

Prof. dr hab. n. med. Sylwia Małgorzewicz  
Zakład Żywienia Klinicznego i Dietetyki  
Katedra Żywienia Klinicznego  
Wydział Nauk o Zdrowiu  
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, dn. 14.07.2023

### **Recenzja pracy doktorskiej**

**mgr. Damiana Pogodzińskiego pt. *Ocena wpływu zmienności SNP genu desaturazy stearoilo-CoA (SCD) jądrowego DNA i genu MT-ATP6 mitochondrialnego DNA na zmienność fenotypową tkanki tłuszczowej podskórnej oraz trzewnej.***

Otyłość jest chorobą przewlekłą, która jest przyczyną wielu zaburzeń metabolicznych tj. insulinooporność, zaburzenia gospodarki węglowodanowej i lipidowej oraz chorób towarzyszących, m.in. nadciśnienia tętniczego, cukrzycy typu 2, dny moczanowej, kamicy żółciowej, miażdżycy i jej powikłań, oraz niektórych nowotworów. Otyłość stanowi ogromny problem zdrowotny, a jej leczenie jest nadal wyzwaniem, mimo wprowadzenia nowych leków, które uzupełniają terapię nefarmakologiczną. Przyczyn otyłości możemy szukać wśród czynników środowiskowych, psychologicznych, metabolicznych i genetycznych. Badania w zakresie podłoża genetycznego otyłości pierwotnej, mogą w przyszłości doprowadzić do odkrycia nowych leków.

Celem badań mgr. Pogodzińskiego było szacowanie zmienności genu MT-ATP6 mtDNA oraz występowania alleli SNP rs7849 w zależności od fenotypu otyłości oraz dodatkowo zbadanie związku pomiędzy obecnością allelu C w SNP rs7849 na gospodarce węglowodanową i lipidową.

Praca ma typowy układ dla pracy doktorskiej, składa się z pięciu rozdziałów, piśmiennictwa, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu tabel, schematów i wykresów.

We wstępie Doktorant przedstawia podstawy teoretyczne dotyczące otyłości począwszy od definicji, poprzez przyczyny i konsekwencje tej choroby. Szczególnie ważny jest rozdział wstępu dotyczący podłoża genetycznego otyłości pierwotnej i fenotypowych typów otyłości, który stanowi podstawę do podjęcia badań w tym temacie.

Wstęp jest dobrym wprowadzeniem do celu pracy. Mgr. Damian Pogodziński podjął się, oceny zmienności genu MT-ATP6 mtDNA oraz występowania alleli SNP rs7849 w grupie osób z otyłością (BMI>30) oraz z w grupie kontrolnej (BMI w normie).

Doktorant przeprowadził badanie wśród 116 pacjentów z otyłością oraz z prawidłową masą ciała. Badanie miło charakter obserwacyjny. Kryteriami wyłączenia z badania były: otyłość wtórna, cukrzyca typu 1 i 2, zaostrzenie choroby wieńcowej, zaburzenia endokrynologiczne, zaburzenia łaknienia, ciąża i laktacja, stosowanie antykoncepcji hormonalnej lub hormonalnej terapii zastępczej, steroidoterapii, terapii antyretrowirusowej, wcześniejsze chirurgiczne lub farmakologiczne leczenie otyłości oraz obecność rozrusznika serca. Doktorant przeprowadził badania antropometryczne, ocenę składu ciała za pomocą bioimpedancji elektrycznej. W celu określenia fenotypu TOFI (*thin outside fat inside*; chudy na zewnątrz, otyły w środku) rozkładu tkanki tłuszczowej w jamie brzusznej wykorzystał wskaźnik VAT/SAT. Na podstawie obliczonego wskaźnika kwalifikował również pacjentów do fenotypu FOTI (*fat outside thin inside*; otyły na zewnątrz chudy w środku).

Ponadto wykonał badania biochemiczne tj. stężenie glukozy, insuliny, cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL i HDL, triglicerydów.

W celu zbadania sekwencji genu SCD oraz MT-ATP6 pobierał wymaz z jamy ustnej (policzki i podniebienie) sterylnym zestawem wymazowym (firmy SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Niemcy). Do izolacji DNA z wymazów z jamy ustnej wykorzystał odczynniki z zestawu Swab DNA Isolation Kit firmy A&A Biotechnology. Następnie za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy PCR określano zmienność genów MT-ATP6 oraz SCD. Całość prac laboratoryjnych wykonano w Zakładzie Higieny, Epidemiologii i Ergonomii, a następnie próbki wysłano do firmy MacroGen Europe w Holandii w celu sekwencjonowania metodą Sanger.

Podstawowa analiza statystyczna wykonana była przy wykorzystaniu programu Statistica 13.3. Program DnaSP6 (Barcelona, Hiszpania) wykorzystano do określenia liczby haplotypów genu MT-ATP6 występujących wśród pacjentów. Program Arlequin 3.5 (Berno, Szwajcaria) posłużył do obliczenia podstawowych parametrów opisujących zmienność mtDNA, takich jak: liczba haplotypów ( $N_h$ ), różnorodność haplotypów ( $h$ ), różnorodność nukleotydów ( $\pi$ ). Program MEGA11 (Pensylwania, USA) został wykorzystany do narysowania sieci haplotypów, a drzewo filogenetyczne skonstruowano metodą łączenia sąsiadów (NJ) w oparciu o oprogramowanie MT-ATP6 mtDNA Genepop v4.0 (Montpellier, Francja), które zostało użyte do obliczenia wartości FST między haplotypami w oparciu o zmienność mtDNA MT-ATP6.

Doktorant uzyskane wyniki przedstawił w sposób przejrzysty. Po odczytaniu sekwencji genu mtDNA MT-ATP6 ze wszystkich próbek wyróżniono 52 haplotypy. Najczęstszym był haplotyp H1, który był reprezentowany u 42 uczestników (29 z otyłością i 13 z prawidłową masą ciała). Drugim najczęstszym haplotypem był H6, reprezentowany u 13 uczestników (8 z otyłością i 5 z prawidłową masą ciała). Liczba haplotypów mtDNA MT-ATP6 w obu grupach była zróżnicowana, a każda grupa posiadała haplotypy charakterystyczne tylko dla niej. W grupie badanej były to haplotypy H3-H5, H7-H13 i H15-H31. W grupie kontrolnej były to haplotypy H33-H52. Wartości wariancji genetycznej  $F_{st}$  obliczone z obserwowanej zmienności MT-ATP6 nie były wysokie (0,0046), co w skali Wrighta wskazuje na bardzo niską zmienność genetyczną między grupami. Pomimo niskich wartości  $F_{st}$ , w sieci haplotypowej obserwowano nawet do 102 mutacji, a głównymi haplotypami były wcześniej wspomniane H1 i H6.

W obu grupach większość pacjentów reprezentowało fenotyp TOFI, zdecydowanie mniej fenotyp FOTI.

Wśród pacjentów wykryto SNP rs7849 w genie SCD. Heterozygotyczność obserwowana dla homozygot TT wyniosła 0,681034483, a spodziewana 0,68489893, dla heterozygot TC heterozygotyczność obserwowana wyniosła 0,293103448, a spodziewana 0,299643282, natomiast dla homozygot CC heterozygotyczność obserwowana wyniosła 0,034482759 a spodziewana 0,032773484. We wszystkich przypadkach różnice nie były istotne statystycznie. Pacjentów heterozygotycznych – TC – zaobserwowano w obu grupach, natomiast pacjenci homozygotyczni CC występowały tylko w grupie kontrolnej (z prawidłową masą ciała). Zarówno wśród heterozygot jak i homozygot CC

stwierdzono niższe mediany wskaźnika HOMA-IR oraz niższe mediany stężeń: glukozy, insuliny, cholesterolu całkowitego, frakcji LDL cholesterolu i triglicerydów, a mediana stężeń frakcji HDL cholesterolu była istotnie wyższa.

Dyskusja uzyskanych wyników przeprowadzona została rzeczowo, w oparciu o dobrą znajomość literatury. Doktorant podkreślił w dyskusji - w odniesieniu do literatury - zainteresowanie zależnościami genu MT-ATP6 mtDNA z fenotypami rozmieszczenia tkanki tłuszczowej brzusznej (TOFI, FOTI). Występowanie fenotypu TOFI w otyłości wiąże się ze zmniejszoną wydolnością fizyczną i niższą wrażliwością na insulinę oraz zwiększoną aterogennością profilu lipidowego i wyższym ryzykiem wystąpienia niealkoholowego stłuszczenia wątroby. Doktorant zwrócił uwagę, że fenotyp TOFI może również występować u osób z prawidłową masą ciała i wówczas predysponuje do rozwoju zespołu metabolicznej otyłości z prawidłową masą ciała (MONW), co prowadzi do rozwoju zaburzeń metabolicznych, typowych dla otyłości, takich jak: insulinooporność, wysokie stężenie triglicerydów i niskie – frakcji HDL cholesterolu oraz podwyższonego poziomu biomarkerów zapalnych, a także do wystąpienia chorób, rozwijających się na podłożu tych zaburzeń. Drugi fenotyp otyłości FOTI wiąże się z nadmierną masą ciała u pacjenta, pomimo której nie występują zaburzenia metaboliczne.

Ponadto, Doktorant zwrócił uwagę, że zaburzenia i choroby metaboliczne u osób z TOFI nie są uwarunkowane jedynie przez czynniki związane z tym fenotypem otyłości, ale są także następstwem nieprawidłowego sposobu żywienia oraz niewłaściwego stylu życia.

Na podstawie literatury przedstawił również inne – niebadane przez Doktoranta fenotypy otyłości oraz metody ich określenia.

Ciekawym spostrzeżeniem Doktoranta jest fakt, że brak różnic w mtDNA, może wskazywać, że populacja ludzka jest podatna na występowanie otyłości. Część osób jednak może prezentować korzystny profil, najprawdopodobniej pokrywający się z fenotypem FOTI. Doktorant na podstawie literatury i wyników własnych przypuszcza, że wprowadzenie haplotypów czy przynależności do linii ewolucyjnej jako markerów predyspozycji do występowania otyłości oraz określenie fenotypów TOFI lub FOTI, pozwoliłoby na wprowadzenie odpowiedniej profilaktyki otyłości.

Doktorant zbadał występowanie alleli w SNP rs7849 u osób prezentujących różne kategorie BMI, stwierdził, że we fragmencie genu SCD zawierającego SNP rs7849, najczęściej było homozygot TT (u 81,3% osób z otyłością i u 44% osób z prawidłową masą ciała). Natomiast homozygoty CC występowały jedynie u 7% osób grupy kontrolnej. Heterozygoty TC stwierdzono u 18,7% osób z otyłością i 49% z prawidłową masą ciała. Heterozygoty TC występowały częściej wśród pacjentów z prawidłową masą ciała, a homozygoty CC zostały znalezione tylko i wyłącznie wśród pacjentów z prawidłową masą ciała.

Doktorat stwierdził że większy odsetek osób z allelem C obserwowany jest wśród osób z prawidłową masą ciała (heterozygoty TC 35,6%, n=15 vs. 17,4%, n=13 u osób z otyłością), ale prezentujących fenotyp TOFI, homozygoty CC (7,3%, n=3 osób z prawidłową masą ciała) reprezentowały fenotyp TOFI, gdzie można byłoby się spodziewać większego efektu działania allelu C. Wśród fenotypów FOTI zaobserwowano 1,3% osób heterozygotycznych z otyłością (n=1) oraz 12,2% osób z prawidłową masą ciała (n=5). Niestety małe liczebności (1 lub 5 osób) nie pozwalają na osiągnięcie obiektywnych wniosków.

Doktorant również wykazał, że osoby posiadające allel C (TC, CC) charakteryzowały się niezależnie od BMI istotnie niższymi parametrami stężenia glukozy, insuliny, wskaźnikiem HOMA-IR jak również mieli istotnie niższe stężenia cholesterolu LDL oraz wyższe stężenia cholesterolu HDL.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorant sformułował 5 wniosków końcowych. Uzasadniają one postawione cele badania, chociaż częściowo są podsumowaniem uzyskanych wyników.

### **Podsumowanie.**

Uważam, że tematyka badań jaką podjął Doktorant jest ciekawa, dotyczy bardzo ważnego tematu jakim jest podłoże genetyczne otyłości pierwotnej. Moim zdaniem najwartościowszą częścią dysertacji jest wyodrębnienie fenotypów otyłości oraz zbadanie korelacji pomiędzy genetycznym profilem a fenotypem otyłości.

Z pozycji Recenzenta zwracam uwagę na brak hipotezy badawczej, relatywnie małą grupę badanych osób (75 osób z rozpoznaną otyłością), istotnie mniejsza liczba osób z grupie kontrolnej (n= 43). Stosowanie określenia *stan odżywienia* w kontekście prawidłowego BMI oraz nadwagi i otyłości jest nieprecyzyjny, raczej powinno być użyte określenie *kategorie BMI*, ponadto budzi wątpliwości czy stan odżywienia może być oceniony na podstawie BMI,

jak to przedstawia Doktorant, powinien raczej być określony za pomocą kilku czynników, a nie tylko jednego (BMI).

Praca jest napisana starannie, bez błędów, ma walory poznawcze i potencjalne konsekwencje kliniczne.

Uważam, że praca odpowiada wymogom stawianym tego typu pracom doktorskim. Pokreślenia wymaga bardzo dokładne przeanalizowanie tematu, zaprojektowanie badania oraz umiejętność opracowania statystycznego uzyskanych wyników. Dlatego też, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr. Damiana Pogodzińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Sylwia Małgorzewicz