

**Katedra i Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Dr hab. n. med. Anna Bohdanowicz-Pawlak**

Wrocław, dnia 29.08.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agaty Witkowicz

***„Wybrane polimorfizmy genu UCP1, badanie ich znaczenia funkcjonalnego
i związku z ryzykiem wystąpienia otyłości i zespołu metabolicznego”***

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych zlecona przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Promotorem pracy jest Pani dr hab. med. Lidia Karabon, prof. Instytutu

Zespół metaboliczny jest istotnym problemem zdrowotnym dotykającym miliony ludzi na świecie. Składowe tego zespołu szczególnie otyłość (głównie brzuszna) i cukrzyca typu 2 zwiększają zagrożenie chorobami układu sercowo-naczyniowego, które jak się ocenia stanowią przyczynę około 30% wszystkich zgonów na świecie. Dlatego istotne wydaje się poszukiwanie nowych i alternatywnych sposobów leczenia otyłości, która jest główną przyczyną rozwoju cukrzycy typu 2 i chorób układu krążenia.

Odkrycie obecności brunatnej tkanki tłuszczowej u osób dorosłych oraz wykazanie na modelu mysim, że zaburzenia jej metabolizmu mogą doprowadzić do otyłości, spowodowało rozwój badań nad możliwością wykorzystania regulacji metabolizmu tej tkanki w leczeniu otyłości i jej niekorzystnych następstw.

Najlepiej scharakteryzowanym markerem brunatnej tkanki tłuszczowej jest białko termogenina 1 (uncoupling protein 1, UCP1). Ekspresja białka UCP1 jest indukowana przez receptor β 3-adrenergiczny (β 3-adrenergic receptor; β 3-AR). Liczne badania wykazują, że ich nieprawidłowe funkcjonowanie może zaburzać prawidłowy metabolizm tłuszczów. Zaburzona ekspresja białek UCP1 czy β 3-AR może być uwarunkowana genetycznie. Ukazało się wiele prac opisujących związki polimorfizmów w genach kodujących te białka z otyłością i zespołem metabolicznym wciąż poszukiwane są nowe markery biochemiczne i genetyczne przydatne do oceny ryzyka wystąpienia zaburzeń metabolicznych czy też ich alternatywnego leczenia.

Ich wykorzystanie w praktyce klinicznej może poprawić skuteczność diagnostyczną i terapeutyczną zespołu metabolicznego i otyłości.

Z tego powodu wybór tematu badań Doktorantki uważam za trafny i ciekawy oraz ważny zarówno z klinicznego (szczególnie w aspekcie epidemiologii oraz niekorzystnych następstw otyłości i zespołu metabolicznego) oraz naukowego punktu widzenia.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja oprawiona w twarde okładki liczy 139 numerowanych stron, składa się z następujących rozdziałów: streszczenie, summary, wykaz najczęściej stosowanych skrótów, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo, spis tabel, rycin i wykresów. Właściwa treść poprzedzona jest stroną tytułową, dedykacjami i spisem treści oraz wykazem publikacji i doniesień zjazdowych dotyczących pracy doktorskiej. Praca ilustrowana jest przez 27 rycin, 19 tabel i 9 wykresów.

We wstępie liczącym 37 stron Autorka omawia aspekty patofizjologiczne, kliniczne i diagnostyczne zespołu metabolicznego, tkanki tłuszczowej oraz budowę i czynność termogeniny 1 (UCP1), regulację ekspresji genu tego białka oraz jego wybrane polimorfizmy (A-3826G, A-1766G, A0112C, Ala64Thr, Met229Leu). Wstęp, ilustrowany siedmioma rycinami i jedną tabelą, wprowadza czytelnika do problematyki pracy, przemawia za bardzo dobrą orientacją Doktorantki w temacie własnych badań. Autorka jako cel pracy przedstawiła zbadanie związku wybranych polimorfizmów występujących w genie *UCP1* z ryzykiem wystąpienia otyłości i zespołu metabolicznego w populacji polskiej oraz zbadanie ich funkcjonalnego znaczenia.

Głównymi zadaniami do realizacji badań były:

- Analiza związku wybranych na podstawie danych literaturowych polimorfizmów genu *UCP1* z ryzykiem wystąpienia otyłości i zespołu metabolicznego.
- Poszukiwanie nowych, nieopisanych w literaturze wariantów genu *UCP1* związanych z ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego przy zastosowaniu metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS).
- Badanie ekspresji *UCP1* w komórkach mononuklearnych krwi obwodowej.
- Badanie funkcjonalnego znaczenia wybranych polimorfizmów regionu 5' genu *UCP1* z wykorzystaniem linii komórkowej HepG2 oraz PAZ6.

Cele są jednoznacznie sformułowane, interesujące z medycznego (praktycznego) i naukowego punktu widzenia a ich realizacja może pozwolić lepiej poznać patogenezę i diagnostykę zaburzeń metabolicznych.

Kryteria kwalifikacji i wykonywane badania laboratoryjne przedstawiono bardzo szczegółowo w rozdziałach **Materiały i Metody** (łącznie 30 stron). Do badania ostatecznie

włączono 281 osób z zespołem metabolicznym w tym 29 z cukrzycą typu 2, grupę kontrolną stanowiło 365 zdrowych ochotników. Wszyscy uczestnicy wyrazili pisemną zgodę na udział w projekcie, a Komisja Bioetyczna wyraziła zgodę na prowadzenie badań. Zastosowano nowoczesne metody laboratoryjne badań biochemicznych i genetycznych oraz właściwe analizy statystyczne. Przeprowadzono analizę danych biochemicznych oraz antropometrycznych grupy, w tym: profilu lipidowego (cholesterol całkowity, stężenie LDL, HDL, TG), glikemii na czczo, BMI, WHR. Wyniki analizy przedstawiono, jako średnią \pm SD dla wszystkich pacjentów. Metodą PCR-RFLP oznaczono miejsca polimorficzne (A-3826G, A-1766G, A-112C, Ala64Thr, Met229Leu) w grupie osób ze zdiagnozowanym zespołem metabolicznym (281 osób) oraz w grupie osób zdrowych (316 osób). Wykonano badania ekspresji genów *UCP1* i *UCP2* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) pacjentów z zaburzeniami metabolicznymi (cukrzycą typu 2 oraz osób otyłych) oraz grupy osób zdrowych (grupa kontrolna).

Badania funkcjonalnego znaczenia wybranych wariantów genetycznych zlokalizowanych w rejonie 5' genu *UCP1* w odniesieniu do aktywności promotorowej wykonano na dwóch liniach komórkowych: HepG2 oraz PAZ6.

Wyniki zostały przedstawione w odrębnym rozdziale w postaci 16 rycin, 12 tabel i 9 wykresów.

Autorka wykazała:

- związek polimorfizmu A-3826/G z zespołem metabolicznym w badanej populacji
- obniżoną aktywność *UCP2* w grupie badanej, co przez zaburzenia w regulacji aktywnych form tlenu aktywuje przewlekły stan zapalny, który ma istotne znaczenie w patogenezie zaburzeń metabolicznych
- brak ekspresji mRNA *UCP1* w komórkach jednojądrzastych krwi (co do tej pory było potwierdzone głównie w badaniach na modelach zwierzęcych)
- obecność polimorfizmu A/3826/G (zmutowanego allelu G) obniża aktywność promotorową *UCP1* w komórkach PAZ6 po stymulacji norepinefryną co ma związek z większym ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego
- 39 nowych, w większości przypadków nieopisanych w literaturze polimorfizmów w rejonach niekodujących i kodującym *UCP1* potencjalnie związanych z ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego i cukrzycy typu 2.

W liczącej 15 stron **Dyskusji** Doktorantka analizuje wyniki swoich badań i konfrontuje je z niekiedy odmiennymi danymi z piśmiennictwa. Dyskusja jest w pełni dojrzała, a Autorka korzysta w niej w sposób właściwy z danych z piśmiennictwa, umiejętnie posługuje się argumentami przemawiającymi za wagą swoich obserwacji, ale także prezentuje przeciwne dane, krytycznie przedstawia ograniczenia własnej pracy. Sposób prowadzenia dyskusji świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnej pracy naukowej.

Wyniki badań zostały podsumowane w sześciu **wnioskach**, które w pełni odpowiadają na założony cel. Wnioski wskazują na potrzebę optymalnego wykorzystania dostępnych markerów genetycznych w diagnostyce i terapii otyłości i zespołu metabolicznego.

Dla klinicysty szczególnie interesujące są wnioski pierwszy, trzeci i czwarty mające znaczenie praktyczne. Autorka wykazała, że spośród badanych polimorfizmów związek z zespołem metabolicznym miał jedynie polimorfizm A-3826/G genu *UCP1*, w którym obecność allelu G okazała się związana z mniejszym ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego w badanej populacji. To interesująca obserwacja pozostająca w sprzeczności do obserwacji innych badaczy. Trzeba jednak powiedzieć, że zdecydowana większość dostępnych badań została przeprowadzona w populacji Azjatyckiej, a nieliczne badania przeprowadzone wśród Europejczyków nie wykazały związku otyłości czy cukrzycy typu 2 ze zmianami w genie *UCP1* (były jednak przeprowadzone na niewielkiej liczbie osób). Wyniki badań Doktorantki są tym bardziej istotne, że dotyczą populacji polskiej a badaniu poddano ponad 600 osób. Ponadto, nie znalazłam podobnych prac w polskim piśmiennictwie, tym bardziej zachęcam więc do kontynuacji badań i publikacji wyników.

Warto dodać, że w przeprowadzonej analizie haplotypów badanych polimorfizmów Autorka wykazała istotną różnicę w częstości występowania haplotypu GGAT (polimorfizmów A-3826G i Met229Leu) pomiędzy grupą kontrolną a grupą z zespołem metabolicznym i związek tego haplotypu z obniżonym ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego w badanej populacji.

We wniosku trzecim Doktorantka wskazuje że obniżona aktywność termogeniny 2 u osób z zaburzeniami metabolicznymi wpływa na nieprawidłową regulację reaktywnych form tlenu, co z kolei przyczynia się do powstawania stresu oksydacyjnego i w efekcie przewlekłego stanu zapalnego, który odgrywa istotną rolę w patogenezie otyłości i cukrzycy typu 2 prowadzących do zespołu metabolicznego.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka wykazała (wniosek czwarty) niższy poziom ekspresji mRNA *UCP2* w komórkach jednojądrzastych w grupie osób otyłych i w grupie z cukrzycą typu 2 w porównaniu do stwierdzonego u osób zdrowych a także brak ekspresji mRNA *UCP1* w opisanych wyżej komórkach w badanych grupach. Może to mieć również znaczenie praktyczne w diagnostyce gdyż komórki jednojądrzaste mogą stanowić łatwo dostępne źródło biomarkerów otyłości.

Identyfikacja przez Doktorantkę 39 nowych, wariantów genetycznych (wniosek 6) w rejonach niekodujących oraz kodującym *UCP1* potencjalnie związanych z ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego (14 wariantów) lub cukrzycy typu 2 (25 wariantów) niektórych jeszcze niemoże rzeczywiście stanowić podstawę do dalszych badań nad związkiem tych wariantów z ryzykiem wystąpienia wymienionych patologii. Zachęcam Doktorantkę do kontynuowania tych badań.

Piśmiennictwo obejmujące 174 pozycje, głównie anglojęzyczne, w większości z ostatnich lat jest uszeregowane w kolejności chronologicznej. Zostało poprawnie dobrane i umiejętnie wykorzystane w tekście pracy. Nie znalazłam odnośnika do pozycji 61 (zaznaczam z obowiązku redakcyjnego).

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja przedstawia samodzielne rozwiązanie przez Autorkę problemu naukowego, ma istotne znaczenie praktyczne oraz stanowi ważny wkład w badania nad otyłością i zespołem metabolicznym.

Nie zgłaszam zastrzeżeń merytorycznych ani formalnych do tekstu rozprawy, praca jest przejrzysta, napisana poprawnie stylistycznie i edytorsko, nie ma w niej błędów literowych. Układ pracy jest czytelny, tekst jest wzbogacony o dydaktyczne ryciny, przejrzyste tabele, nowoczesne ilustracje mikroskopowe co powoduje, że pracę czyta się z dużą przyjemnością.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2021r., poz 478 ze zm.).

Wnioskuje do Wysokiej Rady Instytutu Immunologii PAN we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Agaty Witkowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, z uwagi na oryginalność, interdyscyplinarny charakter i ważne wnioski praktyczne wynikające z badania, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej i jej Autorki zgodnie z zasadami Instytutu Immunologii PAN we Wrocławiu.

Archiwizacja - Paweł