

Dr hab. Michał Arabski, prof. UJK  
tel. 041 349 63 31  
email: [arabski@ujk.edu.pl](mailto:arabski@ujk.edu.pl)

ZAKŁAD BIOLOGII MEDYCZNEJ  
[www.biologia.ujk.edu.pl](http://www.biologia.ujk.edu.pl)  
INSTYTUT BIOLOGII  
WYDZIAŁ NAUK ŚCISŁYCH I PRZYRODNICZYCH  
UNIwersYTET JANA KOCHANOWSKIEGO  
W KIELCACH



Kielce, 24.07.2024

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Doroty Bewicz-Binkowskiej

### *Wpływ nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych na ekspresję FADS2 w astrocytach*

Badania nad regulacją i modulacją ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych stanowią istotny wkład w zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw chorób o zasięgu globalnym. Nawiązując do tematyki pracy szczególnie interesujące wydają się być zagadnienia związane m.in. z metabolizmem kwasu arachidonowego, który odgrywa kluczową rolę w biologii układu krążenia, kancerogenezie oraz szeregu chorób u podłoża których leży proces zapalny m.in. astma czy zapalenie stawów. Rozważając w szerokim kontekście tematykę badań zrealizowanych w ramach pracy i przedstawiony powyżej przykład, stanowią one wkład w wiedzę o charakterze podstawowym, co pozwala w przyszłości na realizację zagadnień o charakterze klinicznym np. badania bioaktywnych mediatorów jako celów w profilaktyce i leczeniu chorób sercowo-naczyniowych, progresji nowotworu czy też schorzeń związanych ze stanem zapalnym. Celem pracy było określenie wpływu nasyconego kwasu palmitynowego oraz dwóch nienasyconych kwasów tłuszczowych tj.  $\alpha$ -linolenowego i dokozaheksaenowego na ekspresję genu FADS2 w pierwszorzędowych astrocytach, izolowanych z kory mózgowej osesków szczura (zgoda Komisji Etycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi). Cel ten został jasno sformułowany i osiągnięty w trakcie realizacji części praktycznej rozprawy. Dotyczy on regulacji ekspresji genu FADS2 należącego obok FADS1 i FADS3 do rodziny kodującej desaturazy kwasów tłuszczowych katalizujące biosyntezę nienasyconych kwasów tłuszczowych  $\Delta 6$ ,  $\Delta 8$  i  $\Delta 4$ .

Ponadto biorąc pod uwagę iż istotnym regulatorem transkrypcji desaturaz są receptory PPAR, które wraz z receptorami jądrowymi RXR tworzą heterodimer z ligandem w postaci witaminy A, poddano analizie jej modulatorowym efekt na ekspresję *FADS2*.

Praca doktorska Pani mgr Doroty Bewicz-Binkowskiej stanowiąca podstawę do nadania stopnia doktora została wykonana w Zakładzie Interakcji Międzykomórkowych Katedry Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem dr hab. n med. Anny Walczewskiej, a wyniki uzyskane w ramach jej realizacji zostały opublikowane w pracach:

- Bewicz-Binkowska D, Zgorzyska E, Dziedzic B, Walczewska A. Docosahexaenoic Acid (DHA) Inhibits *FADS2* Expression in Astrocytes but Increases Survival of Neurons Co-cultured with DHA-enriched Astrocytes. *Int J Mol Cell Med*. 2019 Summer;8(3):232-240. doi: 10.22088/IJMCM.BUMS.8.3.232. PMID: 32489952; PMCID: PMC7241842.
- Dziedzic B, Bewicz-Binkowska D, Zgorzyska E, Stulczewski D, Wieteska L, Kaza B, Walczewska A. DHA upregulates *FADS2* expression in primary cortical astrocytes exposed to vitamin A. *Physiol Res*. 2018 Aug 16;67(4):663-668. doi: 10.33549/physiolres.933708. Epub 2018 May 10. PMID: 29750879.

Rozprawa doktorska ma strukturę charakterystyczną dla prac doświadczalnych i jako całość świadczy o wiedzy teoretycznej Pani mgr Doroty Bewicz-Binkowskiej z zakresu poruszanej tematyki oraz umiejętności pracy laboratoryjnej z zastosowanie różnych technik analitycznych z zakresu biochemii (Western blot, MTT, hodowle komórkowe *in vitro*), genetyki (RT-PCR) oraz chemii (GC-MS). W dalszej części recenzji odniosę się do poszczególnych jej części.

Rozdział WSTĘP stanowi wprowadzenie teoretyczne, adekwatne i zgodne z tematyką badawczą realizowaną w ramach pracy. Doktorantka przedstawia prawidłowo charakterystykę lipidów błonowych w mózgu, z ich klasyfikacją i możliwym transportem. Następnie w sposób uporządkowany omawia biosyntezę kw. tłuszczowych *de novo* z podziałem na kw. nasycone, jedno- i wielonienasycone. Rozdział ten Doktorantka kończy opisem budową genu i regulacją aktywności desaturaz *FADS* z uwzględnieniem ich ekspresji modulowane retinodami. Tematyka poruszana w powyższym opisie i jej zakres stanowi uzasadnienie podjętego tematu w ramach rozprawy. Sądzę, że ciekawym podrozdziałem w ramach WSTĘPU byłby związany z zaburzeniami ekspresji, zwłaszcza *FADS2*, w tym jego wyciszenie w kontekście patomechanizmów prowadzących do chorób. W tym punkcie recenzji mam więc pytanie do

Doktorantki na podstawie danych literaturowych o przykłady schorzeń w których istotne znaczenie może mieć wyciszenie genów z rodziny FADS.

Rozdział MATERIAŁY zawiera informację na temat odczynników i laboratoryjnych materiałów eksploatacyjnych, jednak lista firm określająca ich pochodzenie nie jest kompletna. W rozdziale METODY Doktorantka opisała szczegółowo protokoły badań na poszczególnych etapach z podziałem na zastosowane, co istotne, zróżnicowane metody badawcze tj. izolacja, hodowla i charakterystyka jednorodności astrocytów, analiza cytotoksyczności DHA, ALA i PA z zastosowaniem testu MTT, oznaczanie zawartości białek metodą Lowry'ego, elektroforeza SDS-PAGE i Western blot, oznaczanie zawartości kw. tłuszczowych w błonach astrocytów metodą GC-MS oraz ekspresji *FADS2* z zastosowaniem ilościowego PCR z odwrotną transkrypcją. Opis metod umożliwi ich odtworzenie. Do tej części pracy mam jedynie pytanie uszczegóławiające tj. jaką zastosowano metodę wzorca wewnętrznego w technice GC-MS.

W rozdziale WYNIKI przedstawiono w sposób przejrzystym dane co do formy graficznej jak i ich opisu, wykazujące dodatni efekt nasyconych kwasów tłuszczowych na ekspresję i produkcję desaturazy *FADS2*, co powoduje zwiększoną zawartość AA w błonach komórkowych astrocytów, w przeciwieństwie do DHA i EPA n-3. Ponadto, DHA hamując ekspresję *FADS2* zmienił profil błonowych kwasów tłuszczowych, natomiast jego ekspresja uległa wzmocnieniu przez DHA jedynie po aktywacji receptorów retinoidowych. Do tej części rozprawy mam pytanie jakie było odchylenie standardowe w przypadku testu MTT. Sądzę, że można było również oprócz analizy densytometrycznej za pomocą oprogramowania imageJ umieścić w pracy zdjęcie membrany nitrocelulozowej, jak również dane/wykresy wymagane do obliczeń względnej ekspresji w ramach metody RT-PCR. W opisie rycin w ramach rozdziału WYNIKI powinny być informacje na temat zastosowanej metody, co czytelnik domyśla się analizując dane.

Rozdział DYSKUSJA I WNIOSKI ma charakter skrótowy i odnosi się przede wszystkim do opisu ciekawych wniosków uzyskanych w pracy z odniesieniem do danych literaturowych dotyczących efektu poszczególnych, analizowanych w pracy kwasów tłuszczowych DHA, ALA i PA na ekspresję *FADS2*, w tym modulowanej retinolem. Doktorantka prawidłowo przytacza adekwatne do zagadnienia odnośniki literaturowe. Do tej części pracy mam prośbę o rozwinięcie interpretacji danych wskazanych w tym rozdziale na podstawie cytowanych danych literaturowych tj. jak zmiana profilu kwasów tłuszczowych wywołana przez DHA w wyniku zahamowania aktywności *FADS2* wpływa na działanie przeciwzapalne i

przeżywalność komórek. Proszę o próbę wyjaśnienia/hipotezy zwiększonej zawartości AA w błonach pomimo braku efektu ALA na ekspresję FADS2 na poziomie RNA i białka oraz potencjalnego kierunku badań związanych z efektem witaminy A analizowanym w pracy.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Doroty Bewicz-Binkowskiej pt. *Wpływ nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych na ekspresję FADS2 w astrocytach* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi posiadania wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki medycznej oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, spełniając w pełni formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) i wnoszę do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani Doroty Bewicz-Binkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
Prof. hab. Michał Arabski  
Uniwersytet Jana Kochanowskiego  
w Kielcach