



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

ZAKŁAD BIOLOGII MEDYCZNEJ

al. Powstańców Wlkp. 72, MCD1

70-111 Szczecin, Poland

Tel: + 48 91466 1866; Fax: +48 91466 1788

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Pydyn zatytułowanej

„Rola białka MCPIP1 w utrzymaniu homeostazy

wątroby oraz rozwoju niealkoholowej

stłuszczeniowej choroby wątroby”

W zgłoszonej mi do recenzji pracy doktorskiej mgr **Pani Natalia Pydyn** przedstawia wyniki badań przeprowadzonych zarówno na modelach *in vitro*, jak i *in vivo*, w których analizowała zmiany w ekspresji białka Mcpip1 wywołane nadmierną akumulacją lipidów w hepatocytach. Ponadto, autorka badała rolę białka Mcpip1 w utrzymaniu homeostazy komórkowej oraz w rozwoju niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD). Jest to zagadnienie bardzo ważne, gdyż częstotliwość występowania otyłości na świecie zwiększyła się prawie trzykrotnie w przeciągu ostatnich 40 lat i przyrost ten jest coraz bardziej dynamiczny. Ocenia się, że u ponad 70% osób otyłych współistnieje niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (ang. Non-alcoholic Fatty Liver Disease). Według ostatnich analiz problem ten dotyczy około 900 milionów ludzi stanowiąc istotne obciążenie dla systemów ochrony zdrowia na całym świecie. Chociaż u większości pacjentów z NAFLD choroba ma łagodny przebieg, to jednak u około 25% z nich dochodzi do progresji choroby do niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NASH). U tych pacjentów oprócz nadmiernej akumulacji tłuszczu, występuje chroniczny stan zapalny, przejawiający się podwyższonym poziomem cytokin prozapalnych oraz zwiększoną infiltracją makrofagów. Ciągła progresja tej choroby, może ostatecznie doprowadzić do marskości tego narządu oraz raka wątrobowokomórkowego, który jest coraz częściej rozpoznawany w tej grupie pacjentów, nawet u tych, u których nie doszło jeszcze do rozwoju marskości wątroby. Mimo toczących się licznych, wielośrodkowych badań jak dotąd nie dysponujemy skuteczną terapią farmakologiczną NAFLD, i aktualne leczenie opiera się na preparatach stosowanych w leczeniu innych komponentów zespołu metabolicznego.

Doktorantka skupiła swoje badania na roli nowo opisanego białka Mcpip1, które jest indukowane przez czynnik chemotaktyczny monocytów 1 (MCP-1). Białko to kodowane przez gen Zc3h12a jest rybonukleazą,

które degradując mRNA cytokin prozapalnych odgrywa istotną rolę w modulowaniu wrodzonych odpowiedzi immunologicznych. Oprócz dobrze poznanej przeciwzapalnej roli MCP1, białko to jest również ważnym czynnikiem modulującym wrażliwość na insulinę oraz metabolizm lipidów w adipocytach.

W kontekście powyższego temat podjęty przez doktorantkę jest aktualny, ciekawy i bardzo ważny zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Znalezienie związku, który skutecznie i specyficznym modulowałby akumulację tłuszczów w hepatocytach oraz hamował zaindukowany stan zapalny mogłoby zwiększyć skuteczność leczenia NAFLD.

Rozprawa doktorska Pani Natalii Pydyn liczy 157 stron maszynopisu, w tym 29 rycin oraz 19 tabel. Wykaz stosowanych skrótów i symboli jest dobrze przygotowany i ułatwia lekturę pracy. Rozprawa ma typowy układ, na który składają się: *Wstęp*, *Cel Pracy*, *Materiały i Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja* oraz krótkie, przedstawione w punktach *Wnioski końcowe*. Dodatkowo na końcu rozprawy znajduje się osobny rozdział *Dane uzupełniające* zawierający jedną tabelę oraz 4 ryciny. Całość poprzedzona jest spisem treści, polskim i angielskim streszczeniem oraz wykazem stosowanych skrótów, a zakończona piśmiennictwem. Cytowane piśmiennictwo to 152 pozycje. Na uwagę zasługuje fakt, że w większości są to artykuły anglojęzyczne opublikowane po 2000 roku w renomowanych czasopismach zagranicznych. Zarówno kompozycja pracy jak i zawartość poszczególnych części jest prawidłowa.

Liczący 20 stron *Wstęp* jest poprawnie skomponowany, dobrze wprowadza w tematykę badań i uzasadnia celowość ich podjęcia. *Wstęp* rozpoczyna się od szczegółowego opisu etiologii i patogenezы NAFLD. Następnie omówione są molekularne mechanizmy rozwoju NAFLD, a także terapie, które próbuje się zastosować w tej jednostce chorobowej. Szczególna uwaga skupiona została na prezentacji modeli *in vitro* i *in vivo*, które są wykorzystywane w celu zbadania szlaków sygnałowych biorących udział w rozwoju stłuszczenia wątroby. W drugiej części *Wstępu* doktorantka starannie scharakteryzowała budowę i regulację ekspresji białka MCP1. Kolejne podrozdziały przedstawiają obecną wiedzę na temat roli tego białka w wielu procesach biologicznych, i to zarówno tych w obrębie układu immunologicznego jak i funkcjonujących poza tym układem, na przykład w adipocytach, hepatocytach czy komórkach śródbłonka. W omawianym rozdziale Doktorantka podaje wiele faktów i danych szczegółowych, opisy są jasne i logiczne co stanowi dużą zaletę. *Wstęp* zawiera szereg istotnych informacji, a dobór treści i sposób omawiania zagadnień potwierdzają bardzo dobrą orientację Doktorantki w tematyce badań. Wydaje mi się, że bardzo pomocne byłoby zamieszczenie w tej części pracy dodatkowych schematów na przykład jednego obrazującego metabolizm lipidów w hepatocytach czy też przedstawiającego rolę jakie pełni białko MCP1 w komórce. Na podkreślenie zasługuje fakt, że doktorantka nie cytuje we wstępie tylko prac przeglądowych (co jest wygodną praktyką wielu badaczy) ale sięga do prac źródłowych.

Główny cel pracy jest jasno sprecyzowany i dotyczy wyjaśnienia roli MCP1 w metabolizmie lipidów i w utrzymaniu homeostazy wątroby. Cele szczegółowe pracy są zogniskowane wokół oceny poziomu oraz wpływu MCP1 na białka zaangażowane w metabolizm lipidów w hepatocytach stymulowanych oleinianem

sodu lub wyizolowanych z mysz, u których eksperymentalnie zaindukowano stłuszczenie wątroby. Kolejnym celem było zbadanie wpływu tkankowej delecji genu *Mcpip1* na homeostazę wątroby i zbadanie wpływu tej delecji na rozwój niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby.

Rozdział *Materiały i metody* jest napisany bardzo starannie. Oprócz dokładnych opisów metodyki doświadczeń autorka bardzo precyzyjnie określa źródła pozyskiwania odczynników. Wszystkie te detale świadczą o zaangażowaniu i dużym doświadczeniu w pracach badawczych doktorantki. Zbadanie wybranych przez doktorantkę zagadnień wymagało zastosowania wielu nowoczesnych technik biologii molekularnej wliczając w to między innymi zahamowanie metylacji białek w liniach komórkowych, czy uzyskanie myszy z delecją genu *Zc3h12a* kodującego białko *Mcpip1* w mieloidalnych leukocytach (*Mcpip1^{fl/fl}LysM^{Cre}*) lub komórkach epitelialnych wątroby (*Mcpip1^{fl/fl}Alb^{Cre}*). Zastosowana w pracy metodyka jest imponująca, dobór jest prawidłowy, a doświadczenia zostały przeprowadzone w sposób pozwalający na uzyskanie wiarygodnych wyników.

W kolejnym rozdziale *Wyniki* autorka opisała rezultaty swoich badań. Przedstawiła je w sposób wyczerpujący. Rozdział zawiera liczne ryciny podsumowujące i obrazujące uzyskane wyniki.

W *Dyskusji* obejmującej 19 stron doktorantka przedstawiła zebrany przez siebie materiał na tle badań innych zespołów naukowych zajmujących się podobną problematyką badawczą. Ta część pracy została przez panią mgr Natalię Pydyn opracowana niezwykle drobiazgowo i skrupulatnie, tak aby czytelnik nie miał wątpliwości co do zasadności sformułowanych przez nią wniosków. Dyskusję kończy lista najważniejszych wyników wykonanych analiz wyodrębniona w osobny rozdział pod mylącym tytułem *Wnioski*. Moim zadaniem ta część pracy wymaga pewnej korekty, gdyż brakuje w tej części pracy jasno określonych wniosków wynikających z wyników bardzo ciekawych prac badawczych doktorantki.

Wypełniając obowiązki recenzenta muszę nadmienić, że autorka nie ustrzegła się kilku błędów edytorskich czy stylistycznych, jednocześnie pragnę nadmienić, że wymienione poniżej niedociągnięcia w żadnym stopniu nie obniżają wartości merytorycznej niniejszej rozprawy.

1. na stronie 20 znajduje się referencja poza kolejnością pojawiania się w tekście (66)
2. strona 21: „Nieinwazyjnym sposobem diagnozy NAFLD jest badanie ultrasonograficzne” proszę wspomnieć o elastografii z opcją CAP, która jest już powszechnie stosowana w nieinwazyjnej ocenie stłuszczenia wątroby
3. strona 22: ostatnie zdanie dodać "w" przed wyrazem „hepatocytach”
4. strona 30: czy referencja 79 jest prawidłowa?
5. strona 83 i 85 opis osi Y na rycinie 16B i 17E: czy faktycznie jest to % z kontroli, różnica pomiędzy badanymi grupami to tylko 1%?
6. strona 92 i 103 opis tabeli 18 i 19: nie podano w stosunku do jakiej grupy wartości P oznaczone jako *, ** czy *** są statystycznie istotne.

7. strona 126, rycina 29: schemat ilustruje fenotyp myszy delecją genu *Zc3h12a* w 12 tygodniu po karmieniu paszą kontrolną czy HFD? Rozumiem, że oznaczenia z lewej strony dotyczą komórek linii mieloidalnej, a z prawej komórek epitelialnych wątroby.
8. brakuje spisu rycin i tabel
9. jest w błąd w zapisie referencji nr16
10. czy jest konieczność umieszczenia zapisu [Internet] przy referencji 36 i 42 na stronie 131?

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że rozprawa doktorska przygotowana przez panią Natalię Pydyn jest bardzo wartościowa merytorycznie. Dysertacja stanowi istotny wkład w badania nad opracowaniem skutecznych metod zapobiegających rozwojowi NASH, a przygotowany i przebadany przez doktorantkę model myszy *Mcpip1^{fl/fl}Alb^{Cre}* z delecją *Mcpip1* w komórkach epitelialnych wątroby może w przyszłości posłużyć jako organizm modelowy, wykorzystywany w badaniach nad etiologią pierwotnego zapalenia dróg żółciowych.

Stwierdzam więc, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie wymagane warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Natalię Pydyn do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie proponuję wyróżnić pracę doktorską emfazą *summa cum laude*.

Z poważaniem,

Margareta Millerowa