Prof. dr hab. Nina Smolińska
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
10-718 Olsztyn
Ul. Oczapowskiego 1A

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Iwony Kojty
pt. „Wpływ diety bogatotłuszczowej i wyciszania genu kodującego acylotransferazę glicerolo-3-fosforanu na indukcję insulinooporności mięśniowej"
wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Agnieszki Błachnio-Zabielskiej w Zakładzie Higieny, Epidemiologii i Zaburzeń Metabolicznych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo Dziekana Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 29 stycznia 2021 r. informujące o powierzeniu mi obowiązków recenzenta wyżej wymienionej rozprawy doktorskiej.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Oceniana rozprawa doktorska składa się z dwóch artykułów naukowych opublikowanych w 2020 roku – niżej wyszczególnionych – opublikowanych w języku angielskim w czasopismach z listy *Journal Citation Reports*, których wskaźniki naukometryczne są wysokie: łączny wskaźnik *IF* wynosi **9,102** a liczba punktów MEiN wynosi **280**. Pierwsza z publikacji jest pracą oryginalną, natomiast druga to praca przeglądowa. W wykazie publikacji stanowiących rozprawę doktorską (str. 6) podano niepełne numery doi publikacji.

1. **Kojta I**, Zabielski P, Roszczyc-Owsiejczuk K, Imierska M, Sokołowska E, Błachnio-Zabielska A. GPAT gene silencing in muscle reduces diacylglycerols content and improves insulin action in diet-induced insulin resistance. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(19): 7369. doi: 10.3390/ijms21197369. ***(IF – 4,556; pkt. MEiN – 140)***

zapasowego w komórkach tłuszczowych) i zwiększonego wychwytu wolnych kwasów tłuszczowych przez komórki, głównie miocyty i hepatocyty. Mięśnie szkieletowe są najważniejszym miejscem działania insuliny w organizmie, są odpowiedzialne za około 80-90% całkowitego, insulinozależnego wychwytu glukozy. W stanie insulinooporności obserwuje się zaburzenia metabolizmu glukozy w mięśniach. Insulinooporność związana jest ze zmniejszonym transportem glukozy poprzez transportery glukozy (GLUT 4) do komórek mięśni szkieletowych oraz z licznymi zaburzeniami pozareceptorowymi wskutek zmian aktywności białek enzymatycznych. Wyniki licznych badań wskazują na związek między akumulacją biologicznie aktywnych lipidów a nieprawidłowym wewnątrzkomórkowym działaniem insuliny w mięśniach szkieletowych. Jednakże pomimo wielu badań, nadal nie wiadomo, które biologicznie aktywne lipidy w główniej mierze odpowiadają za rozwój insulinooporności mięśniowej. Ponadto, molekularne mechanizmy odpowiedzialne za rozwój tego procesu również nie są w pełni poznane. Przedstawione przez Doktorantkę nowe wyniki w pewnym stopniu tę lukę uzupełniają. W prezentowanej rozprawie doktorskiej podjęto próbę wyjaśnienia roli diacylogliceroli w rozwoju insulinooporności mięśni szkieletowych. W tym celu przeprowadzono miejscowe wyciszenie *in vivo* genu kodującego acetylotransferazę glicerolo-3-fosforanu (*GPAT1*) w mięśniach szkieletowych, za pomocą plazmidów shRNA, i zbadano wpływ wyciszania tego genu na akumulację biologicznie aktywnych lipidów oraz na szlak transdukcji sygnału insuliny w mięśniu brzuchatym łydki myszy z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową (HFD). Doktorantka jako model badawczy wybrała samce myszy szczepu C57BL/6 i wyodrębniła dwie grupy doświadczalne (n=8 w każdej grupie): 1) grupę zwierząt karmionych standardowo, którym do mięśni brzuchatych łydki obu nóg podano plazmidy niewyciszające (kontrola); 2) grupę zwierząt z dietą HFD, u których w mięśniu brzuchatym łydki jednej z kończyn wyciszono, przy użyciu specyficznych plazmidów, gen kodujący *GPAT1* ($HFD_{(GPAT1-)}$), a mięsień drugiej łapy, po podaniu plazmidu niewyciszającego, stanowił kontrolę ($HFD_{(GPAT1+)}$). Prowadzenie badań we wspomnianym obszarze naukowym uważam za szczególnie pożądane ze względu na konieczność opracowania nowych terapii chorób związanych z insulinoopornością. Zatem, podjęte przez Doktorantkę badania uważam za w pełni uzasadnione, a tematykę badawczą – za interesującą i aktualną. O tym, że badania są ważne i nowatorskie może również świadczyć fakt uzyskania bardzo wysokiej ich oceny i co z tym jest związane – uzyskanie finansowania przez FNP na ich prowadzenie w ramach wymienionego wcześniej projektu.

Podstawą przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej są, jak już wcześniej wspomniałam, dwie prace naukowe opublikowane w bardzo dobrych, prestiżowych czasopismach o międzynarodowym zasięgu, które z pewnością zostały ocenione przez zespół recenzentów oraz edytorów obu czasopism. Niemniej jednak rolą recenzenta rozprawy doktorskiej jest ich całościowa analiza. Należy podkreślić, że oceniane prace są tematycznie spójne i wartościowe pod względem poznawczym. Praca przeglądowa jest właściwie wstępem prezentowanej rozprawy doktorskiej i część informacji w niej zawartych znalazła się we wstępie polskojęzycznego opracowania. Doktorantka dokonuje w niej szczegółowego przeglądu literatury (142 pozycje) i w przejrzysty

ul. Michała Oczapowskiego 1A,
10-719 Olsztyn
http://wbib.uwm.edu.pl/

laboratoryjne są nowoczesne i właściwie dobrane do założonego celu badawczego. Generalnie, ta część pracy została napisana poprawnie, ale pewne uwagi i sugestie nasunęły mi się po analizie tego rozdziału: 1/ Schematyczne przedstawienie układu przeprowadzonych doświadczeń zwiększyłoby przystępność opisu badań. 2/ Kolejna uwaga dotyczy opisu poszczególnych metod. Większość z nich została przedstawiona w sposób precyzyjny i wyczerpujący, ale analizę real-time PCR i Western blot opisano bardzo oszczędnie. W opisie metody real-time PCR zabrakło informacji na temat użytych starterów, warunków reakcji, kontroli negatywnych, liczby powtórzeń i sposobu analizy uzyskanych wyników. Opis metody Western blot należałoby uzupełnić o informacje dotyczące warunków reakcji, stężeń i specyficzności gatunkowej użytych przeciwciał, kontroli negatywnych oraz liczby powtórzeń. W opisie testu ELISA zabrakło informacji o czułości metody i błędach wewnątrz- i międzyseryjnych. W pracy oryginalnej, w części dotyczącej opisu analizy statystycznej, zabrakło informacji nt. rodzaju zastosowanej analizy wariancji (ANOVA). 3/ Zarówno w pracy oryginalnej jak i w opracowaniu polskojęzycznym podano błędny numer Uchwały Lokalnej Komisji Etycznej (jest nr 43, powinien być nr 35) i niewłaściwa nazwę siedziby Komisji. Doktorantce chodziło zapewne o Lokalną Komisję Etyczną Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, a nie, jak napisała, Uniwersytetu Medycznego w Olsztynie. 4/ Chciałabym także zwrócić uwagę na kilka potknięć językowych: powinno być „kontrola" zamiast „control" (str. 16), „grupa zwierząt z dietą standardową/bogatotłuszczową" zamiast „grupa zwierząt karmiona dietą standardową/bogatotłuszczową" (str. 16), „membranę inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami" zamiast „membranę inkubowano z odpowiednim przeciwciałem" (str. 20).

W rozdziale „Wyniki" Doktorantka w jasny i logiczny sposób prezentuje wyniki doświadczeń dotyczących: 1/ Wpływu diety HFD na stężenie glukozy i kwasów tłuszczowych w osoczu. 2/ Wpływu wyciszania genu *GPAT* w mięśniach szkieletowych na ekspresję białek transporterów kwasów tłuszczowych, ekspresję genów i białek GPAT, zawartość acylo-koenzymu A, acylokarnityn oraz aktywnych biologicznie lipidów w mięśniu brzuchatym łydki myszy z dietą HFD. 3/ Aktywacji szlaków sygnałowych insuliny w mięśniu brzuchatym łydki myszy z wyciszonym genem *GPAT*. 4/ Wpływu wyciszania genu *GPAT* na stymulowany insuliną wychwyt glukozy przez mięsień brzuchaty łydki myszy. Dokumentacja graficzna wyników w postaci rycin, zdjęć i tabel jest czytelna, logicznie podzielona na odpowiednie podrozdziały i raczej nie budzi zastrzeżeń. W swojej pracy Doktorantka wykazała, że dieta HFD prowadzi do indukcji insulinooporności, o czym świadczy zwiększone stężenie glukozy i insuliny we krwi, nieprawidłowa tolerancja glukozy, zmniejszona odpowiedź na insulinę, wzrost wartości wskaźnika HOMA-IR i zmniejszony wychwyt glukozy w mięśniach w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto, zaobserwowano, że dieta HFD przyczynia się do wzrostu stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu i wzrostu poziomów długołańcuchowych acylo-CoA, ceramidów, diacyloglicerolі, triacyloglicerolі i acylokarnityn w mięśniach szkieletowych. Bardzo interesujące wydaje się stwierdzenie, że wzrost stężenia aktywnych biologicznie lipidów prowadzi do zahamowania szlaku transdukcji sygnału insuliny, o czym świadczy spadek poziomu fosforylacji białek tego szlaku, co przyczynia się do zmniejszenia

ul. Michała Oczapowskiego 1A,
10-719 Olsztyn
http://wbib.uwm.edu.pl/

stwierdza, że „...Wyciszenie GPAT w mięśniach zwierząt karmionych HFD zwiększyło wychwyt glukozy w stosunku do mięśni niewyciszonych...". Jednak na rycinie 7b wersji polskojęzycznej i rycinie 5b pracy oryginalnej nie zaznaczono różnic statystycznie istotnych. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tych niespójności. 7/ W tej części rozprawy znalazłam też kilka niefortunnych określeń: „wpływ spożycia diety wysokotłuszczowej" (ryc. 3, str. 24), „dwukrotny wzrost odnotowano w następujących kwasach tłuszczowych" (str. 25), „gatunków molekularnych diacyloglicerolu" (str. 32), „zawartość ceramidu" (str. 33, 34). 8/ Doktoranta nie dołączyła do opracowania rozprawy tabel S1- S5 zamieszczonych w suplementach pracy oryginalnej.

W dyskusji zamieszczonej w publikacji oryginalnej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej podjęto wnikliwą analizę i interpretację prezentowanych wyników w świetle aktualnej literatury. W moim odczuciu Dyskusja jest wszechstronna i wyczerpująca. Świadczy to o zrozumieniu tematyki badawczej oraz o dojrzałości naukowej Doktorantki. Sugerowałbym jedynie, aby Doktorantka wskazała/uwypukliła jakie nowe informacje wnoszą wyniki jej rozprawy doktorskiej. Proponowałabym także uwzględnienie w dyskusji schematu obrazującego potencjalną rolę diacyloglicerolі w indukowaniu insulinooporności mięśni szkieletowych. Opracowanie polskojęzyczne kończą cztery wnioski, a w pracy oryginalnej pojawia się rozdział wnioski, które syntetycznie podsumowują uzyskane przez Doktorantkę wyniki. Uważam jednak, że rozdział ten, w opracowaniu polskojęzycznym, należałoby zatytułować „Podsumowanie i wnioski" i uzupełnić o wniosek końcowy zawarty w pracy oryginalnej. We wnioskach pracy znalazłam niefortunne określenia: „spożywanie diety HFD", „co zwiększyło aktywność szlaku insuliny" (str. 38).

Swoje uwagi i sugestie zawarłam po analizie każdego z rozdziałów. Na zakończenie swojej oceny prosiłabym Doktorantkę o odpowiedź, podczas obrony, na następujące pytanie: w jaki sposób uzyskane przez Doktorantkę wyniki mogą przyczynić się do opracowania nowych terapii chorób związanych z insulinoopornością bądź sposobów ich zapobiegania?

PODSUMOWANIE

Pragnę stwierdzić z pełnym przekonaniem, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a uzyskane przez Doktorantkę wyniki nie tylko dostarczają nowych danych, które stanowią cenne uzupełnienie badań zmierzających do znalezienie nowych czynników regulujących wrażliwość mięśni na insulinę i poznania mechanizmu ich działania, ale mogą stanowić podstawę do prowadzenia kolejnych eksperymentów. Opublikowana praca przeglądowa, będąca częścią rozprawy doktorskiej, jest rzetelnie przygotowana, prezentuje aktualny stan wiedzy na temat zagadnień będących przedmiotem rozprawy i świadczy o bardzo dobrej znajomości tematu. Oryginalna praca, stanowiąca pierwszą część rozprawy doktorskiej, jest dobrze przygotowana, zawiera jasno określony cel uzupełniony dobrym opisem przeprowadzonych doświadczeń i uzyskanych wyników oraz merytoryczną dyskusją. Na podkreślenie zasługuje również szeroki zakres prowadzonych badań naukowych oraz kompleksowe podejście do rozpatrywanego

ul. Michała Oczapowskiego 1A,
10-719 Olsztyn
http://wbib.uwm.edu.pl/