Warszawa, 17.06.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Józef Langfort,

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Kamili Roszczyc-Owsiejczuk pt.: „Wpływ wyciszenia *in vivo* ekspresji genu syntetazy długołańcuchowych acyl0-CoA (ACSL1) na zwartość aktywnych biologicznie lipidów i insulinowrażliwości mięśni szkieletowych myszy karmionych dietą bogatotłuszczową"

Otyłość (obesitas) jest przewlekłą chorobą metaboliczną, na którą według danych Światowej Organizacji Zdrowia choruje coraz więcej ludzi, w tym dzieci. Obecnie wiadomo, że otyłość może być indukowana przez czynniki środowiskowe (styl życia), genetyczne, zaburzenia emocjonalne lub /i hormonalne a także przez farmakoterapię (niektóre leki). Jak udokumentowano w piśmiennictwie, największy udział w indukowaniu tej choroby mają czynniki genetyczne i środowiskowe. Pośród czynników środowiskowych, największe znaczenie w indukcji otyłości przypisuje się diecie o dużej zawartości tłuszczów lub/i węglowodanów. Co więcej, nieleczona otyłość prowadzi do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, takich jak: nadciśnienie tętnicze, niewydolność serca, choroba niedokrwienna serca, zatorowość płucna, czy udar mózgu. Co istotne, otyłość w większości przypadków skojarzona jest z upośledzoną tolerancją węglowodanów, insulinoopornością, stanem przedcukrzycowym, czy cukrzycą typu 2. Każdemu z tych przypadków towarzyszą zaburzenia lipidowe. Ponadto badania z ostatnich lat wskazują, że w związku z poprawą jakości leczenia powyższych chorób, a co za tym idzie wzrostem długości życia obciążonych nimi pacjentów, należy się spodziewać wzrostu częstości występowania chorób charakterystycznych dla wieku podeszłego, w tym chorób neurodegeneracyjnych. Na skutek kumulacji lipidów w komórkach, zmiany patologiczne skojarzone z otyłością dotyczą wielu tkanek. Szczególnie znaczącą rolę związaną z insulinoopornością organizmu przypisuje się tkance mięśniowej. Tkanka ta stanowi około 40% masy ciała, a także może znacznie zmieniać swój metabolizm wraz ze zmianą aktywności skurczowej, tzn. aktywności fizycznej organizmu. W ostatnich dekadach badania dotyczące mechanizmu insulinooporności mięśni szkieletowych skupiają się nad mechanizmami wewnątrzkomórkowymi, które są ciągle nie do końca rozpoznane. Doktorantka wpisując się w obszar badań nad tym zagadnieniem

rozszerzyła je o zbadanie udziału aktywnych biologicznie lipidów w indukcji insulinooporności komórek mięśniowych oraz wpływu na ten proces lokalnego wyciszenia genu *ACSL1* u myszy karmionych dietą bogatotłuszczową. Są to badania oryginalne, podstawowe i przedkliniczne, które zostały przeprowadzone z wykorzystaniem modelu zwierzęcego – myszy szczepu C57BL/6J.

Manuskrypt liczy 110 stron, w którym Autorka przedstawiła wyniki swoich badań wykonanych w ramach realizacji projektu TEAM/2016-1/2 finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej. Praca ma klasyczny układ dla tego typu opracowań i podzielona jest na następujące rozdziały: 1) Wykaz rycin i tabel, 2) Wykaz skrótów, 3) Wstęp (15 stron), 4) Założenia i cel pracy (2 strony), 5) Materiały i Metody (15 stron), 6) Wyniki (18 stron), 7) Dyskusja (18 stron), 8) Wnioski (4 strony), 9-10) Streszczenie (wersja polskojęzyczna – 2 strony, wersja angielskojęzyczna – 3 strony), 11) Uchwała komisji etycznej, 12) Piśmiennictwo (11 stron, 151 pozycji). Praca zawiera 13 rycin i 8 tabel.

We Wstępie Autorka w logicznym wywodzie przedstawia: 1) epidemiologię i patogenezę otyłości, 2) rolę mięśni szkieletowych w zjawisku insulinooporności, metabolizmie glukozy i kwasów tłuszczowych, 3) insulinooporność mięśni z omówieniem szlaku sygnałowego insuliny, 4) rolę biologicznie aktywnych lipidów w indukowaniu insulinooporności mięśni szkieletowych, ze szczególnym uwzględnieniem roli enzymu ACSL1 w metabolizmie lipidów mięśni szkieletowych - diacyloglicerolі oraz ceramidów. Nieliczne badania z ostatnich lat wskazują, że w/w związki mogą znacząco współuczestniczyć w indukcji insulinooporności mięśni oraz innych tkanek insulinowrażliwych .

Reasumując, Autorka we Wstępie zapoznaje czytelnika z stanem wiedzy na temat epidemiologii i patogenezy otyłości i roli mięśni w insulinooporności, roli biologicznie aktywnych lipidów (diacyloglicerolі i ceramidów) oraz udziału enzymu ACSL1 w indukcji insulinooporności w mięśniach szkieletowych. Autorka omawia wspominane wyżej zagadnienia w oparciu o aktualną wiedzę biochemiczną i molekularną. Z obszernej literatury światowej Autorka właściwie wyselekcjonowała 110 poz. związanych z przedmiotem badań, opierając się na piśmiennictwie angielskojęzycznym, głównie z ostatnich lat (2000-2020). Część teoretyczna jest doskonałym uzasadnieniem dla podjętych celów badań. Ta część pracy także świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Kandydatki do podjętych badań.

Autorka po krótkim uzasadnieniu formułuje główny cel badań, którym było zbadanie wpływu lokalnego wyciszenia ekspresji genu ACSL1 na wewnątrzmięśniową akumulację

aktywnych biologicznie lipidów oraz insulinooporność komórek mięśniowych u myszy karmionych dietą bogatotłuszczową.

Cel główny Autorka realizowała w oparciu o 4 szczegółowe cele pracy, którymi było zbadanie: 1) wpływu karmienia dietą bogatotłuszczową (HFD) myszy szczepu C57BL/6J na ogólnoustrojowe parametry insulinooporności (doustny test obciążenia glukozą, test tolerancji insuliny), 2) wpływu lokalnego wyciszenia genu ACSL1 na ekspresję białek transporterów kwasów tłuszczowych, mitochondrialnego białka CPT1B oraz zawartość krótko- i długołańcuchowych acylo-CoA oraz acylo-karnityny, 3) wpływu lokalnego wyciszenia ACSL1 na zawartość ceramidów i diacyloglicerolі w mięśniach szkieletowych myszy karmionych dietą bogatotłuszczową, oraz 4) wpływu wyciszenia ACSL1 na szlak sygnalizacyjny insuliny w tym aktywację kaskady fosforylacji białek szlaku insulinowego i insulinozależnego wychwytu glukozy w mięśniach szkieletowych myszy karmionych dietą bogatotłuszczową.

Autorka chcąc uzyskać odpowiedź na postawiony cel badań wykorzystała samce myszy C57BL/6J w wieku 6 tygodni pozyskane z Jakson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) i przetrzymywane w indywidualnie wentylowanych klatach w temperaturze 21±2°C w 12-godzinnym cyklu dobowym. Po aklimatyzacji, zwierzęta podzielono losowo na dwie grupy: kontrolną i karmioną dietą bogatotłuszczową (70% węglowodanów, 20%białka i 10% tłuszczy) przez okres 8 tygodni. Grupie kontrolnej podano do obydwu mięśni brzuchatych łydki tylnych łap niewyciszający plazmid shRNA, natomiast grupie badanej karmionej dietą bogatotłuszczową podano do jednej łydki plazmid shRNA wyciszający gen kodujący ACSL1 a do drugiej łydki plazmid niewyciszający. Po całej procedurze wyciszenia przeprowadzono wizualizację fluorescencji białka reporterowego TurboGFP (Green Fluorescent Protein) w tkankach poddanych procesowi elektroporacji przy użyciu źródła światła 480nm i adaptera fluorescencyjnego Nightsea SFA-RB-Go. Wizualizację wykonano w celu kontroli procesu wyciszania i morfologii mięśni łydek. Oznaczano poziom ekspresji genów ACSL1 i GAPDH metodą Real-Time PCR oraz poziom wybranych białek metodą Western blot. Taka procedura pozwoliła na zweryfikowanie skuteczności wykonanego zabiegu wyciszenia ACSL1.

Insulinooporność ogólnoustrojową sprawdzano poprzez wykonanie dootrzewnowego testu obciążenia glukozą u badanych myszy oraz badaniem stężenia insuliny i glukozy we krwi i określeniem wskaźnika HOMA-IR. Ponadto oznaczono wychwyt glukozy stymulowany insuliną, poziom FFA w osoczu oraz poziom acylo-CoA, acylo-karnityn, diacyloglicerolі, sfingolipidów i triacyloglicerolі w tkance mięśniowej.

Zastosowanie w badaniach zwierząt z modyfikacją genową ACSL1 poprzez wyciszenie tego genu oporności i bez modyfikacji (dzikich) oraz wywołanie u tych zwierząt otyłości poprzez karmienie dietą wysokotłuszczową pozwoliło określić rolę ACSL1 w akumulacji lipidów i insulinooporności komórek mięśniowych. Jednocześnie pozwoliło także na zbadanie wpływu wyciszenia ACSL1 na zmiany w szlaku sygnalizacyjnym insuliny i insulinozależnym wychwycie glukozy w mięśniach szkieletowych myszy karmionych dietą bogato tłuszczową. Ten elegancko pod względem metodologicznym zaprojektowany eksperyment pozwolił Doktorantce na określenie wzajemnej zależności pomiędzy insuliną, lipidami oraz glukozą i uzyskanie odpowiedzi na postawione cele badawcze.

W pracy zastosowano szereg nowoczesnych, charakteryzujących się dużą dokładnością metod, co implikuje dużą wiarygodność uzyskanych wyników, np. Western blot w celu określenia poziomu licznych białek, immunochemicznych ELISA w celu oznaczenia stężenia insuliny, spektrometrii mas z wysokociśnieniową chromatografią cieczową do oznaczenia stężeń acylo-CoA, acylo-karnityny, diacyloglicerolі i sfingolipidów, metod spektrofotometrycznych do oznaczenia stężenia TAG w tkance mięśniowej myszy karmionych dietą wysokotłuszczową i kontrolnych. Każda procedura stosowana przez Doktorantkę jest bardzo precyzyjnie opisana i może być wykorzystana przez innych badaczy. Analiza statystyczna wyników nie budzi zastrzeżeń. Autorka uzyskała zgodę Lokalnej komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Olsztynie.

Doktorantka w pierwszej kolejności opisuje wpływ diety wysokotłuszczowej na przyrost masy ciała, stężenie glukozy w osoczu i wrażliwość na insulinę oraz zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu myszy C57BL/6J. Otrzymane wyniki wskazują, że 8 tygodniowa dieta wysokowęglowodanowa wywołała otyłość u myszy. Następnie lokalne wyciszenie genu ASCL1 pozwoliło wykazać rolę ASCL1 na szlaki sygnalizacyjne prowadzące do insulinooporności. Doktorantka swoje wyniki omawia kolejno zgodnie z postawionymi celami szczegółowymi. Otrzymane wyniki zostały opisane zrozumiale i także przedstawione w formie rycin i tabel. Czytelnik otrzymuje jasny obraz poszczególnych fragmentów badań ze względu na ich podział na podrozdziały.

Uzyskane wyniki Autorka skomentowała w oparciu o najnowszą literaturę naukową z okresu 2010-2021 opublikowaną w anglojęzycznym piśmiennictwie światowym. Podkreślić chciałbym fakt umieszczenia w spisie cytowanych publikacji 151 pozycji. Autorka otrzymane wyniki dyskutuje z danymi literaturowymi zgodnie z postawionymi celami szczegółowymi.

Autorka rozpoczyna dyskusję uzasadnieniem dlaczego w swoich badaniach skupia się na badaniu roli lipidów w zaburzeniach metabolicznych, koncentrując się na ich

występowaniu w otyłości. Omawia rolę ASCL1 w otyłości i mechanizmie insulinooporności, konfrontując swoje wyniki z relatywnie niewielką liczą wyników opisanych przez innych badaczy. Należy podkreślić, że przeprowadzone przez Autorkę badania są badaniami nowatorskimi. Kończy dyskusję ogólnym podsumowaniem uzyskanych wyników formułując 5 wniosków.

Do najważniejszych wniosków wynikających z podjętych badań zaliczyłbym, że: 1) spożywanie diety bogatotłuszczowej indukuje powstawanie insulinooporności na poziomie ogólnoustrojowym i mięśniowym, któremu towarzyszy podwyższenie stężenia kwasów tłuszczowych w osoczu i akumulacja lipidów w tkance mięśniowej oraz spadek aktywacji szlaku insulinowego i zmniejszony wychwyt glukozy, 2) wyciszenie zahamowało akumulacje lipidów w komórkach mięśniowych oraz zwiększyło insulinowrażliwość tkanki mięśniowej co świadczy o istotnej roli ASCL1 w szlaku insulinowrażliwości. Uzyskane wyniki sugerują , że modulacja ekspresji/aktywności ACSL1 w mięśniach szkieletowych może być potencjalnym celem w leczeniu insulinooporności w warunkach otyłości wywołanej nadmiernym spożyciem diety bogatej w tłuszcze.

Ten rozdział jest dobrze opracowany i świadczy o właściwej interpretacji uzyskanych wyników przez Doktorantkę.

Prosiłbym także o skomentowanie przez Doktorantkę podczas obrony następujących kwestii: czy zmiany obserwowane w badanym mięśniu zależą od składu typów włókien mięśniowych oraz czy na obserwowane zmiany po wyciszeniu badanego genu mogła mieć wpływ interakcja metaboliczna tkanka tłuszczowa – mięsień szkieletowy.

Uwagi końcowe i konkluzja

Uważam, że rozprawa doktorska w pełni spełnia wymagania merytoryczne jakie stawia się tego typu opracowaniom i spełnia warunki 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. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Ta pozytywna opinia opiera się na następujących faktach:

1) tematyka badań wpisuje się w światowe trendy badań na wyjaśnieniem udziału wewnątrzmięśniowych szlaków sygnalizacyjnych w patogenezie otyłości,
2) są to nowatorskie badania przedkliniczne, które stanowią przesłankę do ich klinicznej weryfikacji,
3) w badaniach zastosowano metody laboratoryjne cechujące się bardzo dużą dokładnością, co niewątpliwie silnie uwiarygadnia uzyskane wyniki badań,

4) wnioski z badań jasno weryfikują założoną hipotezę,
5) uzyskane wyniki wnoszą nowe dane, szczególnie dotyczące udziału ASCSL1 i ceramidów w patogenezie otyłości, oraz co może mniej istotne,
6) niezwykle starannego opracowania manuskryptu.

Dlatego wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, o dopuszczenie mgr Kamili Roszczyc-Owsiejczuk do dalszych etapów postepowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ponadto, wyżej przedstawione argumenty pozwalają mi także wnioskować wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.