

Uniwersytet Rzeszowski
Al. Rejtana 16 C, 35-959 Rzeszów



Instytut Nauk Medycznych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik
Kierownik Zakładu Genetyki Ogólnej
Instytut Nauk Medycznych
Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej
Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 05.11.2023

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Marii Strycharz została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. n. med. Janusza Szemraja w Zakładzie Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Praca doktorska była finansowana ze środków Grantu Narodowego Centrum Nauki przyznanego w konkursie OPUS (UMO-2015/17/B/NZ7/03019) pod tytułem „Rola zmian epigenetycznych i p53 w trzewnej tkance tłuszczowej w patogenezie cukrzycy typu 2” realizowanego w latach 2017-2021. Badania wraz z ich publikacją były współfinansowane przez Polskie Towarzystwo Chorób Metabolicznych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Justyny Marii Strycharz stanowi zbiór czterech powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w latach 2017-2021. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi dwie publikacje oryginalne oraz dwie publikacje przeglądowe. Wszystkie publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w międzynarodowych wysoko punktowanych czasopismach i są opracowaniami zbiorowymi, w których Pani mgr Justyna Maria Strycharz jest pierwszym autorem. Sumaryczny współczynnik oddziaływania - Impact Factor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

wynosi 19,314, a punktacja MEiN wynosi 440 pkt, co należy uznać za imponujący wynik biorąc pod uwagę wczesny etap kariery naukowej Doktorantki.

W rozprawie doktorskiej zawarto również oświadczenia współautorów artykułów wchodzących w skład doktoratu, które wskazują na wiodącą rolę Doktorantki. Udział Doktorantki we wszystkich przedstawionych pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest wysoki. Wkład pracy mgr Strycharz w pracę przeglądową pt. „Is p53 Involved in Tissue-Specific Insulin Resistance Formation?” został określony na 69%, a w drugiej pracy przeglądowej pt. "SIRT1 as a Therapeutic Target in Diabetic Complications" na 60%. Natomiast wkład pracy mgr Strycharz w publikacje oryginalne został określony na 30% dla publikacji pt. „Visceral Adipose Tissue of Prediabetic and Diabetic Females Shares a Set of Similarly Upregulated microRNAs Functionally Annotated to Inflammation, Oxidative Stress and Insulin Signaling” i na 38% dla publikacji pt. „Hyperglycemia Affects miRNAs Expression Pattern during Adipogenesis of Human Visceral Adipocytes—Is Memorization Involved?”.

Tak duży udział Doktorantki w opublikowanych pracach stanowi niezaprzeczalnie podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora na podstawie przedstawionego cyklu prac. Wszystkie publikacje stanowiące rozprawę doktorską mają wysoką wartość merytoryczną i metodyczną. Problem badawczy podjęty przez Doktorantkę jest niezwykle istotny w poznaniu roli mechanizmów epigenetycznych w dysfunkcji tkanki trzewnej i związanej z tym indukcji stanu przedcukrzycowego i cukrzycy typu 2.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu liczącego 121 stron i zawiera następujące rozdziały: źródła finansowania, spis publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, wprowadzenie, cele pracy, materiały i metody, wyniki, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografia, kopie czterech publikacji wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej, oświadczenia współautorów publikacji oraz zgodę Komisji Bioetycznej. Wprowadzenie stanowi analizę aktualnego stanu wiedzy na temat podjętego problemu badawczego uzasadniając celowość prowadzonych badań. W rozdziale tym przedstawiono podstawowe informacje dotyczące adipogenezy, cukrzycy typu 2 oraz roli microRNA, sirtuiny 1 i p53 w patogenezie cukrzycy typu 2. W następnym rozdziale szczegółowe cele pracy zostały precyzyjnie przedstawione w piętnastu punktach i poprawność ich sformułowania nie budzi wątpliwości. Do głównych celów pracy doktorskiej należały:

1. ocena poziomu ekspresji 78 cząsteczek miRNA w trakcie 3-etapowej adipogenezy preadipocytów wisceralnych linii HPA-v (ludzkie trzewne preadipocyty) traktowanych lub nie hiperglikemią chroniczną i przerywaną (14 wariantów hodowlanych p/Ads); 2. ocena poziomu ekspresji 75 cząsteczek miRNA w próbkach VAT (tkanka tłuszczowa trzewna) pobranych od pacjentów (N = 38) ze stanem przedcukrzycowym, cukrzycą typu 2 oraz osób z prawidłową glikemią za pomocą Custom TLDA miRNA Cards i metody qPCR.

W kolejnym rozdziale wyszczególniono zastosowane materiały i metody. W pracy doktorskiej w sposób prawidłowy dobrano metody badawcze. W pracy zastosowano adekwatne dla rozwiązania problemów badawczych analizy statystyczne. Zastosowane metody zapewniły uzyskanie ciekawych i oryginalnych wyników. W kolejnych rozdziałach Doktorantka opisuje uzyskane wyniki badań i formułuje w sposób prawidłowy wnioski w siedmiu punktach. Piśmiennictwo jest właściwie dobrane i jest bezpośrednio związane z tematyką pracy. W tym miejscu należy zauważyć, że w pracy doktorskiej nie zamieszczono spisu treści, nie ponumerowano stron pracy oraz nie przedstawiono w części wstępnej pracy wykazu stosowanych skrótów. Zamieszczenie powyższych elementów pracy ułatwiłyby czytanie i recenzję pracy doktorskiej.

Do pracy załączono kopie czterech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Prace te były szczegółowo recenzowane i nie znajdują w nich błędów merytorycznych. Prace przeglądowe dobrze odzwierciedlają aktualny stan wiedzy na temat roli białka p53 w patomechanizmach indukowanych hiperglikemią w tkankach insulinowrażliwych oraz roli białka Sirt1, jako deacetyazy histonowej i niehistonowej w molekularnych patomechanizmach wywołanych hiperglikemią. W pracy przeglądowej pt. „Is p53 Involved in Tissue -Specific Insulin Resistance Formation?” opublikowanej w *Oxid. Med. Cell. Longev.* w 2017 r. przedstawiono dokładny opis molekularnych zaburzeń związanych z hiperglikemią, stresem oksydacyjnym, odpowiedzią na uszkodzenia DNA (szlak ATM-p53-MDM2), procesem zapalnym oraz roli białka p53, działającego poprzez regulację określonych miRNA, w indukowaniu insulinooporności i patogenezie cukrzycy typu 2. Ponadto, w pracy tej dokładnie opisano rolę p53 w różnicowaniu preadipocytów oraz patomechanizmy działające w hipertroficzej i hiperplastycznej tkance tłuszczowej. Autorka opisała kluczową rolę białka p53 w patomechanizmie insulinooporności w powiązaniu z

czynnikami genetycznymi i epigenetycznymi. Doktorantka opisała również ochronną rolę p53 w otyłości i cukrzycy, co może stanowić podstawę do rozwoju terapii, w tym w powiązaniu z miRNA.

W publikacji przeglądowej pt. „SIRT1 as a Therapeutic Target in Diabetic Complications” opublikowanej w *Curr. Med. Chem.* w 2018 r., szczegółowo opisano rolę Sirt1 w insulinooporności oraz w mikro- i makroangiopatycznych powikłaniach cukrzycowych. W pracy tej Autorka opisała bardzo dokładnie kluczową rolę Sirt1 w powiązaniu z ekspresją miRNA w insulinooporności oraz w promowaniu metabolicznej pamięci komórkowej.

Z obowiązku recenzenta zamieszczam poniżej uwagę dotyczącą zapisywania nazw genów opisanych w opublikowanych oryginalnych artykułach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. A mianowicie, nie zawsze w sposób prawidłowy stosowano się do zasad zapisywania nazw genów, np. cyt: „TP53 gene has been declared the major tumor suppressor gene” lub „...who carry minor alleles of SIRT1 gene”. Prawidłowo, zgodnie z nomenklaturą HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) nazwy genów powinny być zapisywane kursywą. Jednakże, takie drobne błędy nie zmniejszają wysokiego poziomu merytorycznego przedstawionych do oceny publikacji wchodzących w zakres niniejszej pracy doktorskiej.

Wyniki prac oryginalnych składające się na rozprawę doktorską zostały opublikowane w dwóch artykułach w anglojęzycznych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania, co potwierdza ich wartość poznawczą i wysoki poziom naukowy. W publikacjach oryginalnych szczegółowo opisano aspekty merytoryczne, materiał badany, zastosowane metody oraz uzyskane wyniki. Materiał badany stanowiła linia komórkowa HPA-v oraz pobrane od 38 niespokrewnionych osób trzewne tkanki tłuszczowe, w których po izolacji RNA przeprowadzono analizę profilu ekspresji miRNA stosując Custom TLDA miRNA Cards i metodę qPCR. W pracy zastosowano również analizę *in silico* w celu określenia szlaków molekularnych, które mogą być kontrolowane przez badane miRNA.

W publikacji pt. „Hyperglycemia Affects miRNAs Expression Pattern during Adipogenesis of Human Visceral Adipocytes—Is Memorization Involved?” opublikowanej w *Nutrients* w 2018 wybrano za pomocą badań screeningowych 78 najbardziej obiecujących cząsteczek miRNA spośród 754 cząsteczek miRNA

testowanych w preadipocytach i adipocytach wisceralnych traktowanych hiperglikemią i nie traktowanych hiperglikemią. W pracy tej wykazano, że hiperglikemia zarówno chroniczna jak i przerywana wpłynęła na ekspresję miRNA podczas adipogenezy w porównaniu do normoglikemii. Wykazano również, że zmiany wywołane ekspozycją na hiperglikemię podczas jednego etapu adipogenezy przypominały te obserwowane przy przewlekłej hiperglikemii. Z badań tych może wynikać, że miRNA mogą być cząsteczkami uczestniczącymi w zapamiętywaniu efektu zależnego od hiperglikemii w wisceralnych preadipocytach. Ponadto, w pracy tej wyodrębniono 15 cząsteczek 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 warunkach normoglikemii i hiperglikemii oraz w odpowiedzi na jeden lub chroniczny bodziec hiperglikemii na 3 etapach adipogenezy. Określenie poziomów ekspresji 78 cząsteczek miRNA w 14 wariantach komórkowych pozwoliło również na określenie globalnych profilów zmian ekspresji miRNA.

W kolejnej oryginalnej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej pt. „Visceral Adipose Tissue of Prediabetic and Diabetic Females Shares a Set of Similarly Upregulated microRNAs Functionally Annotated to Inflammation, Oxidative Stress and Insulin Signaling” opublikowanej w *Antioxidants* w 2021 roku określono poziom ekspresji 75 cząsteczek miRNA w próbkach trzewnej tkanki tłuszczowej pochodzącej od 38 pacjentów, w tym 26 kobiet. Wstępne wyniki pokazały, że płeć może mieć wpływ na poziom ekspresji miRNA dlatego w dalszych badaniach analizę ekspresji miRNA przeprowadzono u 26 kobiet. W opisie metodyki qPCR wskazano, że za pomocą algorytmu Bestkeeper jako najlepsze endogenne kontrolne wybrano miR-93-5p i miR-17-5p. W tym miejscu należy zauważyć, że w poprzedniej publikacji oryginalnej wykazano, że ekspresja miR-93-5p uległa zmianie podczas adipogenezy. Zatem nasuwa się następujące pytanie do Doktorantki: dlaczego wybrano miR-93-5p jako endogenną kontrolę skoro wykazano we wcześniejszej pracy, że jego poziom nie jest stabilny w badanych preadipocytach i adipocytach wisceralnych? Uważam, że w pracy warto byłoby zamieścić więcej informacji na temat sposobu wyboru endogennych kontroli.

W omawianej powyżej pracy oryginalnej wyodrębniono 15 cząsteczek miRNA (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), których ekspresja różniła się pomiędzy grupami: z prawidłową glikemią, cukrzycą typu 2 i z nieprawidłową glikemią na czczo. Ponadto, w pracy tej wykazano że, ekspresja większości znacząco zmienionych miRNA była podobnie podwyższona w próbkach trzewnej tkanki tłuszczowej kobiet z cukrzycą typu 2 i z nieprawidłową glikemią na czczo w porównaniu z pacjentkami z prawidłową glikemią, w tym dodatnio skorelowana z poziomem glukozy na czczo i HbA1c. Analizy *in silico* przeprowadzone zarówno w badaniach na linii komórkowej HPA-v jak i trzewnych tkankach tłuszczowych wykazały, że istotnie zmienione miRNA wydają się być powiązane ze stresem oksydacyjnym, zapaleniem, sygnalizacją insuliny, sygnalizacją p53 i sirtuiny 1, naprawą DNA, metabolizmem lipidów oraz sygnalizacją adipocytokin i cytokin. Moim zdaniem tak ciekawe i oryginalne obserwacje mogą stanowić obiecujący wstęp do dalszych badań, mają też potencjał aplikacyjny jako potencjalne nowe narzędzia diagnostyczne i terapeutyczne.

W obu załączonych publikacjach oryginalnych dyskusja została napisana w sposób rzeczowy i wnikliwy. Dyskusja w pełni ukazuje bardzo dobre zorientowanie Doktorantki w aktualnej literaturze dotyczącej problemu badawczego. Na podstawie uzyskanych wyników prawidłowo sformułowano wnioski końcowe.

Podsumowując, zaprezentowana praca doktorska z załączonym cyklem publikacji posiada bardzo wysoką wartość merytoryczną i metodyczną, co jest właściwe dla przeprowadzenia postępowania doktorskiego.

Wnioski Końcowe

Prezentowana praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autorki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego. Wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i prezentuje doskonałą wiedzę teoretyczną Doktorantki we wskazanej dyscyplinie naukowej oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska pt. „Modyfikacje epigenetyczne indukowane w wisceralnych adipocytach hodowanych w hiperglikemii i wisceralnej tkance tłuszczowej pacjentów z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej (prediabetes, cukrzyca typu 2)” w pełni spełnia

warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021 poz. 478 ze zm). Wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Justyny Marii Strycharz do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą i aplikacyjną prowadzonych badań pragnę przedłożyć wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik

Handwritten signature of Izabela Zawlik in blue ink.