

Dr hab. Kateryna Pierzynowska,

Jabłonna, 25 sierpnia 2022.

profesor instytutu

Zakład Fizjologii Zwierząt

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt

im. Jana Kielanowskiego

Polskiej Akademii Nauk

Instytucka 3, 05-110 Jabłonna

OCENA

pracy doktorskiej mgr. Anny Zając-Grabiec pt. Wchłanianie i metabolizm kwasów tłuszczowych

szeregu n-3 w stanach zapalnych – modele *in vitro*,

wykonanej pod promotorstwem Pani dr hab. n. farm. Joanny Gduly-Argasińskiej w Zakładzie

Radioligandów, w Katedrze Farmakobiologii, Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu

Jagiellońskiego - Collegium Medicum w Krakowie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została zredagowana w kształcie monografii naukowej, z podziałem treści na następujące rozdziały: wykaz publikacji, streszczenie w językach polskim i angielskim, skróty stosowane w pracy, spis treści, wprowadzenie, cel badan, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, piśmiennictwo i spis rycin. Załączony został też opublikowany artykuł. Zastosowana forma pomaga w penetracji treści pracy. Dysertacja jest klarowna pod względem edytorskim, semantycznym.

Omawiana rozprawa obejmuje: 2 strony nienumerowane, 83 strony numerowane od 2-85 stron wydruku komputerowego i zawiera 144 pozycje piśmiennictwa, a także 2 tabele oraz 29 rycin.

W obejmującym 19 stron wprowadzeniu doktorantka dostarcza ogólnych informacji na temat kwasów tłuszczowych, ich roli w homeostazie i głównych etapach ich metabolizmu. Podano również główne cechy fizjologiczne i biochemiczne procesu zapalnego oraz jego mediatorów. Podkreślono znaczenie WNKT n-3 i n-6 o właściwościach pro- i przeciwzapalnych, opisano i scharakteryzowano ich metabolity. Doktorantka opisuje również modele *in vitro* wykorzystywane do eksperymentów, podając i porównując główne cechy histologiczne i molekularne komórek występujących w organizmach żywych oraz ustalonych linii komórkowych, które zostały wykorzystane w opisywanych badaniach. Wstęp jest dobrym zwięzłym opracowaniem zasługującym na jego włączenie do publikacji przybliżającej poznane ostatnio mechanizmy procesu zapalnego w tkance tłuszczowej, otyłości i zaburzeń metabolicznych, co wskazuje, że autorka niewątpliwie dobrze rozeznana jest w światowym piśmiennictwie w badanym zakresie.

Jednak pomimo obfitej ilości metabolicznej informacji podanych we wstępie, sekcja nie w pełni odzwierciedla istniejące problemy zdrowotne społeczeństwa, które wymagają dogłębnego i gruntownego zbadania ich mechanizmów i nowatorskich strategii leczenia, nowości i znaczenia przeprowadzonych badań zarówno dla środowiska naukowego, jak i możliwych zastosowań.

Zaproponowany cel pracy doktorskiej zamieszczony na stronie 33 odzwierciedla profesjonalne podejście naukowe doktorantki i jej opiekuna naukowego do planowania i prowadzenia badań. Szkoda, że choć cel jest jasno sformułowany i oczywiście poparty głębokimi rozważaniami, nie znajduje on odzwierciedlenia w tytule pracy, który wydaje się bardzo szeroki i ogólny. Nie ulega jednak wątpliwości, że problem zapalenia tkanki tłuszczowej i udziału WNKT w tym procesie jest niewątpliwie istotny, a mechanizmy leżące u jego podstaw wymagają dalszych badań.

W materiałach i metodyce badań przedstawionych na 6 stronach doktorantka jasno i dokładnie opisuje warunki hodowli komórek, schemat doświadczeń i metody stosowane w przeprowadzonych badaniach. Na szczególną uwagę zasługuje fakt zastosowania do badań szeregu nowoczesnych metod badawczych takich jak: badanie cytotoksyczności za pomocą zestawu ApoTox-Glo Triplex a także stosowanie UHPLC do mierzenia poziomu izoprostanów. Zastosowanie tej metody dało możliwość pomiaru z natury niskich poziomów izoprostanów w komórkach, a tym samym oszacowania markerów stresu oksydacyjnego, co niewątpliwie podnosi jakość i wiarygodność wyników

Wyniki zostały opisane na 18 stronach. Doktorantka dokładnie opisała wyniki uzyskane w pięciu niezależnych eksperymentach. Dla komórek 3T3-L1 aktywowanych za pomocą TNF- α lub LPS i inkubowanych z EPA przez 24 godziny podano poziomy białek prozapalnych FABP4 i GLUT4 oraz ekspresję genów Ptg2 i Pla2g4a. Inkubacja z EPA niewątpliwie hamuje odpowiedź zapalną poprzez obniżenie poziomu białek prozapalnych, takich jak COX-2, cPGES i TLR4 oraz zwiększenie poziomu receptora CB2. Poziomy zarówno FABP4 jak i GLUT4 były znacząco podwyższone po inkubacji z EPA. Ekspresja Ptg2 stymulowana przez aktywację komórek uległa znacznemu obniżeniu po 24h inkubacji z EPA. W tym samym czasie zaobserwowano podwyższenie ekspresji Pla2g4a.

Pokazano poziomy izoprostanów dla komórek 3T3-L1 przed i po różnicowaniu, aktywowanych BaP i inkubowanych z EPA, DHA lub RvDv. Poziomy wszystkich mierzonych izoprostanów były znacząco zwiększone przez aktywację BaP zarówno w niezróżnicowanych, jak i zróżnicowanych komórkach 3T3L1 i taki wzrost został zmniejszony przez inkubację z EPA, DHA i RvDv. Dane te wyraźnie pokazują skuteczność EPA, DHA i RvDv jako środków przeciwutleniających i przeciwzapalnych.

Zależny od TNF- α wzrost poziomów COX-2 był znacząco zmniejszony przez podawanie EPA, DHA, metforminy lub lowastatyny. Wszystkie wymienione środki również wyraźnie wykazują

stymulujący wpływ na ekspresję GLUT4, która została wyciszona przez aktywację TNF- α . Przeanalizowano również ekspresję Ptgs2, Pla2g4a i Pparg. Ekspresja Ptgs była obniżona przez wszystkie badane substancje, podczas gdy ekspresja Pparg była podwyższona przez wszystkie z nich. Supresja Ptgs ma oczywiście konsekwencje przeciwzapalne, jak również podwyższona ekspresja Pparg. Ten ostatni wynik wskazuje również na zachodzące zmiany w metabolizmie glukozy, zmniejszenie insulinooporności i zmiany przeciwzapalne. Jednak wzorzec danych uzyskanych z ekspresji Pla2g4a nie jest podobny do poprzednich wzorców. Wydaje się, że inkubacja z EPA jeszcze bardziej stymuluje zależny od TNF- α wzrost ekspresji Pla2g4a, podczas gdy inne substancje (DHA, metformina i lowastatyna) obniżają jego poziom.

Ostatnie dwa eksperymenty przedstawione w tej pracy są przeprowadzane na linii komórkowej CaCo-2. Komórki CaCo-2 aktywowano LPS lub TOXA, a następnie inkubowano odpowiednio z EPA lub DHA. Zmierzono poziom białek prozapalnych i ekspresję genu Ptgs2 oraz wykazano właściwości przeciwzapalne obu kwasów tłuszczowych.

Zastosowane bardzo specyficzne techniki badawcze sugerują szeroką współpracę doktorantki z różnymi ośrodkami badawczymi. Taka wielośrodkowa horyzontalna współpraca podnosi zdecydowanie wartość uzyskanych wyników i podkreśla samodzielność i roztropność doktorantki i jej promotora.

W starannie opracowanej dyskusji, doktorantka omawia wyniki badań na 10 stronach pracy. Poziom dyskusji jest wysoki, a interpretacja wyników prawidłowa i uzasadniona. Różnorodność zastosowanych metod pozwoliła na oszacowanie szerokiej gamy analizowanych parametrów. Trafność z jaką doktorantka interpretuje uzyskane wyniki wskazuje na ich zrozumienie, a także na przyczyny wyboru metod, dzięki którym zostały otrzymane. Należy podkreślić, że autor odpowiada dokładnie na cel omawianej rozprawy.

Podsumowanie pracy zostało przedstawione na jednej stronie i odzwierciedla ono zarówno wyniki jak i dyskusję, jednocześnie wskazują na niewątpliwą rolę n-3 PUFA w regulacji odpowiedzi zapalnej i metabolizmu glukozy tkanki tłuszczowej i enterocytów.

Tak barwna pod względem metodycznym i uzyskanych wyników praca musi zawierać pewne mankamenty i stymulować do postawienia sugestii i zadania pytań:

1. Wstęp powinien jasno opisywać i podkreślać wagę, aktualność i nowatorstwo prowadzonych badań, a także własne rozważania autora dotyczące poszukiwania możliwych przyszłych zastosowań.
2. Cel powinien znaleźć odzwierciedlenie w tytule pracy, który obecnie jest bardzo ogólny i nie odzwierciedla ustaleń autora.
3. Sekcja Materiały i Metody pomimo dużej ilości informacji nie pozwala na odtworzenie badania. Brakuje niektórych ważnych szczegółów opisu eksperymentów. Nie jest jasne, jakie było ostateczne stężenie substancji eksperymentalnych w pożywce do hodowli komórek, ponieważ jednostkami użytymi przez autorkę nie są jednostki stężenia, ale jednostki ilości substancji (mol). W ogóle nie wspomniano o rozpuszczalniku MET i LOVA.
4. Czas inkubacji wydaje się być bardzo krótki (24 h). Autorka powinna w części Dyskusja opisać powody wyboru tak krótkiego czasu inkubacji.
5. Autorka powinna jasno określić powód dodania 20% FBS do podłoża hodowlanego komórek CaCo-2 i omówić stosowność danych uzyskanych na tej linii komórkowej.
6. Autorka wspomina o częstotliwości zmian pożywki, ale nie o częstotliwości pasażu komórek. Bardzo ważne jest, aby wiedzieć, który pasaż był używany do eksperymentów. Ogromne znaczenie ma również testowanie linii komórkowych na

obecność *Mycoplasma*. Autor powinien wspomnieć, czy ten test został wykonany lub wyjaśnić, dlaczego tak nie było. W ogóle nie wspomniano o warunkach inkubacji (typ płytki) 3T3-L1 podczas eksperymentów. Metody zbierania komórek nie są nigdzie opisane.

7. Niestety autor nie załączył żadnych zdjęć komórek wykonanych przed i po różnicowaniu i/lub przed i po traktowaniu. Takie zdjęcia mogłyby podnieść wartość naukową pracy i udowodnić niektóre stwierdzenia typu „proces różnicowania był wyraźnie widoczny” (s. 35).
8. Przydatne może być dodanie zasady testu zestawu ApoTox-Glo Triplex, ponieważ metoda jest stosunkowo nowa, a czytelnicy powinni być w stanie zrozumieć, co dzieje się podczas inkubacji i jakie parametry są mierzone. Co więcej, opis badania cytotoksyczności prowokuje pytania. Dlaczego komórki inkubowano z substancjami doświadczalnymi tylko przez dwie godziny, podczas gdy czas inkubacji w doświadczeniach wynosił 24 godziny?
9. W opisie procedury Western Blot znowu brakuje kilku ważnych szczegółów. Na przykład pojawia się kwestia stężenia inhibitorów proteazy i całkowitej ilości białka. Nie podano pochodzenia przeciwciał, więc nie jest jasne, gdzie były one pochodzenia zwierzęcego lub rekombinowane. Przydałoby się mieć numery katalogowe odczynników.
10. Dobrze byłoby mieć chociaż krótki opis metody pomiaru poziomu izoprostanów. Rozważenie pomiaru izoprostanów w mediach mogłoby również zwiększyć wartość naukową pracy.
11. Na rycinach 16-20 brakuje opisu różnic statystycznych.

12. W sekcji Dyskusja autor często używa stwierdzenia „wyniki moich badań”, które nie jest adekwatne do opisu danych uzyskanych przez całą grupę badawczą przy superwizji i współpracy wielośrodkowej.
13. Zasadniczą część wyników stanowią dane dotyczące ekspresji genów. Jednak niewiele o tym wspomina się w dyskusji. Ta sekcja w przyszłej publikacji może być również wzbogacona o rozważania dotyczące dalszych wymaganych badań (np. badanie przepuszczalności jelitowej *in vitro* na CaCo-2, wspólna hodowla CaCo-2 i 3T3-L1 itp.) i możliwych zastosowaniach w medycynie człowieka i sposobach podawania WNKT w leczeniu i/lub profilaktyce stanów zapalnych jelita i tkanki tłuszczowej.
14. Mam nadzieję, że powyższe „nomen-omen” 13 punktów pomoże w szybkim zredagowaniu stosownych publikacji, do czego bardzo zachęcam.

Uogólniając ocenę przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że w oparciu o oryginalną i nowatorską koncepcję i umiejętne dostosowanie trudnego metodycznie i pracochłonnego programu badawczego autorka uzyskała wyniki o oryginalnych wartościach poznawczych, jak również perspektywicznych wartościach publikacyjnych i aplikacyjnych. Merytorycznie rozprawa odpowiada w pełni wymogom stawianym pracom doktorskim.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Anny Zając-Grabiec odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn.zm.) i przedkładam wniosek o dopuszczenie autora rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kateryna Pierzynowska

Dr hab. Kateryna Pierzynowska

Jabłonna, 25 sierpnia 2022 r.