzystaniem metody łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym przy użyciu komercyjnej sondy hybrydującej typu TaqMan. Jest to najczulsza i najbardziej specyficzna metodyka wykrywania ilości poszczególnych cząsteczek miRNA w materiale biologicznym, stąd jej wybór przez Doktoranta zasługuje na pochwałę. W tym miejscu chciałbym zadać pytanie dotyczące klucza doboru genów referencyjnych, gdyż nie były to standardowo stosowane – 18S RNA, GAPDH czy β -aktyna. W przypadku badań na materiale komórkowym Doktorant wykonał również analizę stężenia produktów białkowych analizowanych genów przy pomocy testów ELISA. Jako uzupełnienie badań *in vitro* wykonał On analizę ekspresji regionów promotorowych badanych genów w wyizolowanych fragmentach chromatyny.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników została wykonana przy użyciu prawidłowo dobranych testów statystycznych (analizy wielokrotnych porównań). Jednak w przypadku badań *in vitro* zabrakło informacji na temat analizy jednorodności wariancji, która jest warunkiem zastosowania testu post-hoc Tukeya.

Uzyskane wyniki przedstawiono w formie opisowej w czytelny sposób. Doktorant wykazał, że warunki hiperglikemii indukują w adipocytach zmiany ekspresji genów takich jak NFKB1, INSR, TIGAR, IL-6 i APN, które są zorientowane na zaostrzenie stanu zapalnego oraz upośledzenie insulinowrażliwości. Dodatkowo, hiperglikemia powoduje również zmiany w profilu ekspresji cząsteczek miRNA (miR-26a-5p, miR-26b-5p, let-7d-5p, let-7e-5p, miR-365a-3p, miR-146a-5p). Badania Pana mgr. Adama Wróblewskiego również wykazały zmiany w poziomie regionów promotorowych dla IL-6 oraz adipokiny. W badaniach przeprowadzonych *ex vivo* na materiale pochodzącym od pacjentów z T2DM Doktorant wykazał zwiększony poziom cząsteczek mRNA dla genów NFKB1 i TIGAR, a także zwiększoną ekspresję miR-10b-5p, miR-132-3p, miR-26a-5p, miR-20a-5p i miR-21-5p.

Na zakończenie Doktorant podsumowuje otrzymane wyniki w czytelny i syntetyczny sposób. Formułuje wnioski które konkludują badania, odnosząc się do głównego celu postawionego w pracy doktorskiej.

W mojej ocenie wyniki otrzymane w ramach przedłożonej mi do oceny pracy doktorskiej mają wysoką wartość merytoryczną i wskazują molekularne zmiany, które mogą być odpowiedzialne za powstawanie insulinoporności prowadzącej do wystąpienia T2DM.

Ma to olbrzymie znaczenie w kwestii kondycji zdrowotnej starzejącego się społeczeństwa oraz zwiększenia częstości zapadania na choroby cywilizacyjne. Stąd też zachęcam Doktoranta jak również Promotora i cały Zespół badawczy do kontynuacji prac zmierzających do pełnego wyjaśnienia molekularnego mechanizmu występowania insulinooporności i opracowania innowacyjnych terapii celowanych w tym kierunku.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Adama Wróblewskiego pt. „Modyfikacje epigenetyczne genów związanych z procesem zapalnym i insulinoopornością w wisceralnych adipocytach hodowanych w hiperglikemii i wisceralnej tkance tłuszczowej pacjentów z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej” posiada dużą wartość poznawczą i bez wątpienia spełnia warunki określone w przepisach wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce art. 179 (Dz. U. 2018, poz. 1669 Ustawa z dnia 3 lipca 2018 r.). W związku z tym, przedkładam Wysokiej Radzie Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr. Adama Wróblewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej. Jednocześnie, mając na uwadze wysoki potencjał poznawczy przedstawionych w pracy wyników, które zostały już opublikowane w czasopiśmie z listy JCR, jak również ich potencjał rozwojowy w dalszych pracach badawczych, wnioskuję o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK
Centrum Zapobiegania Zagrożeniom Biologicznym
Wydział Biologii i Oceny Środowiska UŁ

dr hab. Michał Bijak, prof. UŁ