



Dr hab. Magdalena Jaszek prof. UMCS
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie- Skłodowskiej
W Lublinie

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Anny Zajęc-Grabiec

p.t. „ Wchłanianie i metabolizm kwasów tłuszczowych n-3 w stanach zapalnych- modele *in vitro*”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska przygotowana przez Panią mgr Annę Zajęc-Grabiec dotyczy ważnej tematyki badawczej bardzo dobrze wpisującej się w potrzeby naukowe dotyczące problemów współczesnej medycyny. Doktorantka oceniła w modelu *in vitro* znaczenie kwasów tłuszczowych szeregu n-3 w kontekście ekspresji genów i syntezy wybranych białek prozapalnych w mysich preadipocytach/adipocytach 3T3-L1 i ludzkich komórkach nabłonkowych jelita Caco-2 aktywowanych wybranymi czynnikami zapalnymi.

Problemy związane z samym stanem zapalnym jako odpowiedzią komórek organizmu na pojawiające się czynniki destabilizujące jego naturalną homeostazę jak i niwelowanie jego skutków stanowią jeden z wiodących nurtów współczesnej farmakologii. Prowadzone są liczne badania dotyczące zarówno mechanizmów molekularnych tych przemian jak i poszukiwania czynników o potencjale przeciwzapalnym do których należą opisywane w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej wielonienasycone kwasy tłuszczowe oraz ich pochodne. Znaczenie tych badań podnosi fakt, iż opisywane w pracy procesy chorobowe takie jak otyłość, insulinooporność, zaburzenia funkcjonowania układu odpornościowego człowieka, zaburzenia procesu adipogenezy czy też procesy związane z nowotworzeniem to właśnie niektóre z konsekwencji utraty kontroli organizmu nad przebiegiem procesów zapalnych. Jak wskazują dostępne dane literaturowe jednym z elementów odgrywających kluczową rolę w tych procesach są przemiany metaboliczne lipidów wpływające zarówno na funkcjonowanie błon komórkowych jak i na szlaki przekazywania sygnałów w obrębie tkanek i narządów.

Kompleksowe poznanie tych zagadnień może znacznie poprawić skuteczność leczenia wielu stanów patologicznych oraz może być podstawą do zaproponowania skutecznych działań profilaktycznych. W tym kontekście moim zdaniem podjęcie przez Doktorantkę zaprezentowanej tematyki badań jest jak najbardziej uzasadnione.

Rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Annę Zając- Grabiec ma układ klasyczny charakterystyczny dla prac eksperymentalnych. Opracowany manuskrypt obejmuje 70 stron tekstu, 13 stron spisu 144 pozycji piśmiennictwa oraz 2 tabeli i 29 rycin w których zaprezentowano wyniki eksperymentów stanowiących podstawę merytoryczną pracy. Praca została podzielona przez Doktorantkę na 8 rozdziałów poprzedzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim, spisem skrótów wykorzystanych w przedstawionym do oceny manuskrypcie oraz spisem treści. Pewien niedosyt recenzenta budzi brak anglojęzycznych wersji znaczenia poszczególnych symboli. Mimo, iż podczas przygotowania rozprawy Autorka nie uniknęła pewnych błędów stylistycznych i edytorskich (np. brak spisu tabel) manuskrypt jest opracowany w sposób przejrzysty z zachowaniem reguł dotyczących rozpraw doktorskich.

Wstęp pracy został przedstawiony przez Doktorantkę w sześciu podrozdziałach. W pierwszym podrozdziale Autorka opierając się na przeglądzie dostępnych danych literaturowych przedstawia charakterystykę kwasów tłuszczowych z uwzględnieniem ich budowy, właściwości oraz przemian metabolicznych w tym enzymatycznej konwersji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w organizmie człowieka. Dokonuje porównania kwasów tłuszczowych szeregu n-6 i kwasów tłuszczowych szeregu n-3. W podpunkcie tym podkreślone zostały również aspekty związane z właściwą proporcją pomiędzy spożywanymi kwasami szeregu n-6 i n-3 i jej znaczeniem dla zdrowia człowieka. W kolejnym podrozdziale Autorka skupiła się na omówieniu roli metabolicznej kwasów tłuszczowych szeregu n-3. Szczegółowo opisane zostały wybrane aspekty podstaw molekularnego działania tych związków i ich znaczenie dla utrzymania homeostazy komórkowej. Podkreślona została plejotropowa rola kwasów n-3 przejawiająca się zarówno na poziomie ekspresji odpowiednich genów, modyfikacji lipidów błonowych czy oddziaływania na szlaki sygnalizacji komórkowej. Kolejny podpunkt wprowadza czytelnika w zagadnienia związane ze stanem zapalnym z uwzględnieniem czynników mogących go wywołać jak i ogólną charakterystykę przebiegu zapalenia w organizmie człowieka. Na podstawie danych literaturowych omówione zostały elementy odpowiedzi humoralnej i komórkowej oraz czynniki związane z wygaszaniem tego procesu takie jak mediatory lipidowe (marezyny czy lipoksyny) będące pochodnymi kwasów wielonienasyconych. Według aktualnego stanu wiedzy uczestniczą one między innymi w

modulacji odpowiedzi immunologicznej w celu usunięcia stanu zapalnego. Tytuł podrozdziału 1.4 to „Mediatory lipidowe” co sugeruje całościowe ujęcie tematu obejmujące zarówno syntezę jak i charakterystykę poszczególnych związków należących do tej grupy. Jednak Doktorantka skupia się w nim jedynie na procesach związanych z przemianami metabolicznymi dopiero w dalszych rozdziałach opisując szczegółowo konkretne przykłady związków. W odczuciu Recenzenta korzystniej byłoby po ogólnym krótkim wstępie wprowadzającym w tematykę tego fragmentu wydzielić podpunkty obejmujące dalsze zagadnienia (1.4.1, 1.4.2 itd.). Poprawiłoby to przejrzystość tej części manuskryptu. Z punktu widzenia Recenzenta korzystnie byłoby wzbogacić ten rozdział o informacje dotyczące związku stanu zapalnego i jego wygaszania z procesami nowotworzenia zwłaszcza w kontekście metastazy oraz informacje dotyczące roli stresu oksydacyjnego i jego markerów w opisywanych procesach tym bardziej, że elementy związane z tym zjawiskiem są przedmiotem części doświadczałnej przedstawionej do oceny pracy. Pewien niedosyt budzi również czytelność wykorzystanych w tym rozdziale opracowań graficznych dotyczących opisywanego tematu. Podsumowując, poza wymienionymi wcześniej uwagami oraz pewnymi potknięciami edytorsko- stylistycznymi, rozdział **Wstęp** opracowano w sposób syntetyczny i przejrzysty a zamieszczone informacje zostały poparte odpowiednimi danymi literaturowymi. Dyskusyjna według recenzenta jest forma przedstawienia cytowań danych literaturowych, które są oznaczone numerycznie ale w manuskrypcie umieszczone są zgodnie z kolejnością w jakiej zostały uporządkowane alfabetycznie i ponumerowane w rozdziale **Bibliografia** i w konsekwencji pierwsze cytaty to 17 i 141 co odpowiada miejscu tej pozycji na liście alfabetycznej.

Kolejnym rozdziałem prezentowanej pracy jest **Cel pracy** w którym Doktorantka w syntetyczny sposób przedstawiła główne założenia planu eksperymentalnego będącego podstawą pracy. Według zaprezentowanego ogólnego opisu jego realizacja miała doprowadzić do określenia wpływu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych szeregu n-3 na ekspresję genów i białek prozapalnych w mysich preadipocytach/adipocytach 3T3-L1 i ludzkich komórkach nabłonkowych jelita Caco-2 aktywowanych czynnikami zapalnymi. Z punktu widzenia Recenzenta korzystny byłoby bardziej precyzyjny opis tego fragmentu i zachowanie większej zbieżności jego sformułowania z tytułem pracy.

Dalszą część pracy stanowi opracowany przez Doktorantkę rozdział **Materiał i metody**, który odpowiada zadaniom badawczym przedstawionym w celu pracy. Zastosowana metodyka eksperymentalna, świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu badawczego. Rozdział ten złożony jest z 7 podrozdziałów obejmujących opis pozyskiwania i przygotowania

materiału biologicznego do oznaczeń oraz procedur doświadczalnych zastosowanych w realizacji zadań przedstawionych w **Celu** pracy. Opisano w sposób przejrzysty metody prowadzenia hodowli komórkowych wykorzystanych do badań, oceny cytotoksyczności wykorzystanych związków, czy analizy poziomu białek takich jak cyklooksygenaza 2, cytozolowa syntaza prostaglandyny E2, receptor dla prostaglandyny, receptor dla węglowodorów aromatycznych, białko wiążące kwasy tłuszczowe 4, transporter glukozy 4, receptor kannabinoidowy 2, receptor Toll-like 4, receptor GPR120, cytozolowa fosfolipaza A2. Jako endogenną kontrolę w przeprowadzonych analizach Western Blot wykorzystano β -aktynę lub GAPDH. W kolejnych dwóch podrozdziałach opisano analizę ekspresji wybranych genów techniką Real Time-qPCR oraz oznaczenie poziom interleukiny-6 w komórkach Caco-2. Ostatnie dwa podrozdziały tego fragmentu manuskryptu to opis badania poziomu izoprostanów w komórkach 3T3-L1 inkubowanych z EPA aktywowanych BaP oraz metodyka analiz statystycznych wykorzystanych do opracowania zaprezentowanych w pracy wyników badań. Z punktu widzenia recenzenta pewien niedosyt budzi brak wyjaśnienia kryteriów zastosowanych przy wyborze dawek poszczególnych czynników wykorzystanych przy realizacji planu badawczego (fragment „ Opis przeprowadzonych eksperymentów”) czy wynikały one z wcześniejszych nie prezentowanych w pracy doświadczeń czy z danych literaturowych? Prawdopodobnie w wyniku błędu edytorskiego wystąpiła również niezgodność danych dotyczących dawek podanych w rozdziale **Materiał i metody** a rozdziałem **Wyniki** (punkt 3, opis przeprowadzonych eksperymentów).

Wyniki zostały podzielone przez Doktorantkę na 6 głównych podrozdziałów opisujących kolejno realizację planu badawczego przedstawionego w **Celu** pracy. Rozdział ten został opracowany i zaprezentowany w sposób analityczny i przejrzysty. Po opisie oceny żywotności komórek 3T3-L1 i Caco-2 Doktorantka podzieliła uzyskane wyniki na pięć oddzielnych eksperymentów z wyszczególnionymi podrozdziałami. Uzyskane rezultaty wykazały brak cytotoksycznego działania kwasów EPA lub DHA , metforminy i lowastatyny na komórki 3T3-L1 oraz EPA i DHA na komórki Caco-2 aktywowane czynnikami prozapalnymi. Przeprowadzona w kolejnych etapach pracy analiza Western Blot materiału biologicznego otrzymanego z hodowli komórkowych adipocytów 3T3-L1 wykazała że, obecność EPA i IF powodowała istotny statystycznie spadek poziomu białek COX-2, cPGES i TLR4 oraz wzrost ilości białka CB2. Zanotowano także aktywację receptora GLUT4 w próbkach suplementowanych EPA. Wyniki uzyskane w eksperymencie obejmującym badanie adipocytów inkubowanych według opisu zawartego w rozdziale **Materiał i metody** - z 40 μ mol EPA lub DHA (według opisu zamieszczonego w rozdziale **Wyniki**- 25 μ mol) oraz

10 μmol metforminy i 2,5 μmol lowastatyny aktywowanych czynnikiem martwicy nowotworu TNF- α wykazało osiągnięcie najwyższego poziomu białka COX-2 w adipocytach aktywowanych TNF- α , natomiast poziom białka GLUT-4 był najniższy po aktywacji adipocytów czynnikiem zapalnym. Suplementacja aktywowanych kultur komórkowych metforminą, kwasami tłuszczowymi czy lowastatyną powodowała wyraźne podwyższenie poziomu GLUT-4. Eksperymenty prowadzone z wykorzystaniem ludzkich nabłonkowych komórek jelit Caco-2 inkubowanych z EPA (10 i 25 μmol) i aktywowanych dodatkiem LPS wykazały statystycznie istotne obniżenie poziomu białek prozapalnych COX-2, cPGES oraz AHR. Warto podkreślić, że w tym przypadku wprowadzenie kwasu EPA wyraźnie obniżało również poziom jednego z markerów stanu zapalnego jakim jest IL-6. Zastosowanie odmiennego układu doświadczalnego dotyczącego komórek Caco-2 obejmującego suplementację kwasem dokozaheksaenowym (DHA) a aktywowanych toksyną A (TOXA) również potwierdziło obniżenie się poziomu białek takich jak cyklooksigenaza 2, cPGES czy receptor FP związanych procesami metabolicznymi kwasów tłuszczowych w stanach zapalnych. Przeprowadzona analiza ekspresji genów wykazała, że inkubacja komórek 3T3-L1 z EPA i IF spowodowała represję genu *Ptgs2* i wzrost ekspresji genu *Pla2g4a*. W przypadku adipocytów aktywowanych czynnikiem martwicy nowotworu TNF- α inkubowanych z EPA lub DHA oraz metforminą i lowastatyną wykazano nadekspresję genu *Ptgs2* i *Pla2g4a* oraz statystycznie istotne obniżenie ekspresji genu *Pparg*. Realizacja badań zaplanowanych w eksperymencie drugim pozwoliła zidentyfikować i oznaczyć ilościowo izoprostany 8-izoprostaglandyny F2 α (8-isoPGF2 α), 8-isoPGF3 α , prostaglandyny F2 α (PGF2 α) oraz PGF3 α przy wykorzystaniu technik chromatograficznych. Analiza otrzymanych wyników wykazała, że dodanie do hodowli adipocytów 3T3-L1 aktywowanych BaP tak przed jak i po zróżnicowaniu kwasów EPA i DHA wyraźnie obniżało ilość izoprostanów. Podsumowując rozdział **Wyniki** został opracowany w formie pięciu oddzielnych eksperymentów. Z punktu widzenia recenzenta pewien niedosyt sposób wyjaśnienia wyboru takiego schematu doświadczeń przez co pojawia się wrażenie pewnego braku spójności pomiędzy poszczególnymi eksperymentami. Dobrze byłoby krótko opisać dlaczego w poszczególnych eksperymentach oznaczano zaprezentowane parametry jak chociażby ilość izoprostanów (eksperyment 2) czy IL-6 oznaczonej tylko w eksperymencie 4. Biorąc pod uwagę publikację wyników warto również zdaniem Recenzenta rozważyć poprawę jakości opracowań graficznych wyników, które w są w pewnych miejscach słabo czytelne. W odczuciu recenzenta należy również zwrócić uwagę na poprawność sformułowań np. spadek tego białka, wzrost białka, ekspresja białka itp. Pomimo uwag dotyczących opracowania tej części pracy z których

część ma charakter dyskusyjny, **Wyniki** stanowią kompleksowe i syntetyczne opracowanie. Ten fragment rozprawy został przedstawiony w sposób przejrzysty i czytelny.

Otrzymane w wyniku realizacji planu badawczego wyniki zostały podsumowane w liczącym 11 stron rozdziale **Dyskusja**, gdzie Doktorantka przedstawiła interpretację uzyskanych danych w oparciu o zaproponowany materiał literaturowy. Rozdział ten zawiera obszernie fragmenty opisujące stan zapalny, przyczyny jego powstania (z uwzględnieniem mechanizmów molekularnych), skutki i możliwości wykorzystania np. kwasów tłuszczowych w wygaszaniu i prewencji tego zjawiska. W kontekście tych informacji doktorantka prezentuje własne oryginalnie opracowane wyniki badań. Uzyskane rezultaty pozwoliły doktorantce na sformułowanie wniosków mających duże znaczenie w kontekście wygaszania stanów zapalnych. Z zaprezentowanych danych dotyczących zmian poszczególnych markerów wynika, że związki takie jak EPA, DHA i ich pochodne mogą okazać się pomocne w leczeniu i profilaktyce licznych chorób takich jak otyłość, cukrzyca, nieswoiste zapalenie jelit czy choroba Leśniowskiego-Crohna. Wykorzystany model doświadczalny oparty na dwóch typach komórek adipocytach oraz komórkach nabłonkowych jelita Caco-2 pozwolił ocenić wpływ kwasów szeregu n-3 zarówno na metabolizm tkanki tłuszczowej jak i elementy funkcjonowania układu pokarmowego w stanach zapalnych. Sposób przygotowania tego rozdziału pokazuje, że Autorka dobrze orientuje się w opisywanej problematyce badawczej, potrafi sprawnie analizować przeprowadzone analizy oraz w sposób przejrzysty je przedstawić. W odczuciu Recenzenta podczas przygotowania pracy do publikacji warto ograniczyć część teoretyczną w tej części na rzecz bardziej wnikliwej interpretacji danych doświadczalnych. Według oceny recenzenta korzystne byłoby również schematyczne opracowanie graficzne podsumowujące uzyskane dane co ułatwiłoby interpretację uzyskanych wyników, formułowanie wniosków oraz jednocześnie poprawiłoby spójność pracy. Według oceny Recenzenta wyraźniej należałoby podkreślić elementy nowatorskie pracy oraz odnieść się do tytułu pracy. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę objęły elementy metabolizmu kwasów tłuszczowych szeregu n-3 w stanach zapalnych badanych w zaprezentowanych modelach *in vitro*, ale korzystnie byłoby to podkreślić. Zdaniem Recenzenta dyskusyjne jest również używanie sformułowań takich jak: „w mojej pracy”, „wyniki moich badań”. Korzystniej byłoby wykorzystać w opisie formę bezosobową.

Przedstawiony do oceny manuskrypt zakończony został przez Doktorantkę syntetycznym **Podsumowaniem** w którym Autorka prezentuje najważniejsze wyniki uzyskane w pracy. Główne osiągnięcia przedstawionej przez mgr Annę Zając-Grabiec do oceny rozprawy doktorskiej skoncentrowały się wokół kilku punktów. Po pierwsze w pracy wykazano, że

inkubacja adipocytów aktywowanych czynnikami prozapalnymi z EPA powoduje istotny statystycznie spadek poziomu białek takich jak COX-2, cPGES i TLR4, represję genu Ptgs2 i wzrost ekspresji genu Pla2g4a kodującego fosfolipazę A. Kolejną ważną obserwacją było stwierdzenie wzrostu stężenia białka CB2 w komórkach adipocytów aktywowanych czynnikami prozapalnymi i inkubowanych jednocześnie z EPA. Odkryto, że wprowadzenie do układu doświadczalnego opartego na komórkach 3T3-L1 (preadipocytów i adipocytów aktywowanych BaP) EPA, DHA i RvD powodowało znaczne obniżenie ilości PGF2 α , 8-iPGF2 α i 8-iPGF3 α oraz zwiększenie poziomu PGF3 α . Uzyskane wyniki wskazują także na aktywację przez EPA białka FABP4 oraz receptora GLUT4. Efekt przeciwzapalny EPA i DHA został również zaobserwowany w komórkach nabłonkowych jelita Caco-2 aktywowanych czynnikami prozapalnymi.

Podsumowując, w mojej ocenie przedstawiona praca stanowi oryginalne rozwiązanie konkretnego problemu badawczego i co warto podkreślić część wyników została już opublikowana. Zagadnienia związane z rolą kwasów tłuszczowych i ich metabolitów w przebiegu procesów zapalnych, ich rola przeciwzapalna i przeciwutleniająca wydają się być bardzo istotne zwłaszcza w kontekście opracowania nowych strategii terapeutycznych dotyczących leczenia chorób cywilizacyjnych takich jak otyłość czy cukrzyca. Pracę oceniam pozytywnie podkreślając, że zamieszczone w recenzji uwagi, komentarze oraz pytania nie zmieniają jej ogólnej pozytywnej oceny.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia kryteria stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim wymagane Ustawą 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 późniejszymi zmianami z dnia 18 marca 2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz. 455) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję o dopuszczenie mgr Anny Zajac- Grabiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin 30.08.2022

Dr hab. Magdalena Jaszek prof. UMCS

