

Zakład Profilaktyki Chorób
Sercowo-Naczyniowych

Katedra Profilaktyki
Chorób Metabolicznych

Wydział Nauk o Zdrowiu
w Bytomiu

41-902, Bytom
ul. Piekarska 18
<https://choroby.metaboliczne.sum.edu.pl>

KIEROWNIK
dr hab. n. med. Bartosz Hudzik, prof. SUM
bhudzik@sum.edu.pl

tel.: (+48 32) 39-76-541
tel.: (+48 32) 39-76-550

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 39-76-537
e-mail: choroby.metaboliczne@sum.edu.pl



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Mauro Galli

zatytułowanej:

Impact of the expression modulation of Aquaporin 9 on proteomic profile and oxidative stress homeostasis in HepG2 model of hepatic lipid overload

UWAGI WSTĘPNE

Przedstawiona praca doktorska pt. „Impact Of the expression modulation of Aquaporin 9 on proteomic profile and oxidative stress homeostasis in HepG2 model of hepatic lipid overload” została przygotowana przez mgr Mauro Galli pod opieką naukową dr. hab. Piotra Zabielskiego z Zakładu Biologii Medycznej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

W chwili obecnej otyłość stanowi globalny problem dla zdrowia publicznego. Obserwuje się zwiększającą zapadalność w większości społeczeństw świata zachodniego oraz w krajach rozwijających się. Jeżeli taki trend się utrzyma, to do 2025 r. otyłość będzie występować u 18% mężczyzn i 21% kobiet. Liczne badania udowodniły, że otyłość (w zależności od stopnia nasilenia, czasu trwania, rozmieszczenia tkanki tłuszczowej) może przyczyniać się do rozwoju lub nasilać przebieg różnych schorzeń, w tym cukrzycy typu 2., nadciśnienia tętniczego, zaburzeń gospodarki lipidowej, schorzeń sercowo-naczyniowych, NAFLD, zaburzeń w układzie rozrodczym, zaburzeń w układzie oddechowym, zaburzeń psychicznych, a nawet może zwiększać ryzyko rozwoju niektórych nowotworów.

Liczne prace naukowe pozwalają nam zrozumieć istotną rolę tkanki tłuszczowej w modyfikowaniu procesów patofizjologicznych otyłości i schorzeń współistniejących. Dowody naukowe wskazują, że tkanka tłuszczowa (szczególnie trzewna) nie jest tylko magazynem energii, jest także istotnym narządem wewnątrzwydzielniczym, który wydziela wiele aktywnych biologicznie substancji zwanych adipocytokinami. Duże stężenie adipocytokin

prowadzi do przewlekłego stanu zapalnego o niewielkim natężeniu z nasilonymi reakcjami stresu oksydacyjnego. Wszystkie te elementy prowadzą do rozwoju powikłań związanych z otyłością.

Rolą akwaporyn w metabolizmie gliceroli polega przede wszystkim na ułatwianiu uwalnianiu gliceroli z tkanki tłuszczowej. Dlatego też te kanały przez błonowe odgrywają istotną rolę w zachowaniu homeostazy w gospodarce lipidowej. Przypuszcza się, że ich dysfunkcja może być związana z kilkoma zaburzeniami metabolicznymi, takimi jak insulinooporność, cukrzyca, otyłość. Praca doktorska mgr. Galli poświęcona jest stworzeniu nowego algorytmu związanego z proteomiką w celu analizy komórek HepG2 i hepatocytów w aspekcie przeładowania lipidami i insulinooporności. W swojej pracy Doktorant porusza kilka aspektów wpływu Akwaporyny 9 (AQP9) w modulowaniu proteomu komórek HepG2, a także wpływu ekspresji AQP9 na homeostazę oksydacyjną w modelu przeładowania lipidami komórek HepG2.

OCENA FORMALNA

Praca doktorska ma postać 272-stronicowej monografii, włączając w to streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografię i załączniki. Praca została podzielona na 12 rozdziałów i ma typowy układ dla oryginalnych prac badawczych z wyraźnym podziałem na wstęp, metodykę i materiał badawczy, cele, wyniki, dyskusję oraz wnioski. Praca zawiera cztery tabele oraz 32 rycin. Doktorant zebrała pełne, wartościowe i aktualne piśmiennictwo – 132 pozycji. Wszystkie pozycje piśmiennictwa cytowane przez Doktoranta zostały opublikowane w czasopismach anglojęzycznych o wysokim wskaźniku oddziaływania. O znaczeniu i aktualności tematu podjętego przez Doktoranta wskazuje fakt, że wiele pozycji piśmiennictw pochodzi z ostatnich pięciu lat.

WSTĘP

Zawiera 14 stron, na których Doktorant w pierwszej kolejności opisuje zagadnienia związane z otyłością, stresem oksydacyjnym, kanałami przez błonowymi (w tym opisuje szczegółowo rolę akwaporyn oraz i związek z rozwojem insulinooporności i cukrzycy). Ostatnia część wstępu poświęcona jest znaczeniu badań z zakresu proteomiki w analizie pleiotropowych efektów modulacji akwaporyn. Wstęp ze wszystkimi podrozdziałami wskazuje na dobre przygotowanie merytoryczne Doktoranta, zorientowanie w przedmiocie tematu oraz umiejętność krytycznej analizy wyników literaturowych, co prowadzi w logiczny sposób do przedłożenia założeń i celów badania.

ZAŁOŻENIE I CELE PRACY

Cele pracy zostały przedstawione zwięźle i skupiają się na dwóch aspektach:

1. The development of novel proteomic approach to the analysis of HepG2 cells and liver samples in the aspect of lipid overload and insulin resistance.
2. The elucidation of the impact of Aquaporin 9 (AQP9) modulation on cellular proteome HepG2-based model of lipid overload
3. The understanding the influence of AQP9 expression levels on oxidative stress homeostasis in the HepG2-based models of lipid overload.

Uważam, że cele pracy są bardzo ambitne. Badania Doktoranta stanowią doskonały początek bardzo ciekawego projektu, który może być cennym uzupełnieniem specjalistycznej wiedzy, ale również może mieć przełożenie na zastosowanie kliniczne w codziennej praktyce.

MATEIAŁ I METODY

Badanie zostało przeprowadzone na linii komórkowej HepG2. Próbki hepatocytów pozyskano od otyłych pacjentów bez cukrzycy, z insulinoopornością lub z cukrzycą poddanych zabiegowi rękawowej resekcji żołądka. Doktorant uzyskał zgodę Lokalnej Komisji Etycznej w Białymstoku (No. R-I-002/609/2018 and No. APK.002.107.2021).

Doktorant szczegółowo opisuje metody i techniki badawcze, które zostały zastosowane w celu realizacji założeń badania (reagents and treatments, FFAs-BSA conjugation protocol, SCD-assisted lysis method, MCX zip-tipping for peptides desalting/cleaning, MS acquisition, Data-dependent analysis (DDA), Data-independent analysis (DIA), ion chromatogram libraries, bioinformatics analysis, lipid droplets staining with Oil red O, lipid droplets staining with Bodipy 493/503, apoptosis assay, microscope short time-lapse experiments, microscope long time-lapse experiments, and digitonin treatment).

Analizę statystyczną wykonano w oparciu analizę wariancji (one-way ANOVA z testami *post hoc*). Analizę proteomiki wykonano z użyciem in Biognosys Spectronaut, a analizę szlaków z użyciem oprogramowania Ingenuity Pathway Analysis.

WYNIKI

Wyniki pracy badawczej są przedstawione w sposób zwięzły, głównie w postaci tabel i rycin. Doktorant unika powtarzania wyników w tekście i w tabelach/rycinach, co sprawia, że rozdział ten jest bardzo przejrzysty dla czytelnika. Rozdział ten podzielony jest na 15 części korespondujących z zastosowanymi technikami badawczymi, co dodatkowo ułatwia czytelnikowi zrozumienie przedstawionych danych.

DYSKUSJA

Dyskusja zawarta jest na 21 stronach i w rozdziale tym Doktorant omawia i dyskutuje uzyskane wyniki badań. Doktorant podkreśla rolę badań z zakresu proteomiki w zrozumieniu molekularnych aspektów modulowania akwaporyn w modelu przeładowania lipidami hepatocytów. Co ważniejsze, Doktorant podkreśla także konieczność poprawy aktualnej metodyki i technik badawczych, tak aby mogły one być zastosowane na szeroką skalę w praktyce klinicznej.

Otrzymane wyniki zostały sprawnie przedyskutowane z dostępnymi danymi z najnowszych pozycji piśmiennictwa światowego z zakresu proteomiki zaburzeń metabolicznych, co potwierdza dobre przygotowanie doktorantki do prowadzenia badań naukowych. Doktorant zaproponował

Rozdział ten oceniam bardzo wysoko. Praca doktorska, a w szczególności dyskusja, wskazują na dobre zdolności syntetyczne i analityczne Doktoranta. Dyskusja jest polemiczna, na wysokim poziomie merytorycznym, co stanowi uzasadnienie później postawionych wniosków badania.

WNIOSKI

Wnioski są sformułowane zwięźle i całkowicie wynikają z analiz przeprowadzonych w pracy badawczej, a także w całości odpowiadają na postawione na wstępie cele badania. Potwierdzają one nie tylko znaczenie badawcze uzyskanych wyników, ale także możliwość praktycznego zastosowania uzyskanych wyników w przygotowywaniu badań klinicznych (wykazanie, że suplementacja wielonienasyconymi

kwasami tłuszczowymi omega-3 może zapobiegać rozwojowi insulinooporności wynikającej ze spożywania diety bogatotłuszczowej).

UWAGI I KOMENTARZE

Z obowiązku recenzenta muszę przedstawić kilka uwag, które jednak mają charakter techniczny i edytorski, i nie mają wpływu na wysoką ocenę merytoryczną dysertacji.

1. W rozdziale Materiał i metody nie ma opisu populacji badanej (pacjenci poddawani rękawowej resekcji żołądka). Proszę podać liczbę włączonych pacjentów do badania w każdej grupie. W legendzie wielu rycin Doktorant używa sformułowania N=3 – czy to oznacza, że w każdej z grup (ND, IGT, T2D) było po trzech pacjentów, czy może w każdej z grup był tylko jeden pacjent?
2. W rozdziale materiał i metody Doktorant podaje, że pacjentów hepatocyty pochodziły od pacjentów bez cukrzycy, pacjentów z insulinoopornością i pacjentów z cukrzycą. Tymczasem na kilku rycinach (9, 10, 11, 12, 13) Doktorant podzielił grupy na ND, IGT, T2D. Czy więc Doktorant używając terminu insulinooporność miał na myśli nieprawidłową tolerancję glukozy?
3. Na ryc. 10–13 Doktorant podaje tylko wyniki testów *post hoc*. Proszę uzupełnić dane statystyczne o wynik analizy wariancji (ANOVA). Ponadto proszę uzupełnić informacje z jakich testów *post hoc* korzystano. Biorąc pod uwagę bardzo małą liczebność populacji badanej wydaje się, że należałoby skorzystać z nieparametrycznego testu ANOVA Kruskal-Wallis.
4. Niektóre części rozdziału Dyskusja nie zawierają cytowań źródeł naukowych (str. 74-76, 78, 82, 86-89, 91-94). Podczas przygotowywania manuskryptu do druku proszę dodać brakujące pozycje piśmiennictwa.
5. Zarówno streszczenie w języku polski jak i angielskim nie są ustrukturyzowane. Nie mają one podziału na Wstęp, Materiał i metody, Wyniki i Wnioski.

UWAGI KOŃCOWE

Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska mgr. Mauro Galli pt.: „**Impact of the expression modulation of Aquaporin 9 on proteomic profile and oxidative stress homeostasis in HepG2 model of hepatic lipid overload**” spełnia wymagania wyszczególnione w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r., poz. 478) i może być skierowana do publicznej obrony.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr. Mauro Galli jest pracą wartościową pod względem naukowym, dobrze przygotowaną warsztatowo i wnosi elementy poznawcze w zakresie patomechanizmów zaburzeń lipidowych i insulinooporności związanych z dietą. Dlatego też wnoszę do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr. Mauro Galli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, zważywszy na nowatorskie elementy poznawcze zawarte w recenzowanej dysertacji, zastosowanie złożonych technik badawczych, a także potencjalne znaczenie praktyczne uzyskanych wyników zgłaszam wnioszek o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Bytom, 31 maja 2022 r.

KIEROWNIK
Zakładu Profilaktyki Chorób Sercowo-Naczyniowych
Katedry Profilaktyki Chorób Metabolicznych
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
dr hab. n. med. Bartosz Hudzik prof. SUM

