



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

dr hab. Małgorzata Knapik-Czajka

Wydział Farmaceutyczny  
Zakład Analityki Biochemicznej

30-688 Kraków, ul. Medyczna 9  
tel. +48 12 620 56 61

malgorzata.knapik-czajka@uj.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Lewandowskiego pt.  
Wybrane polimorfizmy genów kodujących insulinę oraz izoenzymy dysmutazy  
ponadtlenkowej, w populacji osób otyłych i/lub chorujących na cukrzycę typu drugiego**

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych  
Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
pod kierunkiem

Pani Prof. dr hab. Haliny Milnerowicz oraz Pani dr hab. inż. Marty Kepinskiej, Prof. UMW

Utrzymanie równowagi pro/antyoksydacyjnej jest kluczowe dla zachowania prawidłowego funkcjonowania ustroju człowieka. Zaburzenie tej równowagi manifestowane jako stres oksydacyjny pełni istotną rolę w patogenezie wielu schorzeń, w tym takich chorób cywilizacyjnych jakimi są otyłość i cukrzyca typu drugiego.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Łukasza Lewandowskiego dotyczy istotnego zagadnienia wpływu czynników dziedzicznych, wybranych polimorfizmów genów kodujących insulinę oraz izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej, na zmienność stężenia insuliny lub aktywności/stężenia dysmutazy ponadtlenkowej w płynie pozakomórkowym osób otyłych i/lub chorujących na cukrzycę typu drugiego.

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), występująca u człowieka w postaci 3 izoenzymów (SOD1, SOD2 i SOD3), jest jednym z najbardziej istotnych antyoksydantów enzymatycznych. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na możliwy związek polimorfizmów genów kodujących izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej ze zmiennością aktywności/stężenia tego enzymu, a także z szansą chorowania na otyłość i cukrzycę oraz wystąpienia powikłań towarzyszących tym schorzeniom. Ponadto stwierdzono, że określone polimorfizmy genu kodującego insulinę mogą mieć związek z rozwojem procesu insulinooporności tkanek obwodowych, zjawiska charakterystycznego zarówno dla otyłości

jak i cukrzycy typu drugiego. Do tej pory nie przeprowadzono jednak kompleksowych badań mających na celu ocenę związku między występowaniem wybranych przez Doktoranta polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genów *INS* oraz *SOD1*, *SOD2* i *SOD3* a zmiennością stężenia insuliny lub aktywności/stężenia izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej, oraz ich powiązania z możliwą szansą wystąpienia otyłości i cukrzycy typu drugiego.

Obecnie coraz więcej uwagi poświęca się badaniu genetycznego podłoża cukrzycy i otyłości. Jednak udział polimorfizmów wybranych genów w kształtowaniu osobniczych predyspozycji do tych schorzeń wciąż pozostaje niedostatecznie wyjaśniony. W świetle powyższych faktów problem badawczy podjęty przez Doktoranta jest trafny oraz ciekawy i dobrze wpisuje się w obszar współczesnych badań biomedycznych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje w całości 245 stron tekstu. Rozprawa ma logiczny i przejrzysty układ, typowy dla tego rodzaju opracowań: *Wstęp*, *Cele pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Wnioski*, *Piśmiennictwo*. Treść poszczególnych rozdziałów odpowiada tematom przedstawionym w ich tytułach. Zakończeniem rozprawy jest zwięźle zredagowane *Streszczenie*, przedstawione w polsko i anglojęzycznej wersji. Pracę uzupełniają: *Wykaz użytych skrótów* oraz *Spis tabel* i *Spis rycin*, a także *Załączniki*. Piśmiennictwo jest odpowiednio dobrane i liczy 336 anglojęzycznych pozycji.

Praca jest napisana poprawnie pod względem językowo-stylistycznym. Zwraca uwagę staranna i przejrzysta ilustracja graficzna pracy 43 tabelami oraz 26 rycinami.

We *Wstępie* Doktorant na podstawie 229 pozycji dokonał przeglądu współczesnego piśmiennictwa dotyczącego zagadnień będących przedmiotem rozprawy. *Wstęp* napisany jest ciekawie i uwzględnia wyniki najnowszych badań z zakresu omawianego tematu. Przedstawione w tej części pracy informacje potwierdzają zasadność wybranego celu i świadczą o dobrym przygotowaniu Doktoranta do podjętych badań.

Celem ocenianej rozprawy, który został przedstawiony w postaci 4 celów szczegółowych, było zbadanie związku wybranych sześciu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu: rs3842729 (*INS*), rs2234694 (*SOD1*), rs5746105 (*SOD2*), rs4880 (*SOD2*), rs927450 (*SOD2*) i rs8192287 (*SOD3*) ze zmiennością stężenia insuliny lub aktywności/stężenia izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej, w płynie pozakomórkowym (surowicy lub osoczu) osób otyłych i/lub chorujących na cukrzycę typu drugiego. Przedstawione cele są odpowiednio sformułowane i w prawidłowym zakresie obejmują tematykę badawczą, której poświęcona jest rozprawa. Cele pracy Doktorant zrealizował

poprzez odpowiednie zaprojektowanie i wykonanie szeregu oznaczeń oraz dogłębną analizę statystyczną uzyskanych wyników.

Do badań włączono 117 osób podzielonych na podgrupy osób otyłych i nieotyłych, chorujących bądź nie na cukrzycę typu drugiego. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

W rozdziale *Materiał i metody* Pan mgr Łukasz Lewandowski przedstawił charakterystykę populacji badanej, a także opisał materiał biologiczny wykorzystany do oznaczeń oraz metody badawcze. Badania obejmowały między innymi wykonanie oznaczeń stężenia wybranych parametrów biochemicznych, aktywności i stężenia izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej oraz poziomu miedzi, cynku i kadmu. Ponadto, przy zastosowaniu techniki PCR-RLFP, Doktorant przeprowadził genotypowanie wybranych sześciu polimorfizmów genów insuliny i izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej. W rozdziale *Materiał i metody* Pan mgr Łukasz Lewandowski przedstawił także szczegółowy opis przeprowadzonej analizy statystycznej wyników oraz innych analiz *in silico*. Oprócz podstawowych analiz statystycznych zastosował bardziej zaawansowane metody. Dla określenia istotnego związku badanych polimorfizmów z otyłością lub cukrzycą typu drugiego Doktorant wykorzystał modele regresji logistycznej budowane w oparciu o zmienność genotypową badanych polimorfizmów.

Zastosowane metody były odpowiednie dla realizacji zaplanowanych celów. Różnorodność tych metod dowodzi dużej umiejętności Doktoranta prowadzenia badań naukowych z wykorzystaniem nowoczesnego warsztatu badawczego, a wszechstronna analiza statystyczna uzyskanych wyników dodatkowo podnosi wartość pracy.

Rozdział *Wyniki* stanowi najbardziej obszerną część rozprawy (92 strony), co wynika z dużej liczby analizowanych danych i dokumentuje szeroki zakres pracy włożonej w realizację założonych celów. Wyniki zostały starannie i czytelnie przedstawione oraz zilustrowane 40 tabelami i 13 rycinami.

W rozdziale *Dyskusja* składającym się z kilku części, Pan mgr Łukasz Lewandowski kolejno odniósł się do ograniczeń wynikających z przyjętej metodyki badań, a następnie wnikliwie omówił uzyskane wyniki, porównując je z wynikami wszystkich najważniejszych badań, przeprowadzonych w ostatnich latach. W ostatniej części Autor skomentował nietypowe obserwacje uzyskane w trakcie badań. Rozdział ten pokazuje bardzo dobre przygotowanie Pana mgr Łukasza Lewandowskiego do prowadzenia dyskusji naukowych. Dowodzi także umiejętności krytycznej oceny wyników własnych badań w świetle współczesnych doniesień naukowych i świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta.

Najważniejsze przesłanki wynikające z przeprowadzonych badań Doktorant ujął w trzynastu odpowiednio sformułowanych wnioskach, które korespondują z wytyczonymi celami badania. Moim zdaniem jedną z najcenniejszych obserwacji jest wykazanie możliwego związku polimorfizmu rs4880 genu *SOD2* z szansą występowania otyłości. Otrzymane wyniki są wartościowe i mają duże znaczenie poznawcze oraz potencjalne znaczenie kliniczne.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam uwagi, które nasunęły mi się w trakcie czytania rozprawy:

- uwagę zwraca duża różnica w liczebności i wieku poszczególnych grup, a także niejednorodny stosunek ilościowy kobiet do mężczyzn czy osób narażonych/nienarażonych na dym tytoniowy. Należy jednak podkreślić, że Doktorant odniósł się krytycznie do wpływu tych ograniczeń na wykrycie istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami (podrozdział 5.1). Co więcej, starał się wyeliminować wpływ niepożądanych czynników poprzez zastosowanie odpowiednich analiz statystycznych. Ponadto zaproponował „ostrożne podejście do wysuniętych w tej pracy wniosków” oraz stwierdził, że „Obserwacje wysnute w niniejszej pracy powinny, bezwzględnie, zostać potwierdzone w przyszłych badaniach naukowych.” (str. 173).

- w analizie zmienności stężenia insuliny oraz aktywności/stężenia dysmutazy ponadtlenkowej uwzględniono narażenie na dym tytoniowy jako jeden z czynników mogących wpływać na wartości tych parametrów. Chociaż udział narażenia na dym tytoniowy w rozwoju stresu oksydacyjnego i zaburzeniu równowagi pro-antyoksydacyjnej jest już dostatecznie udowodniony, to wydaje się że krótkie omówienie tego zagadnienia we *Wstępie* byłoby koniecznym uzupełnieniem wprowadzenia w tematykę badawczą.

- uwagi dotyczące części *Materiały i metody*:

-- nie opisano metodyki oznaczania poziomu hemoglobiny glikowanej, który, jak podaje Autor w części *Cele* (str. 37) oraz *Wyniki* (str.79), był oznaczany we krwi pełnej u osób chorujących na cukrzycę typu drugiego.

-- istnieje pewna niejasność dotycząca metodyki oznaczania stężenia cholesterolu frakcji HDL. Na str. 39 (*Spis wykorzystanych odczynników*) Doktorant napisał, że wykorzystano zestaw do wytrącania cholesterolu frakcji LDL i VLDL (Biomaxima, nr kat. 1-030-0060). W podrozdziale 3.2.4.2 (str.49) „Oznaczenie stężenia cholesterolu frakcji HDL metodą bezpośrednią”, w opisie szczegółowej metodyki, Autor podał, że „Stężenie bezpośredniego cholesterolu frakcji HDL (HDL-Chol) oznaczono w surowicy, z użyciem zestawu firmy

Biomaxima (nr kat. 1-030-0060)". Spis użytych odczynników i szczegółowy opis postępowania wskazuje natomiast na oznaczenie cholesterolu frakcji HDL metodą strąceniową, przy zastosowaniu zestawu firmy Biomaxima (nr kat. 1-030-0200).

-- warto byłoby uzupełnić badanie profilu lipidowego uczestników badania o określenie poziomu cholesterolu nie-HDL. Współcześnie przyjmuje się, że cholesterol nie-HDL jest niezwykle istotnym parametrem profilu lipidowego pacjenta i powinien być prezentowany we wszystkich rutynowych profilach lipidowych. Dodatkowo parametr ten można obliczyć bezpośrednio z wartości tych parametrów lipidowych, które Doktorant wyznaczył, bez ponoszenia dodatkowych kosztów.

-- istnieje pewna dysproporcja między bardzo szczegółowym opisem metodyki oznaczania np. stężenia wybranych parametrów biochemicznych czy aktywności/stężenia dysmutazy ponadtlenkowej, a bardziej ogólnym opisem metodyki genotypowania wybranych polimorfizmów. Chociaż Doktorant zamieścił informację, że „reakcję PCR przeprowadzono zgodnie z protokołem otrzymanym od producentów mieszanin reakcyjnych (35 – 40 cykli).” i „Stężenie starterów w mieszaninie reakcyjnej wynosiło ok. 0,6  $\mu$ M.” (str. 72) oraz scharakteryzował startery użyte w tej reakcji (Tabela 2) to jednak nie podał np. czasu trwania każdego etapu cyklu reakcji PCR. Podobnie, ogólnie opisał warunki rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji powstałych po zastosowaniu odpowiednich enzymów restrykcyjnych „Produkty PCR po restrykcji rozdzielano w żelu agarozowym Syngen Daily Agarose, nr kat. SY521011 (2,0% – 4,0% agarozy, w zależności od potrzebnej rozdzielczości)”. (str.72). Brakuje też informacji o użytych próbkach kontrolnych.

- uwagi dotyczące części *Wyniki*:

-- w tabeli 13 brakuje informacji (w postaci indeksów literowych) między którymi grupami mężczyzn zaobserwowano istotną różnicę w stężeniu izoenzymu SOD3 [ng/mg białka całk.]. W treści pracy taką informację podano (str. 105).

-uwagi dotyczące podrozdziału 4.12 *Podsumowanie wyników*:

-- Doktorant w punkcie 3 (str. 168), zawarł informację o występującej u kobiet różnicy stosunku stężeń SOD2/SOD3 u osób diabetycznych, w odniesieniu do grup: porównawczej, otyłej niediabetycznej, mimo tego, że różnica ta nie była istotna statystycznie. Nie podał natomiast informacji na temat istotnej statystycznie różnicy zaobserwowanej u kobiet dla stosunku stężeń białek SOD2/SOD1 (przedstawionej w tabeli 12 i opisanej na str. 103).

-- na str.169 Autor napisał „Mężczyźni, w odniesieniu do kobiet: Wyższy udział Cu,Zn-SOD w całkowitej aktywności SOD (grupa porównawcza)”, natomiast w tabeli 14 przedstawione

wartości parametru Cu,Zn-SOD [% całkow.akt.SOD] wskazują na niższy udział Cu,Zn-SOD u mężczyzn niż u kobiet.

-- na str. 170 pkt.6 Doktorant podsumowuje: „Osoby o genotypie A/C, w odniesieniu do A/A: większe stężenie SOD3 (grupa porównawcza, SNP SOD1 rs2234694)”, a w treści podrozdziału 4.8.3 (str.137) pisze „W grupie porównawczej (P)..... Osoby o genotypie A/C charakteryzowało niższe stężenie SOD3 niż osoby o genotypie A/A.”, co jest zgodne z wartościami podanymi w tabeli 29.

-- na str.171 w punkcie 7 Autor napisał: Osoby o genotypie A/C, w odniesieniu do osób o genotypie A/A: mniejsze stężenie insuliny oraz mniejsze wartości HOMA-IR (grupa otyła, niediabetyczna oraz grupa diabetyczna, SNP SOD1 rs2234694)”, a w treści podrozdziału 4.8.6 (str.153) podał „Co ciekawe, w grupie otyłej, diabetycznej (A), u osób o genotypie A/C zaobserwowano mniejsze stężenie insuliny oraz mniejsze wartości wskaźnika HOMA-IR, w odniesieniu do osób o genotypie A/A. W grupie diabetycznej (B+C), efekt był odwrotny – osoby o genotypie A/A wykazywały mniejsze wartości wspomnianych parametrów.”, co jest zgodne z wartościami podanymi w tabeli 39.

W pracy występują też inne drobne błędy, na przykład:

- na str.103 - ”Różnice w stosunku stężeń białka SOD2/SOD1, występują między grupami: P oraz B ( $p < 0,0001$ ), K oraz C ( $p < 0,0001$ )”.

- w części *Spis rycin*: dwie ryciny mają identyczny tytuł (rycina 22 i 24), chociaż w tekście pracy tytuły tych rycin są podane właściwie.

- wyjaśnienie znaczenia terminu *in silico* podano na str. 72, mimo że po raz pierwszy zastosowano ten termin na str. 70.

Pragnę podkreślić, że uwagi te nie umniejszają istotnej wartości merytorycznej ocenianej rozprawy.

Podsumowując, rozprawa Pana mgr Łukasza Lewandowskiego pt. „Wybrane polimorfizmy genów kodujących insulinę oraz izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej, w populacji osób otyłych i/lub chorujących na cukrzycę typu drugiego” podejmuje ciekawy i aktualny problem badawczy. Uzyskane wyniki mają dużą wartość poznawczą i poszerzają wiedzę dotyczącą wpływu czynników genetycznych na osobniczą podatność na rozwój cukrzycy typu drugiego i otyłości. Niniejsza obszerna rozprawa doktorska dowodzi głębokiej wiedzy, zaangażowania i pracowitości Doktoranta, a także posiadania umiejętności w zakresie współczesnej metodyki badawczej. Wnikliwa analiza wyników, rzeczowa i

krytyczna dyskusja oraz przedstawione wnioski świadczą o dojrzałości naukowej Pana mgr Łukasza Lewandowskiego.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, w mojej opinii, spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom dla uzyskania stopnia naukowego doktora. Dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Lewandowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków 09.09.2020

Zakład Analityki Biochemicznej UJCM  
  
dr hab. Małgorzata Knapik-Czyżka  
kierownik