

Łódź, 2021-09-23

Dr hab. n. med. Adam Gesing, profesor UM
Zakład Endokrynologii Starzenia
Katedra Endokrynologii Onkologicznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Magister inżynier Joanny Borkowskiej**

Tytuł rozprawy:

„Zmiany epigenetycznych modyfikacji DNA i ekspresji regulujących je enzymów
TET w procesie starzenia podskórnej tkanki tłuszczowej człowieka i izolowanych
z niej komórek macierzystych (ASC)”

Proces starzenia stanowi nieodłączną część życia człowieka i innych organizmów żywych. Dokładne poznanie mechanizmów związanych z tym niezwykle złożonym procesem biologicznym jest wciąż wyzwaniem dla współczesnej medycyny i szerzej pojętych nauk biologicznych. Wiadomo, iż do najważniejszych przyczyn starzenia zalicza się m.in. uszkodzenia DNA, uszkodzenia oksydacyjne białek, lipidów i kwasów nukleinowych, skracanie telomerów, nieprawidłową glikozylację i glikację oraz tzw. dryft epigenetyczny. Ta ostatnia przyczyna – najkrócej rzecz ujmując – polega na nagromadzeniu w ciągu całego życia osobniczego zmian w obrębie DNA i białek towarzyszących, wpływających na poziom ekspresji różnych genów, nie powodując jednocześnie mutacji w obrębie DNA. Do najważniejszych przyczyn epigenetycznych – prowadzących do „włączania” lub „wyłączania” poszczególnych genów – można zaliczyć m.in. rodzaj spożywanego pokarmu, wysiłek fizyczny czy stosowane używki, a więc *de facto* otaczające nas środowisko w szerokim tego słowa znaczeniu. Do jednej z najistotniejszych modyfikacji epigenetycznych zalicza się proces metylacji DNA, polegający na przyłączaniu się do cytozyny grupy metylowej oraz zjawisko odwrotne, tj. demetylację DNA, katalizowaną m.in. przez deaminazę cytozyny, glikozydazę tyminy czy białka TET (Ten-Eleven Translocation). Wiadomo, iż metylacja jest procesem dynamicznym, a praktycznie każda komórka żywego organizmu charakteryzuje się swoistym wzorem metylacji. W kontekście demetylacji DNA, jak również innych związanych z nią procesów biologicznych, ważną rolę odgrywają

wspomniane już powyżej białka TET, które – poprzez szereg przemian biochemicznych – przekształcają 5-metylocytozynę w cytozynę, prowadząc do usunięcia reszt metylowych w określonych fragmentach DNA (np. wyspach CpG promotorów określonych genów) i w konsekwencji do uaktywnienia zablokowanej wcześniej transkrypcji tych genów.

Z kolei, tkanka tłuszczowa to wciąż nie do końca poznana tkanka/organ o niezwykle istotnym potencjale metaboliczno-endokrynnym. Zwiększająca się z roku na rok liczba opisywanych adipokin i cytokin (także tych o potwierdzonym działaniu endokrynnym) potwierdza tylko słuszność podejmowanych badań naukowych, mających na celu coraz lepsze scharakteryzowanie tej tkanki z uwzględnieniem jej różnych rodzajów, a więc tkanki tłuszczowej podskórnej, trzewnej czy beżowej/brunatnej. Ocena funkcji tkanki tłuszczowej jest również niezwykle istotna w aspekcie procesu starzenia (ze szczególnym uwzględnieniem zmian mogących stanowić element dryftu epigenetycznego).

A zatem, badania podjęte przez Doktorantkę, dotyczące m.in. oceny zmian w poziomie metylacji DNA oraz ekspresji enzymów TET w tkance tłuszczowej podskórnej, a także w izolowanych z niej komórkach macierzystych uważam za w pełni zasadne.

Przedłożony mi do recenzji tekst pracy doktorskiej - zawarty na 129 stronach - został przygotowany w bardzo starannej edycji komputerowej.

Na początku rozprawy doktorskiej, Magister inżynier Joanna Borkowska zawarła „Spis treści”, „Spis tabel” oraz „Spis rycin”, a następnie bardzo szczegółowo przedstawiony „Wykaz skrótów”. W kolejnej części rozprawy zamieszczono streszczenia (w języku polskim i angielskim).

We „Wstępie”, będącym **pierwszym (I) rozdziałem** pracy doktorskiej, Autorka w bardzo interesujący sposób scharakteryzowała m.in. 1) mechanizmy związane z procesem starzenia, w tym rolę tkanki tłuszczowej oraz zasiedlających ją komórek progenitorowych, 2) epigenetyczne modyfikacje DNA, 3) enzymy TET i ich podział na 3 rodzaje oraz 4) dryft epigenetyczny dotyczący modyfikacji DNA.

„**Hipoteza i cel pracy**” (z przedstawieniem 6 celów szczegółowych) stanowiące treść kolejnego rozdziału, są opisane w klarowny sposób i nie budzą zastrzeżeń.

W rozdziale zatytułowanym „**Materiały i metody**”, Doktorantka w bardzo przejrzysty sposób (z wykorzystaniem kilku tabel) wyszczególniła m.in. listę buforów, odczynników, sprzętu oraz przeciwciał I- i II-rzędowych użytych w swoich badaniach. Zawarła także spis programów statystycznych i narzędzi internetowych oraz scharakteryzowała materiał biologiczny użyty do doświadczeń. Ponadto, Mgr inż. Joanna Borkowska bardzo szczegółowo opisała zastosowane przez siebie metody badawcze, w tym m.in. izolację i hodowlę komórek

ASC, izolację DNA, RNA i białek, analizę globalnego poziomu modyfikacji DNA czy identyfikację regionów różnicowo hydroksymetylowanych z wiekiem (DHMR).

- W podrozdziale dotyczącym opisu wykorzystanego do badań materiału biologicznego, Autorka podkreśliła, iż tkanka tłuszczowa podskórna została pobrana z okolic o ograniczonym narażeniu na promieniowanie słoneczne (pachwiny i okolica nadłonowa). Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić dlaczego zostało zastosowane takie kryterium? Czy może mieć to związek z potencjalnym wpływem witaminy D na analizowane przez Autorkę parametry badawcze? A jeżeli tak, to czy nie należałoby wcześniej oznaczyć stężenia witaminy D u zakwalifikowanych do badań pacjentów?

„Wyniki”, stanowiące kolejny rozdział rozprawy doktorskiej, zostały czytelnie opisane i przedstawione w bardzo przejrzysty sposób w formie jednej tabeli oraz 20 rycin (w większości kolorowych – m.in. licznych heatmap).

Uzyskane przez Mgr inż. Joannę Borkowską wyniki badań zostały w dojrzały sposób przedyskutowane w rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” (z wykorzystaniem bogatego piśmiennictwa). Rozdział ten może wręcz stanowić zarys interesującej pracy poglądowej.

Kolejny rozdział pt.: „Podsumowanie” syntetycznie podsumowuje wyniki badań i nie budzi zastrzeżeń.

Rozdział pt.: „Wnioski” przedstawia liczne konkluzje z przeprowadzonych badań. W tym miejscu pragnę jedynie zauważyć, iż końcowe wnioski zawsze lepiej przedstawić w formie kilku syntetycznych punktów szczegółowych oraz ewentualnie jednego wniosku ogólnego, niż przedstawiać je opisowo jako kolejny fragment tekstu.

Rozdział zatytułowany „Bibliografia” zawiera 255 pozycji piśmienniczych – praktycznie wyłącznie anglojęzycznych. Dobór piśmiennictwa jest w pełni poprawny i świadczy o szerokiej znajomości przez Doktorantkę literatury z zagadnień stanowiących tematykę rozprawy doktorskiej.

Na zakończenie, chciałbym poprosić Doktorantkę o przedstawienie uzasadnienia wyboru do badań rodzaju tkanki tłuszczowej. Dlaczego ten wybór padł akurat na tkankę tłuszczową podskórną? Przecież to przede wszystkim tkanka tłuszczowa trzewna – ze względu na jej generalnie niekorzystny wpływ na zdrowie człowieka i innych organizmów żywych – wydaje się być idealnym celem tego rodzaju badań (m.in. w zakresie analizy zmian epigenetycznych). Co więcej, w kontekście badań nad procesem starzenia i używanych w tych badaniach zwierzęcych modeli doświadczalnych, to właśnie tkanka tłuszczowa trzewna mogłaby być bardziej interesującym wyzwaniem badawczym. Wiadomo bowiem, iż długo żyjące karłowate myszy: 1) Ames dwarf, charakteryzujące się spontaniczną recesywną

mutacją somatyczną w zakresie czynnika Prop 1 (Prop 1^{df}) [prowadzącą m.in. do całkowitego braku produkcji hormonu wzrostu (GH)] oraz 2) GHRKO (z wyłączonym genem dla receptora GH) są bardziej otyłe i mają m.in. więcej tkanki tłuszczowej trzewnej niż myszy normalne, a mimo to są bardziej insulinowrażliwe w porównaniu do myszy z prawidłowo funkcjonującą osią somatotropinową. Mógłby to być zatem jeden z kolejnych możliwych kierunków badań naukowych realizowanych w przyszłości przez Doktorantkę.

Reasumując, pragnę podkreślić, iż bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską Magister inżynier Joanny Borkowskiej. Bardzo duże wrażenie na czytającym wywiera wielość zastosowanych metod badawczych, duża oryginalność uzyskanych wyników badań, sposób ich prezentacji i ich bezsporne nowatorstwo. Badania te zostały prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone, a uzyskane wyniki przedyskutowane w bardzo dojrzały sposób. A zatem, przedłożona rozprawa doktorska w pełni potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę.

W związku z powyższym stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i niniejszym zwracam się z uprzejmym wnioskiem do Wysokiej Komisji ds. Przewodów i Postępowań Doktorskich Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława J. Mossakowskiego PAN w Warszawie o dopuszczenie Magister inżynier Joanny Borkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, uwzględniając – wspomnianą przeze mnie powyżej – dużą oryginalność i nowatorstwo uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań, zwracam się jednocześnie do Wysokiej Komisji ds. Przewodów i Postępowań Doktorskich Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława J. Mossakowskiego PAN w Warszawie z wnioskiem o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK
Zakładu Endokrynologii Starzenia
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
A. Gesing
Dr hab. n. med. prof. nadzw. Adam Gesing