



UNIwersytet Jagielloński

COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ LEKARSKI
KATEDRA FIZJOLOGII

31-531 Kraków, ul. Grzegorzewska 16
tel.: (0-12) 421 10 06, fax (0-12) 421 15 78

Kraków, dnia 1 lipca 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Wołosowicz pt.:

„Wpływ N-acetylocysteiny lub kwasu alfa-liponowego na ekspresję białkowych transporterów kwasów tłuszczowych oraz metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w trzewnej i podskórnej tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową”

Metabolizm tlenowy jest podstawowym sposobem dostarczania energii w organizmie ludzkim. Polega on na utlenianiu substancji odżywczych, któremu towarzyszy wyzwolenie dużej ilości energii. Efektem ubocznym tego zjawiska jest powstawanie wolnych rodników tlenowych, posiadających elektron bez pary. Charakteryzują się one wysoką reaktywnością chemiczną, gdyż elektrony dążą do połączenia się w pary i mogą tworzyć wiązania chemiczne z cząsteczkami pełniącymi ważną rolę metaboliczną i w ten sposób inaktywować je. Dlatego też tak istotną rolę odgrywają zmiatacze wolnych rodników, odpowiedzialne za unieszkodliwianie tych niebezpiecznych cząstek. W kluczowej kaskadzie zmiatania wolnych rodników tlenowych ważną rolę odgrywa zredukowana postać glutationu. Istotnym jest więc utrzymanie prawidłowej ilości tej formy glutationu, czemu służy właściwa podaż N-acetylocysteiny, będącej jego prekursorem. N-acetylocysteina wykazuje efekt antyoksydacyjny na drodze pośredniej i bezpośredniej. Pośrednia droga polega na tym, iż zabezpiecza odpowiedni poziom zredukowanego glutationu. Ze względu na swoją budowę chemiczną może także, na drodze bezpośredniej neutralizować reaktywne formy tlenu.

W celu zapewnienia odpowiedniej ilości energii potrzebna jest także podaż właściwej ilości substratów energetycznych przez przewód pokarmowy. Jeśli bilans dostarczania substratów energetycznych jest pozytywny, tzn. podaż przewyższa zapotrzebowanie, wówczas odkładane są one w postaci tkanki tłuszczowej stanowiącej rezerwę energetyczną. Badania ostatnich lat wykazały, że tkanka tłuszczowa jest nie tylko rezerwuarem substancji zapasowych, ale jest również aktywna metabolicznie. Przejawia się to, między innymi, w indukowaniu stanu zapalnego. W mechanizmach stanu zapalnego istotną rolę odgrywają procesy wolnorodnikowe, a to, jak wykazano powyżej, stanowi zagrożenie metaboliczne. W procesach metabolizmu energetycznego tłuszczów ważną rolę odgrywa kwas liponowy, który posiada również właściwości zmiatacza wolnych rodników tlenowych. Jest to cecha wspólna N-acetylocysteiny i kwasu liponowego. Uzasadnia to wybór Doktorantki, która postanowiła zgłębić rolę tych 2 substancji w przemianach biochemicznych i zmianach histologicznych zachodzących w tkance tłuszczowej.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Marty Wołosowicz pt. „Wpływ N-acetylocysteiny lub kwasu alfa-liponowego na ekspresję białkowych transporterów kwasów tłuszczowych oraz metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w trzewnej i podskórnej tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową” bazuje na 3 pracach:

1. **Wołosowicz M**, Łukaszuk B, Chabowski A: *The causes of insulin resistance in type 1 diabetes mellitus: is there a place for quaternary prevention*. International Journal of Environmental Research and Public Health 2020, 17(22):8651. doi: 10.3390/ijerph17228651. IF=3,390; MEiN = 140
2. **Wołosowicz M**, Dajnowicz – Brzezik P, Łukaszuk B, Żebrowska E, Maciejczyk M, Zalewska A, Kasacka I, Chabowski A: *Diverse impact of N-acetylcysteine or alpha-lipoic acid supplementation during high-fat diet regime on fatty acid transporters in visceral and subcutaneous adipose tissue*. Advances in Medical Sciences 2022, 67(2), 216 – 228. IF=3,287; MEiN=100
3. **Wołosowicz M**, Łukaszuk B, Kasacka I, Chabowski A: *Diverse impact of N-acetylcysteine or alpha-lipoic acid supplementation during high-fat diet regime on matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in visceral and subcutaneous adipose tissue*. Cellular Physiology and Biochemistry 2022, 56, 166 – 179. IF=5,141; MEiN = 140

Na podkreślenie zasługuje tu fakt, że wszystkie artykuły zostały opublikowane w czasopiśmie posiadających wysoki Impact Factor: pomiędzy 3,287 a 5,141, wysoką punktacją Ministerstwa (100 i 140) oraz to, że we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszą autorką. Sumaryczna wartość Impact Factor wynosi 11,818, jak na prace doktorskie jest to wynik bardzo wysoki.

Za cel pracy doktorskiej, Doktorantka postawiła sobie zbadanie wpływu N-acetylocysteiny i kwasu alfa-liponowego na szeroki panel parametrów patogenetycznych związanych z otyłością. Są to zarówno parametry analityczne, jak osoczowe stężenie glukozy, insuliny, a ponadto różnych postaci kwasów tłuszczowych, jak również histologiczne, dotyczące zmian w budowie mikroskopowej tkanki tłuszczowej. Oprócz tego dokonane zostały badania na poziomie biologii molekularnej, w szczególności ekspresji genów dla transporterów kwasów tłuszczowych, jak i dla metaloproteinaz. Wyniki te mają dużą wartość poznawczą, ze względu na ich wielopłaszczyznowość, dają bogaty obraz procesów zachodzących w tkance tłuszczowej na różnych poziomach jej organizacji.

Rozważania pracy doktorskiej poprzedzone są krótką charakterystyką naukową Doktorantki, na którą składają się dane o jej wykształceniu, publikacjach naukowych, konferencjach naukowych, udziału w projektach naukowych, szkoleniach i stażach naukowych. Zwraca tu uwagę duża aktywność naukowa Doktorantki, przejawiająca się w uczestnictwie w licznych szkoleniach naukowych oraz odbyciem staży naukowych. Warto również podkreślić aktywność Doktorantki na konferencjach naukowych, która stanowi ważny aspekt w kształceniu młodych kadr naukowych, dając możliwość zaprezentowania wyników swoich badań, a także doskonalenia umiejętności wystąpień publicznych.

Kolejno, Doktorantka wprowadza spis używanych w swojej pracy skrótów. Należy podkreślić sumienność Doktoranta w tym zakresie, ponieważ wyjaśnia wszystkie używane przez siebie skróty. Drobne uwagi dotyczą 2 kwestii: 1) na str. 13 pojawia się wyjaśnienie: „Fig. – figura”; słowo „figura” ma w języku polskim wiele znaczeń, głównie to „rzeźba przedstawiająca postać ludzką (posąg)”, należałoby się raczej odwołać do języka angielskiego „Fig. – figure – ilustracja, rycina, rysunek”; 2) brak wyjaśnienia pojawiającego się później w tekście skrótu ELISA, czyli „ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay – test immunoenzymatyczny).

We wstępie Doktorantka dokładnie opisuje strukturę i funkcje badanych czynników regulujących funkcjonowanie tkanki tłuszczowej, tj. transporterów kwasów tłuszczowych, metaloproteinaz, budowę histologiczną tkanki tłuszczowej i jej aktywność związaną z

produkcją specyficznych hormonów, jak i mediatorów stanu zapalnego oraz generowanego w niej stresu oksydacyjnego. Opis ten jest dokładny i klarowny, w sposób systematyczny przedstawia zagadnienia. Pewien niedosyt pozostawia brak rycin z chemicznymi wzorami strukturalnymi N-acetylocysteiny i kwasu alfa-liponowego, które to substancje figurują w tytule rozprawy doktorskiej. W przypadku kwasu alfa-liponowego przydałaby się również oficjalna nazwa chemiczna, ponieważ używana nazwa jest nazwą zwyczajową. Jak w przypadku N-acetylocysteiny, z nazwy możemy wnioskować o jej budowie (aminokwas cysteina z przyłączoną grupą octową do końca aminowego), tak nazwa kwas liponowy, nie daje nam wyobrażenia do jakiego szeregu homologicznego kwasów karboksylowych należy ten kwas. Natomiast jego nazwa oficjalna – kwas ditiooktanowy – pozwala dostrzec podobieństwo tych 2 substancji (tj. N-acetylocysteiny i kwasu liponowego), przejawiające się obecnością grup tiolowych (czyli grup sulfhydrylowych –SH), które uzasadniają ich chemiczne właściwości zmiatacza wolnych rodników tlenowych.

Założenia i cele pracy przedstawione są w sposób jasny i logiczny. W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka w sposób dokładny opisuje podział zwierząt laboratoryjnych na grupy, zastosowane procedury badawcze i metody oznaczeń badanych parametrów. Pojawia się tu jednak pytanie skąd wiadomo, że zastosowano dawki optymalne. Na str. 22, Doktorantka stwierdza: „Zostały podane dawki 500 mg/kg masy ciała NAC i 30 mg/kg masy ciała ALA, ponieważ są to najczęściej stosowane, nietoksyczne dawki o udowodnionym działaniu antyoksydacyjnym”. Brakuje jednak cytowań do prac potwierdzających to twierdzenie (spodziewać się tu należy cytowania nawet kilku prac, skoro są to dawki najczęściej stosowane i o udowodnionym działaniu). Na str.26 Doktorantka opisując metodykę metody Western Blot pisze o użyciu odtłuszczonego mleka w proszku, nie wyjaśnia jednak w jakim celu się je stosuje. Takie wyjaśnienie podniosłoby walor edukacyjny pracy, gdyż nie każdy jej czytelnik jest znawcą biologii molekularnej i nie rozumie przyczyn użycia w laboratorium składnika, który kojarzy mu się tylko z kuchnią.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka precyzyjnie opisuje zmiany badanych parametrów. Uwagę zwraca jednak fakt, że omówienie wyników podawane jest bez ich dyskusji. Niezbędnym elementem pracy doktorskiej jest interpretacja wyników, komentarz ich dotyczący i porównanie z wynikami badań innych autorów. Usprawiedliwieniem dla Doktorantki jest używanie odnośników do dyskusji w pracach oryginalnych, na których bazuje rozprawa doktorska. Jednakże wartość i przejrzystość rozprawy wzrosłaby, gdyby zawierała ona najważniejsze elementy dyskusji przy omówieniu wyników.

We wnioskach, Doktorantka stwierdza, korzystne efekty działania N-acetylocysteiny i kwasu alfa-liponowego w modelu zwierzęcym otyłości, redukujące stres oksydacyjny i wewnątrztkankowy proces zapalny, a także niekorzystną przebudowę tkanki tłuszczowej przy zastosowaniu diety bogato tłuszczowej i ekspresję transporterów kwasów tłuszczowych.

Oceniana praca doktorska podejmuje istotny problem kliniczny jakim jest otyłość związana ze stosowaniem diety wysokotłuszczowej i powiązane z tym zmiany metaboliczne oraz strukturalne tkanki tłuszczowej wpływające negatywnie na prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Można stwierdzić, że przedstawione wyniki mogą być inspirujące dla opracowania nowych skuteczniejszych metod terapeutycznych oraz profilaktyki patologii związanych z otyłością u człowieka. Praca zawiera zwięzłe i przejrzyste omówienie artykułów na nią się składających, a także oświadczenia zgody wszystkich współautorów artykułów i zgodę Komisji Bioetycznej na przeprowadzenia badań na zwierzętach.

Praca ta zawiera niewielką liczbę drobnych błędów redakcyjnych:

Str. 16: jest: „kompensacyjna ochrona przez metabolicznymi konsekwencjami”; powinno być: „kompensacyjna ochrona przed metabolicznymi konsekwencjami”

Str. 17: jest: „tkanka tłuszczowa magazynując nadmiar”; powinno być: „tkanka tłuszczowa magazynuje nadmiar” / jest: „poprzez żyłę wrtoną”; powinno być: „poprzez żyłę wrotną” / jest: „z kolei” / powinno być: „z kolei”

Str. 18: jest: „obniżenie aktywacji 3-kinaza”; powinno być: „obniżenie aktywacji 3-kinazy”

Str. 79: jest: „trzewną”; powinno być: „trzewną”

Str.81: jest: „MRNA”; powinno być: „mRNA”

Podsumowując, należy stwierdzić, że oceniana praca doktorska podejmuje istotny problem kliniczny jakim jest dieta bogato tłuszczowa, otyłość i zmiany patologiczne z nią związane. Pod względem merytorycznym pracę cechuje trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność. Rozprawa jest poprawna pod względem formalno-językowym, stylistycznym i interpunkcyjnym. Pod względem metodologicznym należy wysoko ocenić wybór literatury i umiejętność korzystania ze źródeł. Rozprawę charakteryzuje poprawność formułowania problemów i hipotez oraz trafność doboru metod i narzędzi badawczych oraz umiejętność ich zastosowania. Praca doktorska ma prawidłowy układ i strukturę podziału

treści. Uwagi przedstawione w recenzji mają charakter uzupełnienia i drobnej korekty, nie wpływając na pozytywną ocenę całości.

W końcowej ocenie, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny **praca doktorska mgr Marty Wołosowicz pt.: „Wpływ N-acetylocysteiny lub kwasu alfa-liponowego na ekspresję białkowych transporterów kwasów tłuszczowych oraz metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w trzewnej i podskórnej tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową”** spełnia wszystkie wymagania stawiane przez procedurę przewodu doktorskiego i zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Marty Wołosowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra Fizjologii UJ CM
Zakład Fizjologii Doświadczalnej



prof. dr hab. n. med. Sławomir Kwiecień