



Warszawa 29.08.2022

Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń,  
Członek koresp. Polskiej Akademii Nauk  
Dyrektor Instytutu  
Kierownik Pracowni Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Miniewskiej**  
**pt. „Poszukiwanie profilu metabolitów charakterystycznego dla pobudzenia**  
**brunatnej tkanki tłuszczowej u młodych mężczyzn”**

Brunatna tkanka tłuszczowa (BAT) jest podstawowym narządem odpowiedzialnym za termogenezę u niemowląt i jej objętość wraz z wiekiem ulega stopniowej redukcji. U ludzi dorosłych resztki BAT sąsiadują z ośrodkowym układem nerwowym, a ich aktywacja związana jest ze wzrostem tempa metabolizmu. Rekrutacja BAT ma miejsce podczas aklimatyzacji do zimna i obejmuje wydzielanie adipokiny, które aktywują komórki w obrębie BAT i promują adipogenezę, angiogenezę oraz zapewniają interakcje pomiędzy komórkami odpornościowymi i neuronami. Wszystkie te procesy są ze sobą powiązane i odpowiadają za plastyczność BAT w odpowiedzi na ekspozycję na zimno. Najnowsze badania wskazują na ważną rolę BAT w regulacji metabolizmu całego organizmu, poprzez mechanizmy obejmujące wzajemne oddziaływanie pomiędzy BAT a wątrobą, mięśniami szkieletowymi i jelitem, jak również centralnym układem nerwowym. Molekularny mechanizm tych interakcji nie jest znany. Dlatego też, główny cel recenzowanej rozprawy tj. określenie zmian w profilu metabolitów osocza wywołanych aktywacją BAT poprzez ekspozycję na zimno oraz wskazanie metabolitów zmieniających się w zależności od objętości i aktywacji BAT u osób dorosłych, wydaje się być trafny i bardzo interesujący.

Praca doktorska mgr Katarzyny Miniewskiej zrealizowana została w Laboratorium Metabolomiki w Centrum Badań Klinicznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pod kierunkiem promotora dr hab. Michała Ciborowskiego. Promotorem pomocniczym jest dr Małgorzata Mojsak z Samodzielnej Pracowni Laboratorium Obrazowania Molekularnego,



Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Rozprawa ma nietypowy układ i składa się z maszynopisu (w którym opisano, ale nie zaprezentowano graficznie wyników) i dołączonych do niego dwóch publikacji, których pierwszym autorem jest doktorantka. Maszynopis, który – z zgodnie z zasadami powinien zawierać omówienie wspomnianych powyżej publikacji, ma 15 stron. Całość jest podzielona na następujące rozdziały: 1) Wykaz publikacji stanowiących rozprawę (1 strona), 2) Zestawienie publikacji doktorantki (1 strona), 3) Wykaz skrótów (1 strona), 4) Wstęp (6 stron), 5) Cel pracy (1 strona), 6) Materiały i metody (3 strony), 7) Wyniki (2 strony), 8) Wnioski (1 strona), 9 i 10) Streszczenia w języku polskim i angielskim (po 2 strony), 11) Literatura (3 strony). W maszynopisie brak rozdziału ‘Dyskusja’. Do rozprawy dołączone są dwie publikacje (praca przeglądowa: K. Miniewska, J. Godzien, P. Mojsak, K. Maliszewska, A. Kretowski, M. Ciborowski „Mass spectrometry-based determination of lipids and small molecules composing adipose tissue with a focus on brown adipose tissue” *J Pharm Biomed Anal.* 2020 Nov 30;191:113623 oraz praca oryginalna: K. Miniewska, K. Maliszewska, K. Pietrowska, J. Godzień, Ł. Łabieniec, M. Mojsak, A. Krętowski, M. Ciborowski "PET/MRI-Evaluated Activation of Brown Adipose Tissue via Cold Exposure Impacts Lipid Metabolism." *Metabolites.* 2022 May 19;12(5):456.), a także odpowiednie oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie tych prac. Obie prace są wieloautorskie, z oświadczeń współautorów wynika, że wkład doktorantki w każdą z nich to 50%.

Maszynopis, który powinien stanowić omówienie opublikowanych prac, został przygotowany bardzo lakonicznie i niezbyt starannie pod względem edytorskim. W zestawieniu publikacji doktorantki (rozdział nr 2 maszynopisu), podano w tabeli jedynie liczbę publikacji i ich sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF), brak jakichkolwiek danych bibliograficznych - nawet nie podano tytułów prac i nazw czasopism, w których zostały opublikowane. Tak przygotowane zestawienie jest niemożliwe do oceny merytorycznej. Zestawienie skrótów także jest zaskakujące, trudno zrozumieć cel wprowadzenia skrótów takich jak QC (kontrola jakości), 18-FDG, AUC, HILIC, ESI itd., które albo w ogóle nie są stosowane przez doktorantkę, albo są użyte w tekście tylko raz. Jednocześnie skróty używane w tekście, np. TSH, nie występują w zestawieniu skrótów. Standardem jest, że w dysertacji wprowadza się tylko skróty konsekwentnie używane w tekście, nie ma powodu wprowadzania skrótów tylko po to, by zacytować nazwę białka czy metody w jęz. angielskim. Skrót WAT jest rozwinięty niepoprawnie – w polskiej nomenklaturze histologicznej obowiązującą nazwą jest żółta tkanka tłuszczowa. Podobnie, nieprawidłowe jest użyte przez Doktorantkę określenie ‘pęcherzyki’ w odniesieniu do kropli lipidowych.

W rozdziale Wstęp doktorantka przedstawiła informacje dotyczące charakterystyki BAT i jej funkcji wydzielniczej oraz przedstawiła metody jakie wykorzystywane są w badaniach tej tkanki





u osób dorosłych. Tekst opisywany w tej części rozprawy zobrazowany jest 2 rycinami. Następnie, została przedstawiona definicja metabolomiki i rys historyczny metod używanych w badaniach metabolomicznych. Natomiast, w rozdziale 'Wstęp' brakuje informacji, które wprowadziłyby czytelnika w tematykę badań zaprezentowaną w dalszej części dysertacji. Duży niedosyt pozostawia rozdział 4.3 (str. 14), w którym doktorantka bardzo lakonicznie przedstawia funkcję badanych przez siebie białek: leptyny, FGF21, TNF-a, FABP4. Brakuje w tym rozdziale rzetelnie przedstawionych danych dotyczących roli tych hormonów i czynników białkowych w fizjologii i patologii człowieka. Brak wprowadzenia pozwalającego na zrozumienie, dlaczego te właśnie białka zostały wybrane do badań, w kontekście analizy BAT i ekspozycji organizmu na niskie temperatury. Jaki jest związek leptyny, FGF21, TNF-a, FABP4, z insulinoopornością, o której wspomina Doktorantka w tym rozdziale, oraz z procesem różnicowania i aktywacji adipocytów? Jaką rolę pełnią te czynniki w regulacji metabolizmu glukozy i lipidów? Wszystkie ww zagadnienia łączą się bezpośrednio z tematyką pracy, a ich przedstawienie pozwoliłoby na zrozumienie postawionej hipotezy i celów przeprowadzonych badań.

Rozdział „Cele pracy” w sposób zwięzły przedstawia cel realizowanych badań. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na pełną ich realizację. Natomiast, w rozdziale tym doktorantka niepoprawnie nazywa ‘białkami surowicy’ badane przez siebie hormony i czynniki białkowe. Mimo, że zarówno leptyna, insulina jak i TNF-a, FGF21, FABP4 są białkami, które po sekrecji znajdują się w osoczu krwi, nie zalicza się ich do ‘białek surowicy’, które są ściśle zdefiniowane. Podobnie, używane określenie ‘wychładzanie’, w kontekście ekspozycji osób badanych na niską temperaturę, nie jest zbyt fortunne.

Przedstawione w pracy badania wykonane zostały z udziałem ochotników, mężczyzn w wieku 23-32 lat, którzy byli niepalący, niecierpiący na choroby przewlekłe i nieprzyjmujący na stałe żadnych leków. W rozdziale ‘Materiały i metody’ Doktorantka podaje, że badaniem objęto 37 osób. Jednocześnie wskazuje, że analizy LC-MS przeprowadzono na próbach pobranych od 22 osób, a pozostałe analizy były prowadzone na grupie 25 osób. Ten brak konsekwencji w podawanej liczbie osób badanych jest niezrozumiały – bardzo proszę o wyjaśnienie tej kwestii w czasie obrony. Podobnie jak pozostałe rozdziały w przedstawionym do oceny maszynopisie, tak i rozdział „Materiały i metody’ jest napisany bardzo lakonicznie, brak jest jakichkolwiek szczegółów dotyczących zastosowanej w dysertacji metodyki, nie podano nawet nazw zastosowanych technik analitycznych, brak informacji o metodzie ekspozycji osób badanych na zimno (jak niska była temperatura?), nie ma nic na temat sposobu przygotowania prób do analiz metabolomicznych czy analiz stężenia badanych hormonów i innych białek. W każdym z podrozdziałów doktorantka odsyła

czytelnika do publikacji Miniewska et al. *Metabolites*. 2022 May 19;12(5):456. Nie jest to prawidłowe, ponieważ publikacja rządzi się swoimi prawami – zawarty tam opis procedur metodycznych jest skrótowy, w publikacji jest 8 autorów, nie wiadomo, które części pracy zostały wykonane przez Doktorantkę. Założeniem pracy doktorskiej jest dokładne opisanie, z najdrobniejszymi szczegółami, procedur eksperymentalnych, wykonanych przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora. Do obowiązków recenzenta należy dokonanie merytorycznej oceny zastosowanych procedur metodycznych. Przy tak przygotowanym opisie, taka ocena jest niemożliwa.

Jak wspomniano, wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań zostały opublikowane w jednej publikacji. Praca ta zawiera 6 rycin i 3 tabele prezentujące rezultaty. Dodatkowo, w pracy przeglądowej stanowiącej część rozprawy doktorskiej, przedstawiono statystyczną analizę metabolomu BAT opracowaną w oparciu o wyniki prac opublikowanych przez innych autorów. W maszynopisie opisującym pracę doktorską, Doktorantka nie wspomniana nic na temat przyjętej tam metodyki ani źródła wykorzystanych baz danych. Nie wspomina też o tym, co nowego wniosło takie podejście metodyczne. Również w rozdziale ‘Wyniki’ Doktorantka nie odnosi się do tego opracowania. Trudno zatem ocenić, czy jest to Jej praca, która powinna być brana pod uwagę przy nadawaniu stopnia doktora. Podobnie, mimo, że manuskrypt rozprawy zawiera rozdział ‘Wyniki’, zostały one tu przedstawione bardzo skrótowo, bez wykresów i tabel. Doktorantka przy opisywaniu wyników odsyła czytelnika do publikacji Miniewska et al. *Metabolites*. 2022 May 19;12(5):456 – publikacji, w powstaniu której Doktorantka ma 50% udziału, a zatem trudno ocenić, które wyniki stanowią własność intelektualną Doktorantki i mogą być podstawą nadania Jej stopnia naukowego. W moim przekonaniu napisanie przez Doktorantkę pełnej rozprawy doktorskiej opisującej uzyskane przez Nią wyniki oraz ich przedyskutowanie rozwiałoby wszelkie wątpliwości. Powód, dla którego Doktorantka tego nie zrobiła jest niejasny, tym bardziej, że badania opisane w ww publikacji są interesujące. Do najciekawszych wyników należy wykazanie, że: 1) u osób, u których stwierdzono aktywację BAT w odpowiedzi na ekspozycję na zimno, dochodzi do wzrostu stężenia fosfolipidów i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w osoczu krwi, natomiast zmniejsza się stężenie sfingolipidów; zmianom tym towarzyszy obniżenie stężenia FABP4; 2) ekspozycja na zimno zmniejsza stężenie insuliny i leptyny w osoczu, jednocześnie nie wpływając na stężenia FGF21 i TNF-a.

Krótkie podsumowanie wyników zostało przedstawione w rozdziale „Wnioski”. W rozdziale „Piśmiennictwo” zacytowano 37 prac. Jak wspomniałam wcześniej, maszynopis nie zawiera rozdziału „Dyskusja”, co powoduje, że trudno ocenić na ile Doktorantka potrafi odnieść uzyskane wyniki do aktualnego stanu wiedzy.





Po wnikliwym przestudiowaniu przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej i zapoznaniu się z dyskusją w publikacji stanowiącej część rozprawy, mam kilka uwag i pytań, o wyjaśnienie których proszę podczas obrony:

1. Spośród lipidowych metabolitów, największe zmiany w grupie BAT+ zaobserwowano dla kwasów 16:0, 16:1, 18:0, 18:1 oraz PUFA – co może być tego przyczyną? Jakie szlaki metaboliczne są regulowane przez ww kwasy tłuszczowe? Czy znany jest mechanizm molekularny plastyczności tkanki tłuszczowej i aktywacji BAT w odpowiedzi na ekspozycję na zimno?
2. W jakich tkankach ulega ekspresji FABP4 i jakie komórki są głównym źródłem FABP4 obecnego w osoczu? W jaki sposób może dojść do obniżenia stężenia FABP4 w osoczu pod wpływem ekspozycji na zimno? Czym różni się FABP4 od innych izoform tego białka?
3. W jaki sposób mierzona była aktywność insuliny? Jeśli faktycznie szlak insulinowy jest aktywowany w wyniku ekspozycji na zimno, jaki jest mechanizm prowadzący do tej aktywacji? Jakie adipokiny wydzielane przez BAT regulują aktywność szlaku insulinowego? Czy aktywacja ta może być tkankowo-specyficzna?
4. W grupie BAT+ stwierdzono obniżone stężenie insuliny i leptyny w osoczu w odpowiedzi na ekspozycję na niską temperaturę. Jakie są mechanizmy regulujące sekrecję każdego z tych hormonów? Czy mogą być one zależne od aktywacji BAT?
5. Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe o nieparzystej liczbie węgli wykorzystywane są jako standardy wewnętrzne w analizach metabolomicznych. W obecnej pracy stwierdzono obecność takich kwasów w osoczu badanych pacjentów. Jak może być ich pochodzenie? Jak można wyjaśnić fakt, że jednym z kwasów tłuszczowych, których stężenie istotnie wzrosło po ekspozycji na zimno w grupie BAT+ jest kwas 17:0?
6. Do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów odnośnie ich wkładu w powstanie dołączonych publikacji. Nie określono jednak, które konkretnie wyniki opisane w rozprawie zostały uzyskane przez Doktorantkę. Proszę o wyraźne wskazanie wyników badań uzyskanych wyłącznie przez Doktorantkę, które są nowatorskie i mają znamiona odkrycia naukowego, a zatem mogą być podstawą nadania Jej stopnia doktora.

## **Wniosek końcowy**

Wyniki badań, które są przedstawione jako podstawa pracy doktorskiej mgr Katarzyny Miniewskiej pt. „Poszukiwanie profilu metabolitów charakterystycznego dla pobudzenia brunatnej tkanki tłuszczowej u młodych mężczyzn” zostały opublikowane w jednej publikacji oryginalnej i jednej publikacji przeglądowej, w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Są to wyniki oryginalnych badań i stanowią wkład w poznanie metabolizmu BAT. Wątpliwość wzbudza fakt, że obie przedłożone publikacje są wieloautorskie, a będący częścią rozprawy doktorskiej maszynopis, który powinien opisywać przeprowadzone przez Doktorantkę badania, jest na tyle lakoniczny i niepełny, że nie pozwala ocenić jaki jest Jej realny wkład. Podsumowując stwierdzam, że jeśli mgr Katarzyna Miniewska ma prawo do własności intelektualnej wyników zawartych w załączonych publikacjach, oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z późn. zm.) oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.). Zwracam się zatem do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Katarzyny Miniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, licząc, że w czasie obrony Doktorantka rozwieje wszelkie wątpliwości wyrażone w niniejszej recenzji.