

Sosnowiec / 06-08-2020 r.

Katedra i Zakład Chemii
Klinicznej i Diagnostyki
Laboratoryjnej

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu

41-200 Sosnowiec
ul. Jedności 8
www.sum.edu.pl

Adiunkt
dr hab. n. med. Katarzyna Winsz-Szczołka
winsz@sum.edu.pl

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 364 11 50
fax: (+48 32) 364 11 57
chem_klin@sum.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

mgr Łukasza Lewandowskiego

Doktoranta

w Katedrze i Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych

Wydziału Farmaceutycznego

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Tytuł pracy: *Wybrane polimorfizmy genów kodujących insulinę oraz izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej, w populacji osób otyłych i/lub chorujących na cukrzycę typu drugiego*

Otyłość, definiowana jako znamienne zwiększenie ilości tkanki tłuszczowej, wynikające z hipertrofii lub/i hiperplazji adipocytów, stanowi poważny problem zdrowotny o zasięgu globalnym. Toksyczność nadmiernie skumulowanej tkanki tłuszczowej, uważanej obecnie za jeden z największych gruczołów wydzielania wewnętrznego, wiąże się z biosyntezą i wydzielaniem do krwi adipokin. To właśnie liczne i złożone funkcje wymienionych cząsteczek w organizmie, jako modulatorów procesów prozapalnych i prooksydacyjnych, skutkują powiązaniem między tkanką tłuszczową, zaburzeniami integralności genomu, chorobami metabolicznymi, w tym – insulinoopornością czy cukrzycą typu 2. Stąd też, badania oceniające związek wybranych polimorfizmów genów kodujących insulinę oraz izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej, ze zmiennością stężenia insuliny lub stężenia/aktywności dysmutazy ponadtlenkowej we krwi osób z otyłością i/lub chorujących na cukrzycę typu 2, prowadzone przez Pana mgr Łukasza Lewandowskiego, pod opieką Pani prof. dr hab. n. farm. Haliny Milnerowicz oraz Pani dr hab. Marty Kepinskiej, prof. UMW, wpisujące się w powyższy nurt badań naukowych, uważam za niezwykle interesujące, zarówno ze względów naukowych, jak i potencjalnie klinicznych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma konstrukcję typową dla dysertacji doktorskich, a jej struktura jest przejrzysta i logiczna. Autor zachował właściwą proporcję poszczególnych jej części, które są koherentne i zgodne z ich tytułami. Praca, której treść odpowiada tytułowi, obejmuje 246 stron wydruku i zawiera 43 tabele oraz 26 rycin. Na końcu pracy umieszczono wykaz w pełni wykorzystanego i właściwie przytoczonego piśmiennictwa. Znaczna część z 336 cytowanych prac została opublikowana w ostatnim dziesięcioleciu. Rozprawę dopełniają streszczenie w języku

polskim i angielskim oraz załączniki, w tym – ankieta przeprowadzana wśród osób chorujących na cukrzycę typu 2 i wykaz publikacji naukowych oraz doniesień zjazdowych Autora. Dorobek naukowy Doktoranta jest znaczący jak na młodego adepta nauki, o łącznej wartości współczynnika oddziaływania impact factor (IF) wynoszącej 10,028.

W rozdziale pt. „Wstęp”, podzielonym na logiczne podrozdziały, mgr Ł. Lewandowski przedstawia budowę, biosyntezę i degradację oraz mechanizm działania insuliny, którego zaburzenia towarzyszą otyłości i cukrzycy typu 2. Rozwojowi tych ostatnich, współzależnych, najczęstszych chorób metabolicznych XXI wieku, jak wynika z dalszych części omawianego rozdziału, sprzyja nadmierna aktywność wolnorodnikowa, niekompensowana wpływami związków antyoksydacyjnych, w tym – dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i jej izoenzymów. Dalej, Autor omawia zarówno wybrane polimorfizmy DNA, polimorfizmy genów kodujących: insulinę, receptor insuliny oraz powiązane z nimi białka substratowe, jak również polimorfizmy pojedynczego nukleotydu genów kodujących izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej, jako czynniki predysponujące do wystąpienia otyłości i/lub cukrzycy, oraz predykcji przebiegu tych chorób. Wstęp wprowadza więc w problematykę przeprowadzonych badań oraz uzasadnia sformułowane w kolejnym rozdziale cele badawcze (z uwagi na szczegółowy wstęp, który przybliży i zgłębia wszystkie zagadnienia potrzebne dla zrozumienia tematu i celu pracy zbyteczne zdaje się zamieszczanie tak obszernych opisów założeń niniejszej rozprawy). Dla realizacji nadrzędnego celu pracy, tj. zbadania związku polimorfizmów pojedynczych nukleotydów: rs3842729 (INS), rs2234694 (SOD1), rs5746105 (SOD2), rs4880 (SOD2), rs927450 (SOD2), rs8192287 (SOD3), ze stężeniem insuliny lub stężeniem/aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej, we krwi osób z otyłością i/lub chorujących na cukrzycę typu 2, Doktorant przyjął następujące zadania badawcze:

- oznaczenie surowiczego stężenia cholesterolu całkowitego, trójglicerydów, cholesterolu frakcji: HDL i LDL, białka C-reaktywnego, glukozy, insuliny oraz stężenia hemoglobiny glikowanej we krwi pełnej u chorych z cukrzycą;
- oznaczenie surowiczego stężenia miedzi oraz cynku i wyliczenie współczynnika stężeń cynku do miedzi, oraz oznaczenie stężenie kadmu we krwi pełnej;
- ocenę korelacji pomiędzy stężeniem metali: miedzi, cynku, kadmu, a parametrami: wiek, surowicze stężenie cholesterolu całkowitego, trójglicerydów, cholesterolu frakcji: HDL i LDL, białka C-reaktywnego, glukozy, insuliny, oraz wartościami BMI i HOMA-IR;
- oznaczenie osoczowej całkowitej aktywności SOD oraz aktywności Cu,Zn-SOD i Mn-SOD;
- oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAC) w surowicy;
- oznaczenie osoczowego stężenia: malonyldialdehydu (MDA), SOD1, SOD2, SOD3;
- ocenę wzajemnych korelacji pomiędzy stężeniem/aktywnością SOD, stężeniem TAC, MDA oraz: stężeniami miedzi, cynku, kadmu;
- ocenę korelacji pomiędzy stężeniem/aktywnością SOD, stężeniem TAC, MDA, a parametrami: wiek, stężenie cholesterolu całkowitego, trójglicerydów, cholesterolu frakcji: HDL i LDL, białka C-reaktywnego, glukozy, insuliny, BMI oraz HOMA-IR;
- izolację DNA z krwi pełnej, po czym genotypowanie w kierunku sześciu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs), genów: INS (rs3842729), SOD1 (rs2234694), SOD2 (rs5746105, rs4880, rs927450), SOD3 (rs8192287), z analizą nierównowagi sprzężeń pomiędzy tymi SNP;

- porównanie wartości stężeń: glukozy, insuliny, miedzi, cynku, stosunku stężeń cynku do miedzi, oraz BMI i HOMA-IR, pomiędzy osobami o różnych genotypach SNP INS rs3842729;
- porównanie wartości aktywności całkowitej SOD, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, stężenia TAC, MDA, SOD1, SOD2, SOD3, miedzi, cynku, stosunku stężeń cynku do miedzi, pomiędzy osobami o różnych genotypach pięciu SNP związanych z genami kodującymi izoenzymy SOD;
- ocenę występowania różnic w wartościach parametrów niezwiązanych bezpośrednio z badanymi SNP, pomiędzy osobami o różnych genotypach tych SNP.

Doktorant zaplanował dokonać porównań wartości wymienionych powyżej parametrów, z uwzględnieniem płci badanych osób, zachorowalności na otyłość i/lub cukrzycę typu 2, oraz narażenie tych osób na składniki dymu tytoniowego.

W rozdziale „Materiał i metody” Doktorant opisuje kryteria doboru osób badanych do poszczególnych grup, uwzględniając wartości BMI charakteryzujące te osoby oraz obecność lub niewystępowanie cukrzycy typu 2. Jednakże, z uwagi na znaczne rozpowszechnienie cukrzycy typu 2 wśród Polaków (szacuje się, że w naszym kraju na cukrzycę choruje ponad 2,1 mln osób w wieku 15 lat i więcej) wydaje się, że dobranie pacjentów do grupy nieotyłych z cukrzycą (grupa B) oraz otyłych z omawianą patologią (grupa C), w wieku porównywalnym do osób zdrowych (grupa P) i otyłych bez cukrzycy (grupa A) byłoby wartością dodaną do niniejszej pracy. Co więcej, liczba osób w danej grupie (N) powinna towarzyszyć wynikom badań prezentowanym w tabelach.

Imponujący jest ogrom pracy włożonej przez Pana Magistra dla realizacji założonych celów pracy. Doktorant wykorzystał liczne metody i techniki badawcze, w tym –

- metody immunoenzymatyczne (kotynina, insulina, SOD1, SOD2, SOD3,),
- absorpcyjną spektrometrię atomową (Cd, Cu, Zn),
- metody spektrofotometryczne (cholesterol całkowity, HDL, TG, LDL, glukoza, SOD całkowita, Mn-SOD, białko całkowite, TAC, MDA),
- metodę immunoturbidymetryczną (CRP),
- techniki chromatograficzne (izolacja DNA),
- metody PCR-RFLP [genotypowanie SNP: rs3842729 (INS), rs2234694 (SOD1), rs5746105 (SOD2), rs4880 (SOD2), rs927450 (SOD2), rs8192287 (SOD3)],
- metody elektroforetyczne (rozdziół produktów PCR po restrykcji).

Uzyskane wyniki badań Doktorant poddał ocenie statystycznej, wykazując parametryczne i nieparametryczne rozkłady zmiennych. Co więcej dla określenia istotnego związku badanych polimorfizmów ze zmiennymi zależnymi tj. otyłością lub cukrzycą typu 2, posłużył się modelami regresji logistycznej.

Rezultaty analiz statystycznych – bardzo licznych – wyników badań Doktorant zebrał w 40 tabelach i zilustrował graficznie na 18 rycinach, co w znaczący sposób ułatwiło analizę tego jakże długiego, zawierającego wiele informacji, rozdziału. Jednakże sposób opisu uzyskanych wyników w niektórych jego częściach był niejasny. I tak, np. podczas gdy w tabeli nr 4 czy 7 oraz na rycinach 14 i 15 występuje podział osób badanych na cztery – scharakteryzowane wcześniej jako P, A, B, C – grupy badawcze, to w innych obserwujemy już trzy grupy tj. P, A, B+C. Jako czytelnikowi zabrakło mi jasnego wytłumaczenia celu

połączenia grupy pacjentów bez otyłości z cukrzycą z grupą diabetyków otyłych. Znacznym ułatwieniem jest natomiast tekst rozdziału 4.12., będący zwięzłym podsumowaniem wyników, wprowadzającym do rzeczowej i wnikliwej dyskusji. Rozdział „Dyskusja”, podzielona na części, odpowiadające kolejnym celom pracy stanowi dowód orientacji Doktoranta w tematyce związanej z przeprowadzonymi badaniami. Autor wykazał się umiejętnością powiązania wyników własnych z obserwacjami innych autorów. Szczególnie istotne, nie tylko ze względów poznawczych lecz także praktycznych, klinicznie użytecznych, wydają się być wyniki oceniające związek zmienności genotypowej wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu z szansą wystąpienia otyłości lub cukrzycy. Przeniesienie wiedzy wynikającej z badań podstawowych do strategii działań profilaktycznych, może przynieść znaczną korzyść w kontekście przeciwdziałania rozwojowi omawianych, najbardziej rozpowszechnionych problemów zdrowotnych związanych z nadmierną kumulacją tkanki tłuszczowej. Doktorant wpisał się więc w najnowsze trendy badawcze.

Pracę zamyka trzynaście rozbudowanych wniosków, które w zdecydowanej większości odpowiadają postawionym celom pracy. Wydaje się jednakże, że żaden z nich nie stanowi bezpośredniej odpowiedzi na pierwsze z pytań badawczych stanowiących cel pracy, tj. ...”czy obserwowane, u osób niediabetycznych, otyłych i/lub diabetycznych, wartości stężenia insuliny w płynie zewnątrzkomórkowym mogą mieć jakiś związek z polimorfizmem genu INS, innym niż wspomniany VNTR”...

W trakcie lektury recenzowanej dysertacji można było dostrzec nieliczne nieścisłości, bądź kwestie budzące pewne wątpliwości, w tym –

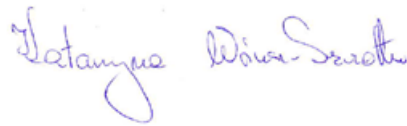
- zamiennie stosowanie określenia płyn zewnątrzkomórkowy z określeniem płyn pozakomórkowy,
- używanie określeń:
 - cukrzyca typu drugiego, zamiast cukrzyca typu 2
 - krzywa wzorcowa..., zmierzona metodą
 - ...mogą mieć jakiś związek z polimorfizmem....
- kilkukrotne stosowanie w tekście rozwinięcia skrótu SOD, zaś brak rozwinięcia MDA,
- brak odniesienia literaturowego do tezy Stefana Marklunda (str. 37), czy odniesień literaturowych po nazwiskach autorów cytowanych prac (cytowania znajdują się na końcu zdania),
- brak metodyki oznaczania hemoglobiny glikowanej,
- brak wzoru ankiety przeprowadzonej wśród osób zdrowych oraz osób otyłych bez cukrzycy, na wzór ankiety dla pacjentów z cukrzycą typu 2.

Jednakże, „potknięcia tekstowe” są nieuniknionym elementem w tego typu pracach i nie obniżają wartości rozprawy, która jest znaczącym osiągnięciem badawczym Doktoranta. Należy podkreślić ogromną pracowitość Doktoranta, o której – obok bardzo dużej ilości wyników badań – świadczy także szybkość i precyzja ich uzyskania i opisanie w pracy, a realizowanej w ramach projektu pn. „Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu jako Regionalny Ośrodek Doskonałości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu”, pochodzących ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Programie „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” w latach 2019 – 2022 (nr projektu 016/RID/2018/19).

W podsumowaniu oświadczam, że przedłożona mi do recenzji dysertacja doktorska pt. „Wybrane polimorfizmy genów kodujących insulinę oraz izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej, w populacji osób otyłych i/lub chorujących na cukrzycę typu drugiego” jest oryginalnym, samodzielny dorobkiem naukowym Kandydata, i spełnia warunki Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. 2003 Nr 65 poz.595 z późn.zm.).

Z pełnym przekonaniem przedkładam Panu Prof. dr hab. Adamowi Matkowskiemu, Przewodniczącemu Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Łukasza Lewandowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysokie wartości merytoryczne ocenianej przeze mnie dysertacji, w tym nowatorski charakter wyników badań i ich znaczenie kliniczne, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o wyróżnienie pracy Pana mgr Łukasza Lewandowskiego.



dr hab. n. med. Katarzyna Winsz-Szczotka