WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY

RPW/11704/2022
Data:2022-06-20
UMB

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII OGÓLNEJ I PARAZYTOLOGII

Warszawa, 13. 06. 2022

Ocena rozprawy doktorskiej Pani Kamili Roszczyc-Owsiejczuk

Zatytułowanej

Wpływ wyciszenia *in vivo* ekspresji genu syntetazy długołańcuchowych acylo-CoA (*ACSL1*) na zawartość aktywnych biologicznie lipidów i insulinowrażliwośść mięśni szkieletowych myszy karmionych dietą bogatotłuszczową

wykonanej pod kierunkiem Dr hab. n. med. Piotra Zabielskiego w Zakładzie Biologii Medycznej, Wydziału Lekarskiego z Odziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

UWAGI WSTĘPNE

Jedną z przyczyn zaburzenia homeostazy glukozy jest insulinooporność polegająca na obniżeniu wrażliwości komórek i narządów docelowych na fizjologiczne stężenie insuliny w surowicy krwi. Insulinooporność może także skutkować hiperinsulinemią. Główną przyczyną insulinooporności jest zaburzenie wskutek mutacji transmisji sygnału wewnątrzkomórkowego indukowanego insuliną. Ze względu na miejsce mutacji, insulinooporność może mieć charakter przedreceptorowy, receptorowy i postreceptorowy. Skutkiem insulinooporności mogą być choroby układu sercowo-naczyniowego, zespół jajników policystycznych (PCOS), cukrzyca typu 2, zespół

ul. Chałubińskiego 5
02-004 Warszawa
www.wum.edu.pl

tel.: +48 22 621 26 07
biologia@wum.edu.pl

metaboliczny oraz wiele innych chorób. Insulinooporność jest także stwierdzana w chorobie Alzheimera.

Wykazano istotną korelację między insulinoopornością i otyłością. Jest to szczególnie niebezpieczne powiązanie, gdyż szacuje się, że około 60% światowej populacji może mieć nadwagę lub otyłość, w tym także otyłość olbrzymią (BMI > 40 kg/m^2). Nadwaga lub otyłość może mieć różne podłoże. Może być np. skutkiem zaburzeń hormonalnych lub niektórych chorób oraz zespołów. Także czynniki genetyczne stanowią istotne ryzyko wystąpienia otyłości. Należy jednak pamiętać, że dieta bogata w tłuszcze zwierzęce i węglowodany, uboga w pokarm roślinny oraz siedzący tryb życia także sprzyjają rozwojowi otyłości. Tę sytuację obserwuje się szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych. Nadmierne spożywanie produktów zawierających dużą ilość wolnych kwasów tłuszczowych powoduje akumulację aktywnych biologicznie lipidów, co może prowadzić do insulinooporności.

Wobec powyższego, istotne są badania wpływu nagromadzenia aktywnych biologicznie lipidów na rozwój insulinooporności, jak również znalezienie potencjalnych mechanizmów pozwalających „zamienić" insulinooporność na insulinowrażliwość.

Przedstawiona praca doktorska powstała dzięki współudziale w projekcie TEAM/2016-1/2 finansowanym przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej pt. „Elucidation of the role of individual intramuscular lipid intermediates in fat-induced insulin resistance" (Kierownik projektu Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Błachnio-Zabielska).

OCENA FORMALNA

Oceniana rozprawa doktorska ma typowy układ dla oryginalnych prac badawczych. Praca liczy łącznie 110 stron i została podzielona na 12 rozdziałów, takich jak Wstęp, Materiały i Metody, Cele, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenia oraz Bibliografia.

WSTĘP

We wstępie, liczącym 16 stron, Doktorantka przedstawiła w syntetyczny sposób informacje dotyczące roli otyłości w insulinooporności, rolę mięśni w insulinooporności, zaburzenia wewnątrzkomórkowej ścieżki sygnałowej insuliny oraz roli biologicznie aktywnych lipidów w insulinooporności. Należy podkreślić, że Doktorantka przedstawiła te zagadnienia w bardzo przejrzysty sposób.

ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Cele pracy zostały przez Doktorantkę przedstawione w sposób zwięzły i jednoznaczny. Chodziło o zbadanie wpływu lokalnego wyciszenia ekspresji genu *ACSL1* na wewnątrzmięśniową akumulację aktywnych biologicznie lipidów oraz insulinowrażliwość komórek mięśniowych myszy karmionych dietą bogatotłuszczową. Aby osiągnąć zaplanowany cel badań, Doktorantka przeprowadziła wyciszenie ekspresji *in vivo* genu kodującego syntetazę długołańcuchowych acylo-CoA (*ACSL1*) w mięśniach szkieletowych za pomocą plazmidu shRNA. W ten sposób Doktorantka zbadała wpływ wyciszenia w/w genu na akumulację biologicznie aktywnych lipidów oraz transmisję sygnału wewnątrzkomórkowego indukowanego insuliną w mięśniu brzuchatym łydki myszy, u których indukowano insulinooporność dietą bogatotłuszczową.

Cel pracy, jaki postawiła Doktorantka w swojej pracy jest bardzo istotny. Wyniki badań uzyskane przez wielu autorów wskazują jednoznacznie na związek między akumulacją aktywnych biologicznie lipidów oraz insulinoopornością. Niestety, w dalszym ciągu nie ma jednoznacznej odpowiedzi, które aktywne biologicznie lipidy odpowiadają za rozwój insulinooporności mięśniowej. Nie do końca są także poznane mechanizmy warunkujące tę patologię. Z tego powodu, omawiana praca stanowi cenny wkład w poznanie tych procesów.

MATERIAŁY I METODY

Na przeprowadzenie badań Doktorantka uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (Nr zgody 35/2016). Eksperymenty przeprowadzono na 16 samcach myszy szczepu wsobnego C57BL/6J, który jest często wykorzystywany w badaniach nad insulinoopornością indukowaną dietą

wysokotłuszczową. Grupę kontrolną stanowiło 8 myszy karmionych dietą standardową (LFD), a grupę badaną stanowiło 8 myszy karmioną dietą wysokotłuszczową (HFD). W grupie kontrolnej do obu mięśni brzuchatych łydki tylnych łap podawano niewyciszające plazmidy zawierające niekodujący shRNA. W grupie badanej do mięśnia brzuchatego łydki jednej łapy podawano mieszaninę 3 plazmidów kodujących specyficzne shRNA, natomiast analogiczny mięsień drugiej łapy był transfekowany niewyciszającym, niekodującym shRNA.

W dalszej części rozdziału Doktorantka szczegółowo, a jednocześnie w sposób bardzo przystępny, przedstawiła metodykę dotyczącą m.in. doustnego testu obciążenia glukozą (OGTT), testu tolerancji insuliny, stężenia insuliny i glukozy w osoczu, HOMA-IR, wychwytu glukozy stymulowanego insuliną, pomiaru zawartości poszczególnych lipidów itp.

Metody badawcze zostały przedstawione przez doktorantkę w sposób wskazujący na bardzo dobrą znajomość i opanowanie wykorzystywanych technik badawczych. Zastosowane techniki badawcze zostały dobrane przez Doktorantkę w sposób właściwy i adekwatny do zaplanowanych badan. Zastosowane metody badawcze zostały przedstawione przez Doktorantkę w sposób bardzo przystępny a zamieszczone schematy w znacznym stopniu ułatwiają zrozumienie dość trudnych i skomplikowanych procedur. Także zastosowane przez Doktorantkę metody statystyczne pozwalają na rzetelną analizę uzyskanych wyników.

WYNIKI

Uzyskane wyniki zostały przedstawione w postaci 6 rycin i 8 tabel w sposób bardzo zwięzły i przejrzysty. Czytelnik nie ma żadnych problemów ze zrozumieniem uzyskanych wyników.

DYSKUSJA

W dyskusji Doktorantka przedstawiła dokładnie analizę uzyskanych wyników w oparciu o aktualną literaturę, która stanowi 151 pozycji. Doktorantka wykazała się

doskonałą znajomością i umiejętnością wykorzystania piśmiennictwa światowego. Praktycznie każdy wynik uzyskany przez Doktorantkę jest konfrontowany z danymi uzyskanymi przez innych autorów. Należy także podkreślić wysoki poziom merytoryczny dyskusji.

WNIOSKI

Przedstawione zostały w postaci 5 punktów w sposób przejrzysty, zwięzły i jednoznaczny, opartych na uzyskanych wynikach i dyskusji.

UWAGI I KOMENTARZE

Z obowiązku recenzenta chciałbym przedstawić kilka uwag. Głównie mają one charakter techniczny i edytorski. Natomiast nie obniżają wysokiej oceny merytorycznej przedstawione rozprawy doktorskiej.

1) Ponieważ na początku jest zamieszczony wykaz stosowanych skrótów, nie ma potrzeby ponownie wyjaśniać ich znaczenia w tekście.

2) Strona 18. Za transport glukozy do mięśni odpowiedzialny jest nie tylko GLUT4. Jest to rzeczywiście najważniejszy transporter, ale oprócz tego glukotransportera, rolę tę w komórkach mięśniowych spełniają także inne, jak np. GLUT1, GLUT3, GLUT8, GLUT10, GLUT11, jak również niektóre transportery z rodziny SGLT. Może warto napisać, że rolę tę spełnia w mięśniach GŁÓWNIE GLUT4.

Zdanie „Około 90% glukozy WCHODZĄCEJ do glikolizy…." Jest niezbyt poprawne.

3) Strona 20. Zdanie „…. Powodując autofosforylację podjednostki β receptora NA PODSTAWIE wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej" jest niezbyt poprawne.

4) Badania zostały wykonane na myszach, natomiast nazwy genów i białek zostały zapisane według zasad obowiązujących dla człowieka. Ponieważ zasada zapisu genów i białek u ludzi i zwierząt nie jest zbyt przestrzegana w publikacjach, decyzję, czy zmieniać zapis, czy pozostawić w tej formie jaka jest w pracy, pozostawiam do decyzji Doktorantki i Promotora.

5) Strona 30, Rycina 4. Może warto podać źródło tego schematu?

6) Strona 34. Zdanie „.... Podczas gdy PRZECIWNY mięsień tylnej kończyny..." jest niejasne. PRZECIWNY można także rozumieć jako antagonistyczny.

7) Strona 34. 5.1.2. Może warto napisać 2, 3 zdania, dlaczego myszom kontrolnym podawano tylko niewyciszające plazmidy, a nie podano także wyciszających. Dla niektórych czytelników może to być niezrozumiałe.

8) Strony 64, 69, 71. Jak należy rozumieć uwagę Doktorantki, że „Obserwowana masa cząsteczkowa wskazanych białek jest inna niż teoretyczna, jak podaje producent przeciwciała".

9) Literatura. W niektórych pozycjach podawano pełne nazwy czasopisma, w innych skróty. Warto przyjąć jedną formę.

10) Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów interpunkcyjnych (np. „W skrócie przygotowano świeżą mieszaninę..." – brak przecinka) oraz tzw. literówek.

UWAGI KOŃCOWE

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani Kamili Roszczyc-Owsiejczuk pt.: „Wpływ wyciszenia *in vivo* ekspresji genu syntetazy długołańcuchowych acylo-CoA (*ACSL1*) na zawartość aktywnych biologicznie lipidów i insulinowrażliwośść mięśni szkieletowych myszy karmionych dietą bogatotłuszczową" spełnia wymagania wyszczególnione w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i może być skierowana do publicznej obrony.

Pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani Kamili Roszczyc-Owsiejczuk stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, jest wartościowa pod względem naukowym, poprawna pod względem metodycznym oraz dostarcza nowych danych na temat wpływu wyciszenia ekspresji genu *ACSL1* na akumulację w mięśniach aktywnych biologicznie lipidów oraz insulinowrażliwość komórek mięśniowych myszy karmionych dietą bogatotłuszczową. Uzyskane wyniki w znacznym stopniu pozwalają na poznanie mechanizmów insulinooporności u ludzi.

Dlatego wnoszę do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani Kamili Roszczyc-Owsiejczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę znaczenie uzyskanych wyników, które mogą stanowić podstawę dalszych badań w terapii insulinooporności u ludzi, zastosowanie bardzo skomplikowanych, a jednocześnie adekwatnych do celu badań, technik badawczych, ogromną wiedzę na temat prowadzonych badań, zgłaszam wniosek o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Katedra i Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii

Prof. dr hab. n. med. Leszek Szablewski