

Bytom, 29 lipca 2022

Dr hab. med. Jerzy Jaroszewicz

Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Zakaźnych i Hepatologii

Wydział Nauk Medycznych w Zabrze

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Mauro Galli

pt. „Impact of the expression modulation of Aquaprin 9 on proteomic profile and oxidative stress homeostasis in HepG2 model of hepatic lipid overload”

przeprowadzonej pod kierunkiem: dr hab. med. Piotra Zabielskiego

Metaboliczna choroba stłuszczeniowa wątroby (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD) jest chorobą zapalną wątroby stwierdzaną u 25% populacji świata i 15-49% Europy. Skalę problemu najlepiej odzwierciedla fakt, że MAFLD dotyka obecnie już co trzeciego mieszkańca Stanów Zjednoczonych Ameryki, czy też Wielkiej Brytanii, a w perspektywie 15-25 lat może doprowadzi do marskości wątroby nawet jedną czwartą chorujących. W niektórych krajach Europy choroba ta już stanowi wiodące wskazanie do przeszczepienia wątroby. Według aktualnych wytycznych (m.in. konsensus polskich towarzystw naukowych, Nadciśnienie tętnicze w Praktyce 2022; 8(2):1-26) MAFLD winna być traktowana jako składowa zespołu metabolicznego, o skomplikowanej i wieloczynnikowej patogenezie obejmującej

insulinooporność, lipotoksyczność, stres oksydacyjny, czynniki genetyczne, aktywność endokrynną tkanki tłuszczowej, czy też zaburzenia mikrobioty jelitowej. Złożoność ta powoduje, że brak jest obecnie zarejestrowanych leków w tym wskazaniu, a toczące się badania kliniczne eksplorują różne szlaki metaboliczne m.in. insulinooporność, lipotoksyczność, aktywacja zapalenia oraz włóknienia. Jednakże pomimo ukończenia wielu badań klinicznych nadal brak jest skutecznego leczenia przyczynowego innego niż modyfikacja stylu życia, chirurgia bariatryczna, leczenie pozostałych składowych zespołu metabolicznego, a w skrajnych przypadkach przeszczepienie narządu.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Mauro Galii podejmuje bardzo aktualną tematykę patogenezy MAFDL/NASH, szczególnie w zakresie mechanizmów lipotoksyczności, stresu oksydacyjnego oraz centralnego miejsca stosunkowo słabo dotychczas scharakteryzowanego białka transportowego AQP9, należącego do rodziny akwaporyn. Praca ta jest szczególnie ciekawa ponieważ zawiera w sobie dwie warstwy naukowe, tj. optymalizację metodologii proteomiki (niecelowanych analiz DIA) oraz doświadczalną wskazującą na nowy aspekt białka AQP9, tj. regulację stresu oksydacyjnego w warunkach przeładowania komórek wątrobowych lipidami w warunkach ex-vivo oraz in-vitro. Całość rozprawy jest ukoronowana kompleksową analizą metabolomiczną w warunkach stłuszczenia ±zwiększonej ekspresji AQP9 oraz jego wyciszenia. Co ważne, analiza ta może być przyczynkiem do dalszych badań „mikrośrodowiska” w komórkach wątrobowych w warunkach przeładowania lipidami.

Rozprawa jest napisana w języku angielskim, obszerna, liczy 144 strony, ma układ klasyczny i poza wykazami skrótów, tabel i rycin zawiera wstęp, założenie i cele, bardzo precyzyjny opis zastosowanej metodyki, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie oraz piśmiennictwo. Wyniki są dodatkowo wzbogacone 4 tabelami, 35 rycinami oraz tabelami w suplemencie.

Wstęp jest obszerny i napisany skrupulatnie. Doktorant precyzyjnie opisuje mechanizmy wiążące otyłość z insulinoopornością, znaczenie wolnych rodników tlenowych w homeostazie oraz patologii komórki oraz bardziej szczegółowo znaczenie białek nie należących do rodziny akwaporyn i ich powiązania z insulinoopornością i cukrzycą. Druga część wstępu, zasługująca na szczególne wyróżnienie, w sposób przystępny ale bardzo dokładny opisuje techniki spektrometrii mas, a szczególnie porównanie metod pozyskiwania danych DDA vs DDI.

Magister Mauro Galli stawia 3 główne cele swojej rozprawy doktorskiej, które są spójne z naukowego punktu widzenia oraz nowatorskie. Co istotne, nie tylko wszystkie cele zostały zrealizowane na dalszych etapach rozprawy, ale też uzyskane wyniki wykraczają poza nie.

Zastosowana w rozprawie metodyka jest nowatorska i po części staje się też wynikiem naukowym tej rozprawy. Do badań *ex-vivo* użyto wycinków wątroby pozyskanych od skrajnie otyłych chorych poddawanych zabiegowi bariatrycznej gastrektomii z cukrzycą ($n=3$), insulinoopornością ($n=3$) oraz bez cukrzycy ($n=3$). Oczywistym niedostatkim takiego doboru dawców jest brak materiału (wycinków lub bioptatów) od pacjentów bez patologii wątroby (np. poddawanych planowemu zabiegowi cholecystektomii) co mogło by stworzyć profil metabolomiczny w warunkach kontrolnych (braku choroby wątroby). Dodatkowo z uwagi na bardzo małą grupę badaną wskazany byłby jej dokładny opis kliniczny (nie tylko co do chorób towarzyszących, ale też stosowanych leków oraz zaawansowania choroby wątroby), aby można było ocenić homogenność grup chorych. Nie znalazłem też informacji czy uczestnicy badania podpisali świadomą zgodę. Projekt uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej UMB (R-I-002/609/2018 oraz APK.002.107.2021).

Ograniczenia w dostępności do materiału klinicznego oraz ewentualną zmienność osobniczą doktorant pokonuje prowadząc dalszą i zasadniczą część doświadczeń w warunkach *in-vivo* wykorzystując komercyjne komórki HepG2 oraz stosując samodzielnie zwalidowany model przeładowania lipidami. W tym miejscu chcę wysoko ocenić precyzję, a co za tym idzie etykę naukową mgr Mauro Galli. Metodologia naukowa jest niezwykle zaawansowana ponieważ poza wspomnianymi wyżej autorskimi technikami spektrometrii mas mgr Galli stosuje również barwienia komórek na obecność lipidów, ocenia nasilenie apoptozy oraz przeprowadza barwienia w kierunku obecności, lokalizacji oraz dynamiki powstawiania H_2O_2 .

Wyniki są przedstawione bardzo skrupulatnie, również z opisem tych bez istotności statystycznej oraz wzbogacone czytelnymi rycinami i zdjęciami. Pierwsza część wyników dotyczy optymalizacji metody DIA i obejmuje ustawienia parametrów wyjściowych aparatu, optymalizację gradientu chromatografii cieczowej, energii kolizyjnej oraz ustawień STW. Ta część rozprawy będzie fascynującą lekturą dla osób samodzielnie wykonujących badania metodą spektrometrii mas. W dalszej części mgr Gallo przeprowadza badania już zoptymalizowaną metodyką na próbkach wątroby pobranych od pacjentów, a po wyselekcjonowaniu białkowych kandydatów do

dalszych badań w modelu in-vitro. Autor wykazuje zwiększoną ekspresję akwaporyny 9 (AQP9), FAB4, LPIN2 oraz HMOX2 u chorych z nietolerancją glukozy wobec grupy bez cukrzycy, co układa się w spójną całość sugerując wpływ AQP9 na regulację stłuszczenia wątroby oraz hipotetycznie na syntezę diacylogliceroli oraz aktywację stresu oksydacyjnego. Uzyskane wyniki kliniczne są nowatorskie, ponieważ istnieją jedynie pojedyncze doniesienia dotyczące ekspresji AQP9 w chorych z chorobą stłuszczeniową wątroby. Rodriguez A i wsp. (Int J Obes 2014) stwierdzili obniżoną ekspresję AQP9 w wątrobie (PCR, WB, met. histochemii) u osób z nietolerancją glikemii w stosunku do chorych normoglikemicznych oraz w podobnej populacji 66 chorych bariatrycznych, oraz obniżoną ekspresję AQP9 w wątrobie u chorych z NALFD vs osoby bez stłuszczenia, która korelowała ujemnie ze stopniem zapalenia oraz stłuszczenia wskazując na możliwy mechanizm kompensacyjny. Chciałbym aby mgr Gallo odniósł się bardziej szczegółowo do swoich wyników w porównaniu do cytowanej wyżej pracy. W dalszej kolejności doktorant przeprowadza serię eleganckich i spójnych eksperymentów w modelu przeładowania lipidami komórek HepG2. Mgr Gallo wykazuje m.in. lipotoskyczność FFA i glicerolu, wpływ inhibicji AQP9 na zahamowanie stłuszczenia HepG2, aktywację apoptozy przy zwiększeniu zawartości AQP9 oraz moim zdaniem najciekawsze, kinetykę aktywacji stresu oksydacyjnego (H₂O₂) w przeładowaniu lipidami w czasie 20 godzinnej inkubacji komórek HepG2. Przedstawione wyniki są nowatorskie, spójnie z nielicznymi pracami już opublikowanymi (m.in. Wang Ch. i wsp. Int J Mol Med. 2013;32:1159) oraz mają duży potencjał w zakresie ich translacji do medycyny klinicznej. Ukoronowaniem pracy doktoranta jest przeprowadzenie kompleksowej analizy proteomicznej komórek HepG2 w warunkach kontrolnych, przeładowania lipidami, wyciszenia oraz nadekspresji AQP9, która może być punktem wyjścia dalszych publikacji oraz analiz i jest bezwzględnie osiągnięciem unikatowym. Dalszym bardzo ciekawym doświadczeniem było by przeprowadzenie i porównanie takiej analizy na ludzkim materiale klinicznym vs HepG2

Uzyskane wyniki są nowatorskie w skali świata, i mają nie tylko znaczenie poznawcze, lecz również potencjalne terapeutyczne, jako że AQP9 może być ewentualnym punktem docelowym leków hamujących stłuszczenie.

Wyniki są krytycznie skonfrontowane ze stanem wiedzy w Dyskusji. Autor nadaje kontekst swoich obserwacji w świetle prac światowych. Co ważne, duża część dyskusji ponownie przybliży czytelnikowi niuanse metod metabolomiki oraz zastosowanych przez autora modyfikacji, co

bardzo poprawia możliwość krytycznej oceny uzyskanych wyników. Z drugiej strony, i co wymaga wyraźnego podkreślenia przez doktoranta w publikacjach, APQ9 w świetle najnowszych doniesień może mieć znaczenie w karcynogenezie (Transl Cancer Res. 2021 Apr;10(4):1826), jak również pełni liczne funkcje immunomodulacyjne (Front Oncol. 2021 Nov 5;11:770565), które trudno ocenić w modelu komórkowym, a mogą limitująco wpływać na możliwości zastosowania tego białka jako potencjalnego celu molekularnego.

Magister Mauro Galli w podsumowaniu swojej rozprawy doktorskiej sformułował prawidłowe wnioski, które są uzasadnione przeprowadzonymi analizami. Wnioski mają nie tylko charakter poznawczy, lecz także praktyczny i mogą być punktem wyjścia dalszych badań. Oceniając przedstawioną mi rozprawę chciałbym szczególnie podkreślić samodzielność naukową oraz metodyczność doktoranta, olbrzymi wkład pracy oraz umiejętność logicznego dobru narzędzi naukowych oraz eksperymentów w celu kompleksowego dowiedzenia swoich hipotez. Rozprawą ta nie tylko wypełnia wymagania stawiane doktoratom, lecz także mogła by być rozprawą habilitacyjną.

Podsumowując przedstawioną do oceny rozprawę doktorską magister Mauro Galli pt. „Impact of the expression modulation of Aquaprin 9 on proteomic profile and oxidative stress homeostasis in HepG2 model of hepatic lipid overload” oceniam bardzo wysoko, uważam ją za wartościową naukowo oraz ważną z klinicznego punktu widzenia. Spełnia ona wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021r., poz. 478). Wnoszę zatem do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr. Mauro Galli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Oddziału Klinicznego
Chorób Zakaźnych i Hepatologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

dr hab. n. med. Jerzy Jaroszewicz

