



Olsztyn, dnia 04.04.2021 r.

Prof. dr hab. Elżbieta Kostyra  
Katedra Biochemii  
Zespół Biochemii Medycznej  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski  
W Olsztynie

## Recenzja

**Rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Czumaj  
pt. „Zmiany metabolizmu lipidów w hepatocytach i adipocytach indukowane zaburzeniami  
profilu kwasów tłuszczowych” wykonanej pod kierunkiem  
dr hab. Tomasza Śledzińskiego**

Praca doktorska pt. „Zmiany metabolizmu lipidów w hepatocytach i adipocytach indukowane zaburzeniami profilu kwasów tłuszczowych” powstała w oparciu o cykl artykułów opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych takich jak: *Metabolites* (2020), *Nutrients* (2020), *International Journal of Molecular Sciences* (2019), *Lipids* (2018). Łączna wartość IF prezentowanych prac wynosi 15,886, natomiast punktacja przyznana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego dotycząca wszystkich załączonych prac wynosi 375 punktów.

Przedstawiona do oceny dysertacja została wykonana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki (OPUS 6 2013/11/B/NZ5/00118) oraz projektu POWR.03.02.00-00-I026/17-00 (POWER 2) współfinansowanego ze środków Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Oceniana praca została przedstawiona w formie opracowania autorskiego (29 stron), w języku polskim i angielskim. Opracowanie rozpoczyna spis treści, następnie wyjaśnienie używanych skrótów, wstęp wprowadzający w temat, cel pracy, opis najważniejszych wyników badań, wnioski oraz wybrane pozycje piśmiennictwa (227 pozycji literaturowych) plus załączniki.

Analizując ocenę publikacji (trzy prace badawcze, jedna przeglądowa), uważam, że odrębna ocena recenzenta jest zbędna, ponieważ każda z publikacji była szczegółowo przeanalizowana przez wydawniczych recenzentów pod kątem stawianym pracom oryginalnym i były również poddane ocenie merytorycznej. Dlatego w przypadku



przedstawionej pracy doktorskiej w formie publikacji, rolą recenzentki jest określenie wkładu indywidualnego Doktorantki, tym bardziej, że w pracach występują współautorzy. Należy jednak podkreślić, że Pani A. Czumaj jest pierwszym autorem w trzech pracach, a drugim autorem – w jednej (załączone publikacje).

Autorzy, tytuł publikacji, czasopismo	Punktacja MNiSW	IF	Q
Korczyńska, J., Czumaj, A., Chmielewski, M., Śledziński, M., Mika, A., Śledziński, T. (2020). Increased Expression of the Leptin Gene in Adipose Tissue of Patients with Chronic Kidney Disease–The Possible Role of an Abnormal Serum Fatty Acid Profile. <i>Metabolites</i> , 10(3), 98	70.000	4.097	Q2
Czumaj, A., & Śledziński, T. (2020). Biological role of unsaturated fatty acid desaturases in health and disease. <i>Nutrients</i> , 12(2), 356.	140.000	5.089	Q1
Czumaj, A., Śledziński, T., Carrero, J. J., Stepnowski, P., Sikorska-Wisniewska, M., Chmielewski, M., & Mika, A. (2019). Alterations of fatty acid profile may contribute to dyslipidemia in chronic kidney disease by influencing hepatocyte metabolism. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 20(10), 2470.	140.000	4.556	Q1
Czumaj, A., Mika, A., Chmielewski, M., & Sledzinski, T. (2018). Cyclopropanoic Acid 2-Hexyl Upregulates the Expression of Genes Responsible for Lipid Synthesis and Release in Human Hepatic HepG2 Cells. <i>Lipids</i> , 53(3), 345-351.	25.000	2.144	Q3

Autorka, do opublikowanych artykułów, dołączyła oświadczenie, w którym współautorzy określili swoje zaangażowanie w wykonaniu badań i przygotowaniu manuskryptów. Treść oświadczenia potwierdza wiodącą rolę Doktorantki w wykonaniu badań oraz opracowaniu wyników i przygotowaniu publikacji do druku.

Celem pracy było określenie profilu kwasów tłuszczowych zarówno pod względem ilościowym jak i jakościowym w surowicy pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (CKD) i porównanie go do profilu FA ludzi zdrowych. Doktorantka podjęła się również określenia wpływu zmiennego profilu FA na poziom ekspresji wybranych genów biorących udział w metabolizmie kwasów tłuszczowych w hepatocytach (wątroba) i adipocytach (tkanka tłuszczowa).

Badania podjęte przez Panią Magister są bardzo ważne z punktu widzenia poznawczego, ale również można się dopatrzeć wartości aplikacyjnych. Tym bardziej, że przewlekłe choroby nerek prowadzą do bardzo przykrych konsekwencji – czyli zgonów, w Polsce i na świecie. W Polsce choruje na choroby metaboliczne około 6% populacji, a na świecie 14%. Następstwem CKD jest kilkukrotnie wyższe obciążenie pacjentów towarzyszącymi chorobami sercowo-naczyniowymi w porównaniu do ludzi zdrowych, z prawidłową funkcją nerek. W literaturze światowej wymienia się jako główną przyczynę



zwiększającego się ryzyka chorób sercowo-naczyniowych nieprawidłowy profil lipidów i adipokiny w surowicy ludzi chorych na choroby metaboliczne. Zaburzenia w profilu lipidów (FA) obserwuje się już we wczesnych etapach chorób metabolicznych. Do wcześniej obserwowanych powikłań u pacjentów chorych na CKD należy dyslipidemia, niski poziom HDL i wysoki poziom triacylogliceroli (TAG). Stwierdza się też (na podstawie badań Doktorantki i literatury) obniżenie poziomu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych PUFA n-3 i PUFA n-6 oraz podwyższeniem poziomu MUFA (jednonienasyconych kwasów tłuszczowych).

Ze względu na złożoność celów i badań, Pani A. Czumań podzieliła badania na etapy związane z pracami badawczymi, które zostały załączone do dysertacji.

W etapie pierwszym swoich badań Doktorantka określiła profil i zawartość FA w surowicy u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek w porównaniu do profilu i zawartości FA w surowicy ludzi zdrowych. Zmiany, jakie zaobserwowano, można opisać jako zmniejszenie zawartości MUFA, PUFA n-3 i PUFA n-6 wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby. Dlatego jednym z pierwszych zadań badawczych realizowanych w dysertacji, była ocena konsekwencji zmiennego profilu kwasów tłuszczowych na modelu *in vitro*. Komórki HepG2 traktowane były przez okres 48 godzin kwasami tłuszczowymi: kwasem oleinowym (OA), DHA i AA, reprezentującymi kolejno kwasy jednonienasycone i wielonienasycone. Hodowle komórkowe HepG2 potraktowane zostały stężeniami eksperymentalnymi (25  $\mu\text{mol}$ , 50  $\mu\text{mol}$ , i 100  $\mu\text{mol}$ ). Otrzymane wyniki były zgodne z danymi literaturowymi, różniąc się profilami poszczególnych kwasów tłuszczowych w surowicy osób chorych na CKD w porównaniu do profilu FA w surowicy ludzi zdrowych – czyli zwiększenie MUFA, a zmniejszenie ilości PUFA n-3 i PUFA n-6. Aby określić zmienny wpływ oznaczanych profili kwasów tłuszczowych w metabolizmie, postanowiono zbadać poziom ekspresji wybranych genów. Hodowla komórek inkubowana z poszczególnymi kwasami tłuszczowymi spowodowała znaczący wzrost poziomu mRNA genów kodujących enzymy zaangażowane w syntezę i desaturację kwasów tłuszczowych. Stwierdzono podwyższony poziom mRNA dla białka wiążącego – czynnika transkrypcyjnego SREBP1, promującego syntezę lipidów. Jedynym genem, dla którego obserwowano obniżenie poziomu mRNA, była elongaza 6 (ELOVL6). W przypadku przeanalizowanych genów obserwowano efekty zależne od stosowanej dawki FA. Otrzymane wyniki wskazują na zmienny profil FA w surowicy u pacjentów z CKD, które mogą prowadzić do zwiększonej syntezy triacylogliceroli i ich uwalnianie w postaci VLDL z wątroby. Biorąc pod uwagę, że jednonienasycone kwasy są głównymi kwasami tłuszczowymi w triacyloglicerolach, ich podwyższony poziom w surowicy chorych na CKD sprzyja zwiększonej produkcji i uwalnianiu lipidów z wątroby, co prowadzi do zmian w profilu tłuszczowym surowicy u tych osób. Przypuszcza się, że jest to jeden z mechanizmów przyczyniających się do zmian profilu FA w surowicy chorych na CKD, co może prowadzić do hipertriglicydemii. Zwiększony poziom TAG jest jednym z czynników ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych.



Jednym z głównych osiągnięć zespołu Katedry Biochemii, w tym Doktorantki, jest wykrycie i określenie poziomu kwasu tłuszczowego FA z grupą cykliczną kwasu metylenoheksadekanowego (CPOA2H). Aby udowodnić rolę kwasu CPOA2H, przeprowadzono badania na hodowlach komórkowych HepG2 i 3T3-L1 (model hepatocytów i adipocytów). W celu zweryfikowania danych literaturowych, była przeprowadzona hodowla komórek w różnych stężeniach kwasu metylenoheksadekanowego, występującego u ludzi z chorobą CKD. Otrzymane wyniki stężenia CPOA2H wpłynęły na poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za metabolizm lipidów. Stwierdzono zwiększony poziom ekspresji genów związanych z syntezą i uwalnianiem lipidów, a szczególnie podwyższony poziom ekspresji genu (poziom mRNA) – syntazy kwasów tłuszczowych. Podobne doświadczenie przeprowadzono na adipocytach (linia 3T3-L1), gdzie po upływie 48 godzin został oceniony poziom ekspresji wybranych genów. Okazało się, że poziom mRNA większości genów, związanych z syntezą lipidów, został obniżony lub pozostał bez zmian. Otrzymane wyniki sugerują o wpływie kwasu metylenoheksadekanowego na stężenie lipidów w surowicy pacjentów z CKD. Autorka zauważyła, że główna synteza kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli (TAG) zachodzi w wątrobie, a nie w tkance tłuszczowej. Obniżenie ekspresji genów w adipocytach w tkance tłuszczowej może odgrywać drugorzędą rolę w lipogenezie. W adipocytach zaobserwano również zwiększenie ekspresji genu leptyny pod wpływem CPOA2H. Podwyższony poziom kwasu metylenoheksadekanowego u pacjentów z CKD nie tylko przyczynia się do zwiększenia stężenia TAG, ale także do zwiększenia poziomu leptyny. U pacjentów z otyłością stwierdza się zwiększony poziom leptyny, który można korelować z podwyższoną ilością tego kwasu.

Podsumowując wyniki w recenzowanej przeze mnie pracy można wysunąć następujące wnioski:

- Zaburzenia profilu kwasów tłuszczowych w wątrobie powodują wzrost jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) i obniżenie poziomu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych występujących u pacjentów z CKD, co pociąga za sobą poważne zaburzenia metabolizmu lipidów w hepatocytach, prowadząc do zwiększenia ekspresji genów zaangażowanych w syntezę i uwalnianie lipidów.

- Wzrost poziomu CPOA2H stwierdzony został u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek, który prawdopodobnie jest odpowiedzialny za zaburzenia metaboliczne w wątrobie. Natomiast w adipocytach wzrost poziomu kwasu metylenoheksadekanowego prowadzi również do zwiększenia ekspresji genu leptyny, co przyczynia się do zwiększenia poziomu tego hormonu u pacjentów z CKD.

Pragnę podkreślić, że doktorantka zrealizowała cel badawczy oraz prawidłowo przygotowała dysertację, co daje podstawę o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora. Pani Aleksandra Czumaj dowiodła również, że posiada umiejętności prowadzenia badań naukowych z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych. Złożona dysertacja dowodzi o dużej samodzielności myślowej oraz głębokiej refleksji nad uzyskanymi wynikami





badania, co świadczy o dużej wiedzy autorki. Każdy przeprowadzony eksperyment był szeroko analizowany i komentowany na tle wyników badań innych autorów. Podkreślić należy przy tym umiejętność Pani Magister w doborze i właściwym cytowaniu materiałów źródłowych, szerokiej weryfikacji stawianych hipotez i wszechstronnej analizie uzyskanych wyników. Niemniej jednak szczegółowa analiza ujawniła, że Doktorantka nie ustrzegła się pewnych uchybień, które chciałabym przedstawić w formie uwag i pytań.

### **Pytania i uwagi do rozprawy:**

- W pracy brakuje rozdziału Materiały i Metody, który uzupełniłby brakujące informacje odnośnie przeprowadzonych analiz.
- Pani Magister Aleksandra Czumaj nie uniknęła drobnych błędów stylistycznych oraz interpunkcyjnych. Chciałabym również zwrócić uwagę na przygotowanie rysunków, które w niektórych przypadkach były niewystarczająco czytelne.
- Proszę Doktorantkę o uzasadnienie, czy poziom kwasu metylenoheksadekanowego może stanowić czynnik prognostyczny, świadczący o zaawansowaniu choroby CKD?
- Leptyna to hormon wytwarzany głównie w białej tkance tłuszczowej, odgrywający ważną rolę w regulacji pobierania pokarmu i gospodarki energetycznej organizmu. Niewątpliwie związek ten jest przedmiotem badań wielu zespołów badawczych. I tu pojawia się moje pytanie – skąd tak ogromne zainteresowanie Doktorantki leptyną? Czy są zaplanowane już kolejne badania, których efekty mogłyby uzupełnić wciąż istniejącą lukę w wiedzy na temat działania tego niezwykle interesującego hormonu w ciele człowieka?
- Według doniesień z wielu ośrodków badawczych, odpowiedź komórek wchodzących w skład linii komórkowych *in vitro*, może istotnie różnić się w zależności od aktualnego pasażu. W związku z tym jestem ciekawa, w którym pasażu były komórki HepG2 podczas wykonywania analizy ekspresji genów oraz techniki Western-Blott? Czy były sprawdzane różnice pomiędzy stanem fizjologicznym komórek hodowanych w różnych pasażach?
- Wiadomo, że geny referencyjne uczestniczą w regulacji podstawowych funkcji w komórce, a ich ekspresja powinna być względnie niezmienna. Umożliwia to stosowanie tych genów jako odniesienia do określenia poziomu ekspresji badanych genów w komórce. Zastanawiam się na jakiej podstawie Doktorantka zdecydowała się na wykorzystanie genów referencyjnych w swoich badaniach, używając np. kombinacji genu beta-aktyny i cyklofiliny A. Czy były to dane pochodzące z badań optymalizacyjnych, doniesień naukowych, czy też zdecydowały o tym może inne czynniki?

Przytoczone uwagi mają charakter uzupełniający i nie wpływają na ocenę merytoryczną pracy doktorskiej.



**Wniosek końcowy:**

Stwierdzam również, że rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Czumaj pt.: „Zmiany metabolizmu lipidów w hepatocytach i adipocytach indukowane zaburzeniami profilu kwasów tłuszczowych” odpowiada warunkom określonym w artykule 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DZ.U. z 2014 r., poz. 1852 ze zm. W dz. U. z 2005 r. poz. 249) i przedstawiam Wysockiej Radzie Nauk Farmaceutycznych GUMeD wniosek o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Czumaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, 11.04.2021 r.

  
Prof. dr hab. Elżbieta Kostyra



---

Olsztyn, dnia 04.04.2021 r.

Prof. dr hab. Elżbieta Kostyra  
Katedra Biochemii  
Zespół Biochemii Medycznej  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski  
w Olsztynie

**Wniosek dotyczy Pani mgr Aleksandry Czumaj**

Tytuł pracy doktorskiej: *„Zmiany metabolizmu lipidów w hepatocytach i adipocytach indukowane zaburzeniami profilu kwasów tłuszczowych”*

**WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ**

Niniejszy zwracam się z wnioskiem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

**UZASADNIENIE:**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska powstała w oparciu o cykl publikacji w międzynarodowych czasopismach naukowych, takich jak: *Metabolites* (2020), *Nutrients* (2020), *International Journal of Molecular Sciences* (2019), *Lipids* (2018). Łączna wartość IF prezentowanych prac wyniosła 15,886, natomiast łączna punktacja MNiSW to 375 punktów.

Doktorantka zrealizowała cel badawczy oraz prawidłowo przygotowała dysertację. Pani Aleksandra Czumaj dowiodła również, że posiada umiejętności prowadzenia badań naukowych z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych. Złożona dysertacja dowodzi o dużej samodzielności myślowej oraz głębokiej refleksji nad uzyskanymi wynikami badań, co świadczy o dużej wiedzy autorki. Każdy przeprowadzony eksperyment był szeroko analizowany i komentowany na tle wyników badań innych autorów. Podkreślić należy przy tym umiejętność Pani Magister w doborze i właściwym cytowaniu materiałów źródłowych,



---

szerokiej weryfikacji stawianych hipotez i wszechstronnej analizie uzyskanych wyników. Badania podjęte przez Panią Magister są bardzo ważne z punktu widzenia poznawczego, ale także można dopatrzeć się wartości aplikacyjnych.

Pani mgr A. Czumaj swoimi badaniami przyczyniła się do lepszego poznania procesów metabolicznych lipidów zachodzących w wątrobie i tkance tłuszczowej ludzi, co może skutkować opracowaniem nowych terapii. Zmienność poziomu kwasu metylenoheksadekanowego (CPOA2H) może stanowić ważny czynnik prognostyczny w przebiegu i leczeniu chorób występujących u ludzi z przewlekłą chorobą nerek.

  
prof. dr hab. Elżbieta Kostyra