



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

dr hab. n. med. Michał Kukła, prof. UJ  
Klinika Chorób Wewnętrznych i Geriatrii  
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
Zakład Endoskopii  
Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie

Kraków 30.03.2022

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Sztolsztener pt.: *„Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby”*.

Wątroba odgrywa kluczową rolę w metabolizmie lipidów oraz w regulacji homeostazy energetycznej całego organizmu. To właśnie równowaga między dkomórkowym transportem, utylizacją i eksportem kwasów tłuszczowych (FA), syntezą lipidów oraz wydatkowaniem FA w procesie  $\beta$ -oksydacji jest niezbędna do zachowania prawidłowej czynności komórek wątroby. Wewnątrzkomórkowa zawartość lipidów regulowana w odpowiedzi na zwiększoną zawartość FA w diecie sprzyja powstawaniu prostych zmian stłuszczeniowych w wątrobie. Niektóre z lipidów wywierają działanie lipotoksyczne, prowadząc do uszkodzenia hepatocytów w wyniku aktywacji procesu zapalnego lub zaburzeń metabolicznych prowadzących do apoptozy i nekrozy. Źródłem tłuszczów o działaniu lipotoksycznym jest dieta bogatotłuszczowa, szczególnie z dużą zawartością długołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych. W wyniku ich przemiany powstaje nadmiar sfingolipidów, takich jak sfingozyna czy ceramid, odkładanych w cytoplazmie hepatocytów, pośredniczących także w sterowaniu szeregiem szlaków sygnałowych, które odgrywają istotną rolę w patogenezie niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD) i jej progresji do niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NASH). Lipotoksyczność kwasów tłuszczowych i ich metabolitów sprzyja rozwojowi stresu oksydacyjnego i powstawaniu wolnych rodników. Wczesne zmiany w metabolizmie lipidów jakie zachodzą w komórkach wątroby w odpowiedzi na zastosowanie karmienia wysokotłuszczowego wiążą się syntezą prozapalnych związków lipidowych, takich jak kwas arachidonowy (AA). Potencjalne hamowanie procesu zapalnego przez deksametazon może mieć korzystny wpływ na zahamowanie progresji choroby. Istotne jest ustalenie szeregu zmian zachodzących w metabolizmie lipidowym, jak również momentu



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

ich pojawienia się po zadziałaniu czynników ryzyka, takich jak dieta bogatotłuszczowa. Stwierdzenie tego faktu może mieć istotne znaczenie w diagnostyce i leczeniu NAFLD/NASH.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma formę opracowania komputerowego w twardej oprawie i liczy 101 stron. Zawiera kopie trzech artykułów będących podstawą dysertacji. W monografii przed rozprawą doktorską znajduje się życiorys i analiza bibliometryczna Autorki. Dysertacja składa się z 14 rozdziałów poprzedzonych spisem treści. Zawiera ona także streszczenia w języku polskim i angielskim oraz 35 pozycji piśmiennictwa. Rozprawa doktorska oparta jest na trzech pracach oryginalnych. We wszystkich pracach Autorka jest pierwszym autorem.

Wykaz prac stanowi jednocześnie **Rozdział 1**. Są to kolejno:

1. Klaudia Sztolsztener, Adrian Chabowski, Ewa Harasim-Symbor, Patrycja Bielawiec, Karolina Konstantynowicz-Nowicka. *Arachidonic acid as an early indicator of inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development*. *Biomolecules* 2020, 10(8):1133
2. Klaudia Sztolsztener, Karolina Konstantynowicz-Nowicka, Ewa Harasim-Symbor, Adrian Chabowski. *Time-dependent changes in hepatic sphingolipid accumulation and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in a rat model of NAFLD*. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22(22):12478
3. Klaudia Sztolsztener, Ewa Harasim-Symbor, Adrian Chabowski, Karolina Konstantynowicz-Nowicka. *The influence of dexamethasone on hepatic fatty acids metabolism and transport in human steatotic HepG2 cell line exposed to palmitate*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2021, 585:132-138

**Rozdział 2** to wykaz skrótów.

We „*Wstępie*”, który stanowi **Rozdział 3** monografii, Autorka wprowadza czytelnika w problematykę będącą przedmiotem dysertacji. Rozdział ten podzielony jest na pięć części: 1. Transport kwasów tłuszczowych i metabolizm lipidów w wątrobie; 2. Metabolizm sfingolipidów w wątrobie; 3. Szlak insulinowy PI3K/Akt/mTOR w wątrobie; 4. Stan zapalny i stres oksydacyjny w wątrobie; 5. Rola deksametazonu w regulacji metabolizmu lipidowego komórek wątroby. Autorka omawia patofizjologię niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD), skupiając się głównie na roli lipidów, ich transportu i metabolizmu, oraz





UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

zaburzeń metabolicznych w rozwoju procesu zapalnego i stresu oksydacyjnego, które leżą u podstaw rozwoju choroby i sprzyjają jej szybkiej progresji. Opisuje także szczegółowo rolę deksametazonu w metabolizmie lipidów i jego potencjalny wpływ na rozwój stłuszczenia i przebieg choroby. Wstęp zbiera syntetycznie niezbędne informacje, które zdecydowanie ułatwiają zrozumienie i analizę dalszej części rozprawy doktorskiej.

W **Rozdziale 4** Autorka prezentuje cztery cele pracy:

1. Ocena zależności między czasem trwania diety bogatotłuszczowej a stopniem akumulacji kwasu arachidonowego, rozwojem stanu zapalnego i zmian oksydacyjnych w wątrobie,
2. Ocena zależności między czasem trwania diety bogatotłuszczowej a wewnątrzwątrobową akumulacją wybranych frakcji sfingolipidowych,
3. Ocena zależności między czasem trwania diety bogatotłuszczowej a stopniem fosforylacji białek ze szlaku insulinowego PI3K/Akt/mTOR w wątrobie,
4. Ocena wpływu krótkotrwałej (16 h) oraz długotrwałej (40 h) ekspozycji ludzkich komórek nowotworu wątrobowokomórkowego na deksametazon, z uwzględnieniem zmian w ekspresji transporterów kwasów tłuszczowych, wybranych frakcji lipidowych oraz aktywnością szlaków n-3 i n-6 PUFA.

Cele te są jasno sformułowane, pod kątem ewentualnego wykorzystania uzyskanych wyników w nie tylko wyjaśnieniu patogenezy, ale także w odniesieniu do praktyki klinicznej.

**Rozdział 5** to „*Material i metody*”. W rozdziale tym doktorantka w sposób bardzo szczegółowy przedstawia informacje dotyczące zastosowanych modeli doświadczalnych i metodyki badań. Opisuje metody użyte do badania modelu zwierzęcego, komórkowego, oceny histologicznej, analizy stężenia oraz składu kwasowego wybranych frakcji lipidowych w tkance wątrobowej, osoczu, komórkach HepG2 oraz medium poinkubacyjnym, analizę ekspresji białek, szlaków metabolicznych i parametrów stresu oksydacyjnego. Omawia także metody statystyczne użyte w obliczeniach. Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem modelu *in vivo* (wątroba szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową przez okres 1, 2, 3, 4 i 5 tygodni) oraz modelu *in vitro* (ludzkie komórki nowotworu wątrobowokomórkowego poddane ekspozycji na deksametazon i lub/palmitynian w dwóch punktach czasowych – 16 h i 40 h). W modelu *in vivo* oznaczono zawartość kwasu arachidonowego w wybranych frakcjach



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

lipidowych oraz zawartość poszczególnych sfingolipidów za pomocą odpowiednio chromatografii gazowo-cieczowej (GLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Dodatkowo, wykonano oznaczenia ekspresji białek ze szlaku zapalnego oraz sfingolipidowego metodą Western Blot. Parametry stresu oksydacyjnego oraz poziom fosforylowanych białek ze szlaku insulinowego oznaczono wykorzystując komercyjnie dostępne kity kolorymetryczne, kity typu ELISA oraz zestaw do testów multipleksowych. W modelu *in vitro* całkowitą zawartość lipidów oraz sfingolipidów oznaczono metodami GLC i HPLC. Z kolei, ekspresję białkowych transporterów kwasów tłuszczowych wykonano metodą Western Blot.

W **Rozdziale 6** Autorka omawia wyniki, które uzyskała w badaniach stanowiących podstawę rozprawy. Z przeprowadzonych badań wynika, że indukowane dietą bogatotłuszczową stłuszczenie wątroby prowadzi do akumulacji kwasu arachidonowego w wątrobie już w pierwszym tygodniu od zastosowania karmienia doświadczalnego, a zmiany te współwystępują ze zwiększoną ekspresją cyklooksygenazy i lipooksygenazy. Procesowi powstawania stanu zapalnego w wątrobie towarzyszył również rozwój stresu oksydacyjnego, poprzez zmniejszenie zawartości enzymów antyoksydacyjnych z jednoczesnym zwiększeniem stężenia produktów peroksydacji lipidów. Ponadto, odnotowano nasilenie akumulacji sfingozyny, sfinganiny i ceramidu, co pośredniczyło w rozwoju i podtrzymaniu insulinooporności w wątrobie szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową. W modelu *in vitro* zaobserwowano istotną zależność między czasem ekspozycji a efektem wywoływanym przez deksametazon. Krótkotrwała (16 h) inkubacja zwiększyła ekspresję dokomórkowych transporterów dla kwasów tłuszczowych (tj. FABPm). Wykazano również, że przedłużona (40 h) inkubacja komórek HepG2 z deksametazonem zwiększyła aktywność antyzapalnego szlaku n-3 wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz nasiliła sekrecję kwasów tłuszczowych do medium hodowlanego z jednoczesnym obniżeniem wewnątrzkomórkowej zawartości diacylogliceroli i triacylogliceroli.

W **Rozdziale 7** Autorka zamieszcza „*Wnioski*” sformułowane na podstawie uzyskanych wyników. Brzmiały one następująco:

1. Dieta bogatotłuszczowa zwiększa wewnątrzwątrobową akumulację bezpośredniego prekursora mediatorów zapalnych, tj. kwasu arachidonowego, głównie we frakcji





UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

fosfolipidów błonowych, już w pierwszym tygodniu od rozpoczęcia karmienia eksperymentalnego, a zmiana ta jest zintensyfikowana w kolejnych tygodniach stosowania diety HFD.

2. Akumulacja kwasu arachidonowego (rozpoczynająca się już w pierwszym tygodniu stosowania diety bogatotłuszczowej) oraz nasilona ekspresja COX-1 i 15-LO, enzymów kontrolujących syntezę eikozanoidów i prostanoidów (w trzecim tygodniu karmienia HFD) korelują z powstawaniem i nasileniem stanu zapalnego podczas rozwoju NAFLD.
3. Dieta bogatotłuszczowa ułatwia rozwój stresu oksydacyjnego w wątrobie w wyniku zmniejszenia zawartości enzymów antyoksydacyjnych oraz nasilenia procesów peroksydacji lipidów, czego odzwierciedleniem jest wzrost stężenia MDA i 4-HNE w homogenatach wątroby.
4. Zwiększona akumulacja ceramidu w komórkach wątroby, obserwowana w ostatnich tygodniach diety HFD, wynika z nasilonej hydrolizy sfingomieliny oraz aktywacji tzw. szlaku ratunkowego z jednoczesnym hamowaniem katabolizmu ceramidu.
5. Nasilona wewnątrzwątrobowa akumulacja SFO już w pierwszym tygodniu od rozpoczęcia stosowania diety bogatotłuszczowej nasila rozwój insulinooporności, a efekt ten jest potęgowany w trzech ostatnich tygodniach karmienia eksperymentalnego poprzez zwiększone stężenia SFA i CER, co wskazuje na to, że ceramid nie jest bezpośrednią przyczyną rozwoju IR w komórkach wątroby.
6. Krótkotrwała ekspozycja na deksametazon zwiększa ekspresję dokomórkowych transporterów dla kwasów tłuszczowych, co sprzyja nasilonej akumulacji lipidów we frakcjach TAG, DAG oraz CER w komórkach HepG2.
7. Długotrwała stymulacja deksametazonem zwiększa sekrecję TAG i DAG do medium hodowlanego, co ujawnia protekcyjne działanie DEX na rozwój stłuszczenia w komórkach HepG2.
8. Jednoczesne zwiększenie aktywności przeciwzapalnego szlaku n-3 PUFA i zmniejszenie aktywności prozapalnego szlaku n-6 PUFA we frakcjach TAG i DAG komórek HepG2 wskazuje na ochronny wpływ deksametazonu na rozwój zapalenia, co istotnie ogranicza proces progresji NAFLD do NASH.



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

**Rozdział 8, 9 i 10** stanowią kopie kolejnych trzech opisanych powyżej artykułów oryginalnych, na podstawie których oparta jest oceniana rozprawa doktorska.

Dysertacja zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, które stanowią odpowiednio **Rozdział 11 i 12**.

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem ich wkładu procentowego oraz oświadczenia współautorów prac umieszczone zostały w **Rozdziale 13**.

**Rozdział 14 „Bibliografia”**, obejmuje 35 poprawnie, tematycznie dobranych pozycji literaturowych.

Pomimo ciekawego i ambitnego celu badawczego, jaki Autorka postawiła sobie w rozprawie doktorskiej, dużego znaczenia praktycznego zarówno w zakresie nauk podstawowych jak i klinicznych pracy oraz poprawności językowej z obowiązku recenzenta pozwolę sobie na kilka uwag dotyczących dysertacji.

#### **Uwagi merytoryczne**

1. Autorka w swojej rozprawie doktorskiej nie przeanalizowała niektórych ograniczeń, które mogły mieć wpływ na uzyskane wyniki. Należą do nich m. in. stosunkowo mała grupa badanych szczurów. Bez wątplenia ograniczeniem prac jest stosunkowo wczesna ocena zmian w przebiegu wywołanej dietą bogatotłuszczowa zmian w przebiegu NAFLD. Należy pamiętać, że w większości przypadków NAFLD jest chorobą o stosunkowo wolnej progresji i powolnym rozwoju włóknienia. Włóknienie jest podstawowym czynnikiem rokowniczym u pacjentów z NAFLD/NASH. Wpływa ono nie tylko na ryzyko powikłań wątrobowych i pozawątrobowych oraz ryzyko zgonu, ale także ściśle wiąże się z rozwojem zaburzeń metabolicznych. Nasilenie włóknienia jest związane ze zwiększeniem insulinooporności, co znacznie upośledza metabolizm FA. W przedstawionych pracach Autorka nie stwierdza obecności włóknienia w analizowanych wątrobach. Brak włóknienia wynika zapewne ze stosunkowo krótkiego trwania choroby tłuszczeniowej u badanych zwierząt. Analizuje jedynie obecność zapalenia, stłuszczenia i obecność hepatocytów balonowatych. Wydaje się, że Autorka powinna zwrócić uwagę na brak włóknienia w wątrobie, co może mieć wpływ na jednoznaczną interpretację wyników i uzyskane wnioski oraz bez wątplenia utrudnia porównanie z modelem ludzkim NAFLD.





UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

2. W pierwszej pracy będącej podstawą doktoratu Autorka w metodyce dotyczącej analizy histopatologicznej podaje, że do rozpoznania NAFLD użyto NAFLD activity score (NAS). Do rozpoznania i oceny NAFLD w badaniach histopatologicznych używa się skal ilościowych oceniających stopień stłuszczenia, stopień zapalenia śródzrądkowego, ilość hepatocytów balonowatych i zasięg włóknienia. Natomiast NAS określany jest w celu rozpoznania NASH i opiera się na sumie punktów oceniających aktywność zapalną, stopień stłuszczenia i ilość hepatocytów balonowatych. Zatem NAS nie jest potrzebny do rozpoznania NAFLD, a wystarczy jedynie obecność stłuszczenia w >5% hepatocytów.
3. W Rozdziale 6 „*Wyniki*” Autorka w przedstawia uzyskane wyniki w sposób opisowy. Ze względu na ilość wyników i wiele punktów czasowych sposób taki jest bardzo mało przejrzysty i utrudnia interpretację. Mimo, iż w dalszej części doktoratu załączone są prace z wykresami, wydaje się, że dla łatwiejszej interpretacji wyników i analizy prac oryginalnych lepsze byłoby przedstawienie najistotniejszych wyników w postaci rycin, wykresów bądź tabel. Brak także krótkiego podsumowania uzyskanych wyników, które pozwoliłoby na łatwiejszą interpretację i ocenę przedstawionych wniosków.
4. Autorka formułuje cztery cele pracy. W odpowiedzi na te cele przedstawia natomiast osiem wniosków. Ilość wniosków powinna odpowiadać ilości celów, a ich treść ściśle i precyzyjnie odpowiadać celom badania. W analizowanej pracy przedstawione wnioski nie odpowiadają wszystkim celom. Wniosek 1. i 2. odpowiadają celowi 1. Wniosek 6-8 odpowiadają celowi 4. Częściowa odpowiedź na cel 2. zawarta jest we wniosku 1. Brak wniosku, który odpowiadałby celowi 3. Wnioski 3-5 stanowią podsumowanie wyników i nie stanowią odpowiedzi na cele badania.
5. Autorka używa nazwy czynnik jądrowy  $\kappa\beta$ , a prawidłowa forma to czynnik jądrowy  $\kappa\text{B}$ .

Przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają jednak wartości merytorycznej pracy, jak również możliwości wykorzystania wyników w rozwoju nauk podstawowych i praktyce klinicznej. Reasumując uważam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Klaudii Sztolsztener pt.: „*Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na metabolizm lipidów i rozwój zapalenia w komórkach wątroby*” w sposób klarowny i przejrzysty analizuje wpływ nadmiernej ilości kwasów tłuszczowych, lipotoksyczności i stresu



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

oksydacyjnego na rozwój NAFLD i procesu zapalnego, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu prekursora prozapalnych związków lipidowych, jakim jest kwas arachidonowy. Analizuje także potencjalny protekcyjny wpływ dobrze znanego leku – deksametazonu na rozwój zmian zapalnych, co może mieć potencjalne znaczenie w leczeniu i zapobieganiu progresji choroby. Uzyskane wyniki stanowią istotne uzupełnienie stanu wiedzy w tym obszarze i mogą być przydatne w rozwoju badań nad NAFLD. Zwracają uwagę na bardzo wczesne występowanie zmian histopatologicznych w zdrowej wątrobie, ale także szybki rozwój zaburzeń metabolicznych po zadziałaniu czynników lipotoksycznych.

Autorka dysertacji wykazała się skrupulatnością, wnikliwością i rzetelnością, jak również bardzo dobrą znajomością warsztatu badawczego i obecnego stanu wiedzy.

Biorąc pod uwagę powyższe, jak również fakt, iż praca spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2021 r., poz. 478), zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Autorki, mgr Klaudii Sztolsztener do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Michał Kukła, prof. UJ