

Łódź, dnia 06.10.2023 r.

dr hab. Michał Bijak, prof. UŁ  
Kierownik Centrum Zapobiegania  
Zagrożeniom Biologicznym

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Justyny Strycharz pt.:**  
**„Modyfikacje epigenetyczne indukowane w wisceralnych adipocytach hodowanych  
w hiperglikemii i wisceralnej tkance tłuszczowej pacjentów z zaburzeniami gospodarki  
węglowodanowej (prediabetes, cukrzyca typu 2)”**

**Promotor pracy – Prof. dr hab. n. med. Janusz Szemraj**

Przedłożona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych jest to cykl tematycznych publikacji naukowych, które zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) w momencie wydania. Są to cztery angielskojęzyczne prace naukowe – dwie prace o charakterze przeglądowym i dwie prace eksperymentalne. W przedstawionych pracach Doktorantka jest pierwszym Autorem. Łączna punktacja opublikowanych prac włączonych w cykl stanowiący podstawę rozprawy doktorskiej wynosi 400 pkt. MNiSW według wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych z dnia 17.07.2023. Łączny współczynnik oddziaływań Impact Factor (wg. wykazu w roku opublikowania) wynosi 20,703. Prace badawcze zostały sfinansowane m.in. ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach

grantu naukowego OPUS 9, którego Kierownikiem jest promotor pracy doktorskiej prof. dr hab. Janusz Szemraj.

Tematyka przedłożonej mi do oceny pracy doktorskiej związania jest z epigenetycznymi podstawami występowania zaburzeń gospodarki węglowodanowej, obserwowanych jako stan przedcukrzycowy (nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG), upośledzona tolerancja glukozy (IGT)) oraz cukrzycy typu 2 (T2DM). Zaburzenia gospodarki węglowodanowej są coraz częstszym problemem zdrowotnym występującym u wszystkich grup społecznych w krajach rozwiniętych gospodarczo. T2DM stanowi szczególne obciążenie dla współczesnego społeczeństwa i objawia się powolnym procesem stopniowej utraty glukozy, pobieranej przez komórki w sposób insulinozależny. T2DM corocznie przyczynia się do śmierci dużego odsetka światowej populacji. Wg Światowej Organizacji Zdrowia liczba diabetyków drastycznie wzrośnie w ciągu najbliższych lat. Szacowania na 2045 r. przewidują zachorowanie aż 800 mln osób.

W ostatnich latach wrasta również liczba osób z otyłością i nadwagą, co w krajach rozwiniętych można już określić zjawiskiem epidemii. W europejskim badaniu MONICA wykazano, że kryterium otyłości osiągnęło aż 22% kobiet i 15% mężczyzn, kryterium nadwagi spełniała zaś ponad połowa ludności Europy. Współzależność pomiędzy otyłością i cukrzycą jest powszechnie znana. Nadal nie znaleziono jednak odpowiedzi na wiele podstawowych pytań - na przykład dlaczego nie wszyscy otyli zapadają na T2DM. Pomimo tych zastrzeżeń coraz powszechniej używa się terminu diabetes od diabetes – cukrzyca i obesity – otyłość, w celu podkreślenia związku pomiędzy tymi dwoma zespołami chorobowymi.

MikroRNA (miRNA) są klasą małych, niekodujących cząsteczek RNA zawierających od 21 do 24 nukleotydów, które w warunkach prawidłowych działają jako ujemne regulatory ekspresji docelowego mRNA na poziomie potranskrypcyjnym. Dojrzałe cząsteczki mikroRNA zachowują się jak potranskrypcyjne regulatory ekspresji genów, dzięki parowaniu zasad z cząsteczkami mRNA. Cząsteczki miRNA hybrydują z kompleksem indukującym wyciszanie RNA (RISC) w regionie 3'-UTR. Regulacja genu przez kompleks RISC odbywa się na drodze połączenia pomiędzy regionem w miRNA (2-7 oraz 8 nukleotydem) a regionem 3'-UTR w mRNA. Istnieje coraz więcej dowodów sugerujących kluczową rolę miRNA w wielu procesach biologicznych takich jak: wzrost komórek, różnicowanie tkankowe,

proliferacja komórek, rozwój zarodkowy czy apoptoza. Częsteczki miRNA odgrywają bardzo ważną rolę również w przekaźnictwie komórkowym. Mutacje miRNA, dysfunkcje czy zaburzenia regulacji miRNA mogą wpływać na rozwój różnych chorób.

Za cel główny realizowanych badań Doktorantka postawiła sobie zbadanie epigenetycznych mechanizmów opartych na zmianach ekspresji cząsteczek miRNA prowadzących do powstania zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Określenie molekularnych mechanizmów epigenetycznych, prowadzących do insulinooporności ze względu na możliwość praktycznego przyszłego klinicznego zastosowania zasługuje na szczególną pochwałę. W opisie pracy Doktorantka przedstawia aż 15 celów pracy, co w mojej opinii jest zbyt dużą liczbą. Dodatkowo, zabrakło w moim odczuciu przedstawienia jednego celu ogólnego pracy doktorskiej.

W wprowadzeniu do pracy Doktorantka opisuje dość ogólnie adipogenezę oraz jej potencjalną zależność od środowiska, w tym stężenia glukozy. W mojej ocenie ten opis powinien być bardziej szczegółowy, jak również wzbogacony rozdziałem na temat miRNA – gdyż zagadnienie to nie jest poruszane w pracach przeglądowych stanowiących podstawę dysertacji. Niemniej jednak, Doktorantka bardzo płynnie porusza się w zagadnieniach związanych z rolą szlaku p53, jak również enzymu sirtuiny 1 w chorobach metabolicznych. Dowodem tego są bardzo wartościowe dla nauki prace przeglądowe włączone w skład rozprawy doktorskiej.

Część doświadczalna przedłożonej pracy doktorskiej obejmuje badania, które przeprowadzone były w warunkach *in vitro* na komórkach ludzkich trzewnych preadipocytów człowieka (HPA-v) hodowanych w warunkach hiperglikemii i w warunkach normoglikemii. Kolejnym materiałem badawczym była biała tkanka tłuszczowa pobrana od pacjentów z T2DM i IFG oraz osób z prawidłowym metabolizmem glukozy przyjętych na Oddział Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej w Centralnym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Na badania została wydana zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Materiał został odpowiednio zabezpieczony przed degradacją cząsteczek miRNA. Bardzo wysoko oceniam kryteria włączenia oraz wykluczenia zastosowane podczas doboru pacjentów do badań.

W części eksperymentalnej Doktorantka bazuje na metodzie łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, dokonując analiz przy użyciu komercyjnych sond hybrydujących typu TaqMan. Jest to najczulsza i najbardziej specyficzna metodyka wykrywania ilości poszczególnych cząsteczek miRNA w materiale biologicznym, stąd jej wybór przez Doktorantkę zasługuje na pochwałę. Podczas swoich badań Doktorantka dokonała najpierw badania przesiewowego przy użyciu komercyjnych zestawów TaqMan® Human MicroRNA Array A + B, które pozwalają na jednoczesną analizę aż 754 transkryptów miRNA w jednej próbce.

Analiza matematyczna wyników ekspresji genów oraz testy statystyczne zostały odpowiednio dobrane i opisane, a cała analiza statystyczna wraz z opisanymi wynikami stanowi bardzo mocną część pracy.

Uzyskane wyniki przedstawiono w formie opisowej w czytelny sposób. Ze względu na obszerność analiz matematycznych przydatne w tym miejscu byłoby podsumowanie w formie tabelarycznej lub graficznej.

Doktorantka wykazała, że warunki hiperglikemii indukują zmianę profilu ekspresji cząsteczek miRNA w adipocytach. Przedstawia Ona także 15 cząsteczek scharakteryzowanych miRNA (miR-376c-3p, miR-140-5p, miR-151a-5p, miR-374b-5p, miR-193b-3p, miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-93-3p, let-7g-5p, miR-193a-5p, miR-26b-5p, miR-29a-3p, miR-93-3p, miR-484), których ekspresja uległa zmianie podczas adipogenezy. W przypadku badań *ex vivo*, Doktorantka wyłoniła również 15 cząsteczek miRNA o zmienionym poziomie ekspresji spośród kobiet z T2DM i IFG, w porównaniu do normalnej glikemii (miR-10a-5p, let-7d-5p, miR-532-5p, miR-127-3p, miR-125b-5p, let-7a-5p, let-7e-5p, miR-199a-3p, miR-365a-3p, miR-99a-5p, miR-100-5p, miR-342-3p, miR-146b-5p, miR-204-5p, miR-409-3p).

Analizy *in silico* wykonane przez Doktorantkę, zarówno w badaniach *in vitro* jak i *ex vivo*, wykazały, że zmienioną ekspresję posiadają cząsteczki miRNA powiązane ze stresem oksydacyjnym, zapaleniem, sygnalizacją insuliny, sygnalizacją p53 i sirtuiny 1, naprawą DNA, metabolizmem lipidów oraz sygnalizacją adipocytokin i cytokin.

Na zakończenie Doktorantka podsumowuje otrzymane wyniki w postaci 7 punktów które konkludują badania, odnosząc się do celów postawionych w pracy doktorskiej.

W mojej ocenie, wyniki otrzymane w ramach przedłożonej mi do oceny pracy doktorskiej mają wysoką wartość merytoryczną i wskazują na udział zmian epigenetycznych na poziomie cząsteczek miRNA w powstawaniu insulinooporności prowadzącej do wystąpienia T2DM. Ma to olbrzymie znaczenie w zrozumieniu zmian zachodzących podczas adipogenezy w warunkach hiperglikemii, która dalej skutkuje nasileniem się objawów i wystąpienia tzw. błędnego koła.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. mgr Justyny Strycharz pt. „Modyfikacje epigenetyczne indukowane w wisceralnych adipocytach hodowanych w hiperglikemii i wisceralnej tkance tłuszczowej pacjentów z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej (prediabetes, cukrzyca typu 2)” posiada dużą wartość poznawczą i bez wątpienia spełnia warunki określone w przepisach wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce art. 179 (Dz. U. 2018, poz. 1669 Ustawa z dnia 3 lipca 2018 r.). W związku z tym, przedkładam Wysokiej Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr Justyny Strycharz do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej. Jednocześnie, mając na uwadze wysoki potencjał poznawczy przedstawionych w pracy wyników, które zostały już opublikowane w czasopiśmie z listy JCR, jak również ich potencjał rozwojowy w dalszych pracach badawczych, wnioskuję o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK  
Centrum Zmagań i Zapobiegania Chorobom Biologicznym  
Wydział Biologii i Oceny Środowiska UL  
  
dr hab. Michał Bijak, prof. UL