



INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, tel.: (+48 89) 523-46-86; 524-03-13
Fax (+48 89) 524-01-24; e-mail instytut@pan.olsztyn.pl; www.pan.olsztyn.pl

Prof. dr hab. Barbara Gawrońska-Kozak

Olsztyn, 25 stycznia 2021r.

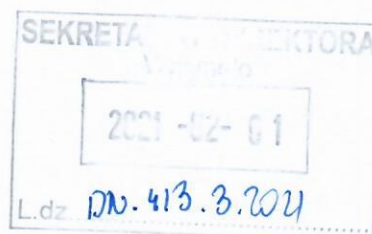
Profesor Instytutu

Zakład Biologicznych Funkcji Żywności

Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności

Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

e-mail: b.kozak@pan.olsztyn.pl



RECENZJA

rozprawy doktorskiej **Pana mgr Bartosza Zglinickiego**

Pt. „**Wpływ usunięcia genu *Dicer1* w tkance tłuszczowej na metabolizm myszy**

transgenicznym *Dicer^{AdipoqCreERT2}*”

wykonanej pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Urszuli Wojdy (promotor) oraz

Pana dr Witolda Konopki (promotor pomocniczy)

w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej

im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie

U ssaków wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje tkanki tłuszczowej: tkankę tłuszczową białą (ang. white adipose tissue; WAT), oraz tkankę tłuszczową brunatną/brązową (ang. brown adipose tissue; BAT). Historycznie tkanka tłuszczowa biała uważana była za bierną składową tkanki łącznej. Intensywne i precyzyjne badania wykazały, że obecnie biała tkanka tłuszczowa jest uznawana za główny regulator metabolizmu oraz hormonalnej homeostazy. WAT pełni funkcje magazynu energii w postaci trójglicerydów, kontroluje równowagę energetyczną, jest organem endokrynnym, a także stanowi rodzaj podłoża mechanicznego otulającego inne organy oraz narządy. Deficyt energetyczny spowodowany np. głodówką skutkuje procesem lipolizy zachodzącym w komórkach tłuszczowych nadzorując dostarczanie energii poprzez uwolnienie wolnych kwasów tłuszczowych. Nadmiar energetyczny spowodowany niekontrolowanym dostarczaniem pożywienia skutkuje ekspansją białej tkanki tłuszczowej co w konsekwencji prowadzi do nadwagi, otyłości oraz rozwoju chorób o podłożu metabolicznym jak cukrzyca typu 2-go oraz chorób układu krążenia.

Brunatna tkanka tłuszczowa, jakkolwiek wykazuje podobieństwa do białej, jest wyspecjalizowana w adaptacyjnej termogenezie, czyli produkcji ciepła w procesie spalania długocząsteczkowych kwasów tłuszczowych. Uwolnione w tym procesie protony dzięki charakterystycznemu dla tej tkanki białku

rozprzegającym – termogeninie (ang. UCP1) są przenoszone do macierzy mitochondrialnej skutkując uwalnianiem energii w postaci ciepła. Brunatna tkanka tłuszczowa występuje we wczesnym okresie życia, a w przypadku człowieka w okresie pourodzeniowym i zlokalizowana jest w obszarze międzyłopatkowym, na szyi, wzdłuż kręgosłupa zapewniając stały dopływ ciepła do witalnych organów takich jak serce i mózg. Stosunkowo niedawno odkryte zjawisko „brązowienia” WAT, czyli pojawianie się komórek brunatnej tkanki tłuszczowej w postaci wysp w białej tkance tłuszczowej rozszerzyło potencjalne funkcje tej tkanki nie tylko na produkcję ciepła, ale także na mechanizm pozwalający na utrzymanie stałej masy ciała oraz zapobieganiu insulinooporności. Wzbudzanie pojawienia się tkanki brunatnej w obrębie tkanki białej osiągnięte jest poprzez obniżenie temperatury otoczenia oraz poprzez stymulację receptorów β_3 -adrenergicznych.

W obliczu niekontrolowanego wzrostu otyłości wśród obywateli większości społeczeństw, w tym dzieci i nastolatków, skutkującego wzrostem chorób metabolicznie zależnych, rozpoznanie mechanizmów regulujących różnicowanie się, ekspansję oraz metabolizm tkanki tłuszczowej zarówno WAT, BAT jak i indukowalnej w obszarach WAT tkanki brunatnej (ang. inducible BAT; iBAT) jest jednym z wyzwań obecnej nauki. Szeroko zakrojone badania w obszarze biologii molekularnej pozwoliły na rozpoznanie zestawów genów charakterystycznych dla procesu adipogenezy będących wspólnymi dla obu typów tkanki tłuszczowej między innymi: PPAR γ , aP2, oraz genów ekspansji tkanki tłuszczowej: Mest, Sfrp5, Cav1, and Bmp3. Oznaczone zostały również geny charakterystyczne dla np. BAT i iBAT m.in. należące do tej grupy: Pgc1, Ucp1 i Prdm16. Jednakże odkrycie cząsteczek mikro-RNA reprezentujących dodatkowy a bardzo często kluczowy element regulacyjny współdziałający z mechanizmami kontrolującymi proces transkrypcji i translacji w regulacji homeostazy metabolicznej, podniósł analizę funkcjonowania tkanek tłuszczowych na jeszcze wyższy poziom komplikacji. Rozpoznanie maszynerii molekularnej, regulującej ekspansję tkanki tłuszczowej, jej odpowiedź na bodźce środowiskowe takie jak dieta oraz temperatura otoczenia, jest jednym z wyzwań biologii molekularnej. Ponadto wykazanie w przełomowej pracy Wouter D. van Marken Lichtenbelt i wsp. wzrostu aktywności tkanki brunatnej u ludzi podczas ekspozycji na obniżoną temperaturę otoczenia wskazuje na potencjalną możliwość wzbudzania brunatnej tkanki tłuszczowej u dorosłych osobników. W tym kontekście przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr Bartosza Zglinickiego wpisuje się w główny nurt badań tkanki tłuszczowej. Doktorant w swojej dysertacji podjął się niezwykle trudnego zadania zbadania wpływu usunięcia mikro-RNA w tkance tłuszczowej białej i brązowej na metabolizm organizmu myszy.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona praca doktorska liczy 122 strony i zachowuje typowy dla rozpraw doktorskich układ. Rozprawa rozpoczyna się wykazem skrótów (3 strony) oraz streszczeniem w języku angielskim (2 strony) i polskim (2 strony). Wstęp liczy 23 strony i zawiera 9 rycin. Założenia i Cele pracy stanowią

1 stronę. Bezpośrednio po nim następuje rozdział Materiały i Metody obejmujący 16 stron i zawierający 1 rycinę. Rozdział Wyniki liczy 47 stron, na których umieszczono 34 rycin. Dyskusja obejmuje 9 stron, po których następuje Podsumowanie i Wnioski stanowiące 1 stronę. Rozprawę doktorską zamyka rozdział Literatura obejmujący 212 pozycji piśmiennictwa.

Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wszelkie wymogi formalne rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna

Streszczenie pracy, przygotowane zarówno w języku angielskim jak i polskim, jest informatywne i przedstawia w formie skrótowej cele oraz najważniejsze wyniki pracy wraz z podsumowaniem.

Jakkolwiek informacja zawarta w streszczeniu przygotowanym w wersji językowej angielskiej różni się od wersji przedstawionej w języku polskim. Różnica ta dotyczy wymienienia różnych w wersji angielskiej i wersji polskiej mikro-RNA, których zmiany ekspresji zaobserwowano w wyniku odpowiedzi organizmu na głodzenie.

Wstęp

Wstęp pracy w sposób usystematyzowany oraz wyczerpujący omawia poszczególne aspekty dotyczące tkanki tłuszczowej, aby następnie charakteryzuje cząsteczki mikro-RNA. Wstęp składa się z trzech głównych podrozdziałów. W podrozdziale 1.1. Doktorant omawia białą tkankę tłuszczową skupiając się na metabolizmie, a szczególnie na metabolicznej odpowiedzi na restrykcje pokarmową co pozwala na systematyczne, oparte na najnowszej literaturze zaznajomienie się z aktualnym stanem wiedzy w tym obszarze. Podrozdział 1.2. poświęcony jest brązowej tkance tłuszczowej zwracając szczególną uwagę na charakterystycznym dla BAT białku rozprzegającemu – termogeninie (ang. UCP1) i jego roli w procesie uwalniania ciepła. W podrozdziale 1.3. Doktorant omawia cząsteczki mikro-RNA ich rolę w procesach biologicznych, biogenezę i funkcję regulatorową.

Podsumowując Wstęp jest przygotowany starannie, a załączone Ryciny klarownie obrazują i/lub wyjaśniają złożoność procesów zachodzących w tkankach tłuszczowych oraz mechanizm działania mikro-RNA, w tym funkcję białka Dicer w procesie.

Uwagi:

1. Badania ostatnich lat wskazują na możliwość indukowania brązowej tkanki tłuszczowej w odpowiedzi na obniżoną temperaturę otoczenia zarówno u ludzi jak i u myszy co skutkuje pojawieniem się tzw. beżowej tkanki tłuszczowej. Ponadto zaprezentowane w pracy doktorskiej doświadczenia (stymulacja receptora β 3-adrenergicznego) wskazują, że informacja dotycząca iBAT byłaby istotnym uzupełnieniem Wstępu.

2. Tkanka tłuszczowa pełniąc rolę sekrecyjną wydziela liczne hormony między innymi adiponektynę. W obrazie przedstawionej pracy doktorskiej to właśnie adiponektyna jest ważną komponentą badań w aspekcie zastosowania myszy transgenicznych Dicer^{AdipoqCreERT2}. W pracy (Wstępie) brakuje informacji dotyczących adiponektyny np. czy BAT produkuje/wydziela adiponektynę?
3. Str. 31 wiersz 3 powinno być: „opisano pierwsze”
4. Str. 31 wiersz 10 powinno być „najczęściej zawierającymi”
5. Rycina 1 brakuje wyjaśnienia skrótu GNG (glukoneogeneza), tak jak wyjaśnione zostały pozostałe akronimy umieszczone w opisie ryciny.

Założenia i cele pracy

Uzasadnienie podjęcia badań zaprezentowanych w pracy doktorskiej Pana Bartosza Zglinickiego zostało jasno zdefiniowane w Założeniach. Punktem wyjścia podjęcia tematu ujętego w pracy doktorskiej była obserwacja przeprowadzona w trakcie innego doświadczenia (Konopka i wsp. 2010). Jest to wzorcowy proces drogi naukowej wytyczanej przez obserwacje, stawianie pytań i szukanie sposobów wyjaśnienia zaobserwowanego zjawiska. Opierając się na założeniach Cele pracy zostały logicznie sformułowane.

Materiały i Metody

W sekcji Materiały i Metody Doktorant w sposób bardzo dokładny i wyczerpujący opisał układy badawcze, jak i procedury eksperymentalne zastosowane w pracy.

Uwagi:

1. W rozdziale 3.1.1 Myszy typu dzikiego – szczep C57BL/6J niewłaściwym jest użycie rozszerzenia „J”, które oryginalnie informuje o pochodzeniu szczepu z The Jackson Laboratory, ME, USA. Ponieważ myszy zastosowane w prezentowanej pracy były pozyskane ze zwierzętarni lokalnych, gdzie ustanowione są lokalne kolonie myszy tego szczepu, dlatego też „J” powinno być usunięte z kart charakterystyki tych myszy.

Wyniki

Rezultaty badań zostały przedstawione w rozdziale Wyniki składającym się z 16 podrozdziałów.

W podrozdziałach 4.1 do 4.4 zaprezentowane zostały wyniki uzyskane w warunkach restrikcji pokarmowych zastosowanych u myszy szczepu dzikiego.

W pierwszym etapie badań Doktorant przeanalizował wpływ restrykcji pokarmowych na zawartość substratów energetycznych oraz wybranych hormonów w krwi myszy szczepu B6. Uzyskane wyniki zostały porównane do grupy kontrolnej zwierząt tego samego szczepu z ciągłą dostępnością pokarmu (żywione ad libitum). Wyniki analiz wykazały wzrost FFA oraz ciał ketonowych w grupach zwierząt z restrykcją pokarmową, a kinetyka zmian odzwierciedlała czasowy wzór restrykcji pokarmowych (poranna, popołudniowa, wieczorna). Interesująca była analiza oszacowania potencjalnej ilości ATP w każdej z grup restrykcyjnych w porównaniu do grupy ad libitum. Pozwoliło to na pokazanie potencjalnych mechanizmów przystosowawczych pozwalających na utrzymanie stałego dopływu energii pomimo ograniczeń podaży pokarmu. Wykazano również obniżone spowodowane restrykcjami dietetycznymi poziomy hormonów: leptyny i insuliny.

Następnie korzystając z systemu Phenomaster, Doktorant wykazał, iż wprowadzone restrykcje pokarmowe wzmagają aktywność zwierząt z restrykcjami kalorycznymi, a tylko nieznacznie wpływały na aktywność zwierząt w grupie głodówki krótkoterminowej (24 godziny). Doktorant analizując ogólny wydatek energetyczny wykazał, iż był on porównywalny, a nawet niższy w grupie zwierząt z zastosowaną głodówką 24-godziną w porównaniu do restrykcji pokarmowych długoterminowych (grupy CR). Zaprezentowane wyniki Doktorant konfrontuje z tezą stanowiącą, iż organizm zabezpiecza poziom energetyczny w postaci magazynu tkanki tłuszczowej, stanowiskiem reprezentowanym przez odkrywcę hormonu leptyny Jeffre'a Friedmana. W kolejnych badaniach fizjologicznych Doktorant wykorzystał klatkę Skinnera w celu zestawienia pomiaru aktywności zwierząt z pomiarem ich motywacji w poszukiwaniu pokarmu wykazując, iż najwyższą motywacją odznaczały się zwierzęta utrzymywane w restrykcji kalorycznej w okresie przed porą karmienia. Co było niwelowane/znoszone iniekcjami leptyny skutkującymi podobną reakcją myszy kontrolnych i myszy CR.

Uwagi:

1. Wobec następujących badań interesującym byłoby przeanalizowanie poziomu hormonu adiponektyny.
2. Zdecydowanie brakuje wyników dotyczących pomiaru masy ciała, a również masy tłuszczowej i mięśniowej zwierząt w trakcie prowadzonych badań albo przynajmniej porównanie masy początkowej (przed zastosowaniem restrykcji pokarmowych) w porównaniu do końcowej.

Podrozdział 4.5 dedykowany został analizie profilu mikro-RNA w białej tkance tłuszczowej myszy szczepu dzikiego w warunkach restrykcji pokarmowej. Doktorant uzasadnił selekcję dwóch grup zwierząt użytych do profilowania mikro-RNA: 6-tą godzinę w grupie 24-godzinnej głodówki oraz wariat popołudniowy w grupie restrykcji pokarmowych długoterminowych. Uzyskana analiza profilu mikro-RNA tkanki tłuszczowej oparta została na porównaniu grupy myszy karmionych ad

libitum z danymi uzyskanymi z grup objętych restrykcjami pokarmowymi. Wartości ekspresji poszczególnych mikro-RNA zostały oparte na normalizacji: globalnej, w stosunku do sno202 i w stosunku do U6.

Uwagi:

1. Koniecznym już na tym etapie badań jest wyjaśnienie dotyczące wyboru określonej tkanki tłuszczowej białej: podskórna czy wisceralna (gonadalna)? W rozdziale Materiały i Metody paragraf 3.4.7 wspomniano, że profilowanie wykonano na tkance podskórnej, jednakże celowym byłoby również powtórzenie tej informacji w wynikach, a przede wszystkim uzasadnienie dlaczego dokonano takiego wyboru. Obie tkanki różnią się zdecydowanie pochodzeniem, zdolnością do „brązowienia”/beżowienia w odpowiedniej temperaturze, a także sposobem ekspansji w środowisku obesogenicznym: hipertrofia vs hiperplazja. Doktorant w następujących rozdziałach opierając się na wynikach badań z zastosowaniem myszy transgenicznym wyjaśnia brak różnic w profilowaniu mikro-RNA w tkance wisceralnej (gonadalnej), jednak nie uzasadnia to wyboru tej tkanki na tak wczesnym etapie tzn. przed analizą zwierząt transgenicznych.
2. Rycina 18 i Rycina 20 zawierają identyczny opis do tabel, przedstawiających różne wyniki.

W podrozdziałach 4.6 do 4.8 Doktorant przedstawił wyniki weryfikujące skuteczność wprowadzonej transgenezy zwierząt Dicer^{AdipoqCreERT2} oraz tdTomato^{AdipoqCreERT2}.

Podrozdziały 4.9 do 4.10 poświęcone zostały analizie wyników uzyskanych w warunkach głodówki krótkookresowej i zaobserwowanej różnicy pomiędzy grupami Cre+ i Cre- w poziomach substratów energetycznych w osoczu.

W następnych podrozdziałach 4.11 do 4.15 Doktorant analizuje odpowiedź myszy typu dzikiego oraz myszy Dicer^{AdipoqCreERT2} (Cre+) i (Cre-) na stymulację agonistą receptora β 3-adrenergicznego – CL-316,243, aktywatora termogenezy w aspekcie zawartości substratów energetycznych oraz wybranych hormonów w osoczu, a także analizuje metabolizm myszy z wykorzystaniem systemu Phenomaster. Wykazane zostały znaczne zmiany w poziomach stężenia glukozy, wolnych kwasów tłuszczowych oraz w stężeniu insuliny w okresie 2 godzin od stymulacji termogenezy w grupie myszy typu dzikiego, natomiast nie zaobserwowano różnic w powyższych parametrach pomiędzy myszami Cre+ a Cre-. Doktorant wykazał również znaczny wzrost wydatku energetycznego myszy szczepu dzikiego traktowanych CL-316,243 (CL+) w porównaniu do kontrolnych (CL-). Wykazano również, że liczba spalanych kalorii przez zwierzęta kontrolne była wyższa w porównaniu do myszy Dicer^{AdipoqCreERT2} stymulowanych aktywatorem termogenezy. Zaburzona zdolność indukowania wydatku energetycznego w procesie generowania ciepła została potwierdzona również w doświadczeniu z kamerą termowizyjną. Doktorant wykazał że podanie agonisty CL myszom

Dicer^{AdipoqCreERT2} powoduje zmniejszenie o 2°C ciepłoty monitorowanego ogona w porównaniu do tak samo traktowanych myszy kontrolnych.

Rozdział 4.16 został poświęcony analizie profili mikro-RNA w brązowej tkance tłuszczowej myszy szczepu dzikiego analizowanych w okresie 2 godziny po stymulacji procesu termogenezy. Wyselekcjonowana została grupa mikro-RNA o najwyższej ekspresji (miR-191, miR-133a, miR-126-3p, miR-193b) i porównana do danych literaturowych.

Bardzo interesujące jest stwierdzenie konieczności wystąpienia czynnika „mobilizującego” umożliwiającego zajście reakcji/procesu w tkance z indukcją mutacji. W przypadku białej tkanki tłuszczowej jest to restrykcja pokarmowa, a w przypadku brązowej zdolność do generowania ciepła. W sposób pośredni stwierdzenie to, czy też raczej, ta obserwacja wskazuje na ile poziomach organizm jest chroniony/zabezpieczany przed niekorzystnymi wpływami środowiska, czy też mutacjami.

Uwagi:

1. Czy można założyć, że brak różnic w metabolizmie zwierząt (parametrach metabolicznych: RER oraz wydatek energetyczny) Cre⁺ w stosunku do Cre⁻ spowodowany jest zastosowaniem głodówki krótkookresowej zamiast długotrwałego CR biorąc dodatkowo pod uwagę wyniki uzyskane z badań WT i zmian w ekspresji mikro-RNA zaobserwowanych w grupie CR?
2. Rycina 35 - dwa, różniące się między sobą wykresy zostały opisane jako stężenie insuliny.
3. W paragrafie 4.14 wskazanym byłoby zaznaczyć, że opisane wyniki są zaprezentowane na Rycinie 37.

Dyskusja

W 9 stronicowym rozdziale Dyskusja Doktorant przede wszystkim podsumowuje i interpretuje uzyskane w trakcie przeprowadzonych doświadczeń wyniki. Ten rozdział pracy doktorskiej rozpoczyna krótkie streszczenie uzyskanych przez Doktoranta wyników. Następujące podrozdziały od 5.1 do 5.7, z których każdy zawiera informatywny i adekwatny do uzyskanych wyników tytuł systematycznie analizują i przedstawiają wyniki w aspekcie podłoża naukowego.

Jednakże w rozdziale Dyskusja zabrakło wnikliwego, opartego na literaturze przedyskutowania wyników własnych na tle badań innych grup. Biorąc pod uwagę bogactwo zgromadzonych przez Doktoranta pozycji zawartych w części Literatura (212 pozycji) ujęcie tylko 14-tu w części Dyskusja może wskazywać, iż niewiele grup naukowych jest zainteresowanych tematyką przedstawioną przez Doktoranta. Kluczowym dla przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej, zgodnie z Załoženiami i Celami Pracy „było zbadanie wpływu usunięcia mikro-RNA w tkance tłuszczowej na metabolizm organizmu myszy” (cytat str. 36 linia 14-15). I w tym aspekcie koniecznym jest

przedyskutowanie wyników własnych z danymi literaturowymi, a szczególnie z tymi, które są odmienne od tych uzyskanych przez Doktoranta. I tak zabrakło w dyskusji pracy Hye-Jin Kim i wsp. (Diabetes 2014;63:4045–4056 (“MicroRNAs Are Required for the Feature Maintenance and Differentiation of Brown Adipocytes”), która w połączeniu z tylko raz cytowaną przez Doktoranta pracą Feuermann i wsp. (“MiR-193b and miR-365-1 are not required for the development and function of brown fat in the mouse”) stanowiłoby znakomitą podstawę do dyskusji nad wynikami badań własnych. Ponadto, Doktorant w dyskusji wskazuje, iż w pracy Feuermann i wsp. zasugerowane zostało, że „Dodatkowo zmiana miR-193b, którego związek z funkcją białka UCP1 jest postulowany (Feuermann et al., 2013; Sun et al., 2011)” (podrozdział 5.6 strona 106 w rozprawie doktorskiej). Nie znalazłam w pracy Feuermann i wsp. powyższej sugestii, a jedynie stwierdzenie o braku zmian w ekspresji genów (Ucp1 i Prdm16) związanych z funkcją BAT: “BAT function in mice with an inactivated miR-193b-365-1 locus, as determined by their response to the selective β 3 adrenergic receptor agonist CL316.243 and their tolerance to cold exposure, was normal and expression of genes associated with functional BAT, including Prdm16 and Ucp1, was unaffected. (...) In summary, these data demonstrate, in contrast to earlier work, that the development, differentiation, and function of BAT do not require the presence of miR-193b and miR-365-1.”. Autorzy tej pracy nie wspominają o ewentualnych zmianach w poziomach białka UCP1 w odpowiedzi na zmiany w poziomie miR-193b.

Podsumowanie i Wnioski

Rozprawę kończy Podsumowanie i Wnioski, które Doktorant formułuje w postaci 4 punktów.

Interesującym byłoby w tej części rozprawy opierając się na uzyskanych wynikach zasygnalizowanie kierunku dalszych badań.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do oceny praca autorstwa Pana mgr Bartosza Zglinickiego spełnia wymogi rozprawy doktorskiej. Rozprawę oceniam pozytywnie.

Zamieszczone w niniejszej recenzji uwagi krytyczne nie umniejszają jej oceny, są uwagami mającymi na celu udoskonalenie rozprawy, a zarazem zwróceniem uwagi Doktoranta na przeoczenia/niedopatrzania.

Na szczególne podkreślenie zasługuje proces naukowego podejścia, którego wynikiem jest przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, rozpoczynając od obserwacji poczynionej w trakcie innego/odrębnego doświadczenia, a następnie sformułowanie pytań/hipotez/celi badawczych, poprzez przeprowadzenie złożonych badań, aż do uzyskania wyników. Złożoność zastosowanych

metodologii badawczych poczynawszy od typowo fizjologicznych poprzez wyrafinowane metodyki biologii molekularnej pozwoliły na uzyskanie interesujących wyników wskazujących na złożoność regulacji tkanki tłuszczowej brązowej i białej. Doktorant wykazał się umiejętnością prowadzenia badań, opanowaniem trudnego warsztatu badawczego oraz umiejętnością rozwiązywania złożonych problemów badawczych.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Bartosza Zglinickiego, pt. **“Wpływ usunięcia genu *Dicer1* w tkance tłuszczowej na metabolizm myszy transgeniczných *Dicer^{AdipoqCreERT2}*”** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) oraz załącznika nr. 1 Regulaminu Rady Naukowej z 13.04.2018r.

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Bartosza Zglinickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Barbara Gawrońska-Kozak

Katowice / 12.02.2021

Centrum Medycyny
Doświadczalnej

40-752, Katowice
ul. Medyków 4
<http://cmd.sum.edu.pl/>

KIEROWNIK
prof. dr hab. n. med.
Jarosław Barski

tel.: (+48 32) 208 85 93
fax: (+48 32) 208 88 31

jbarski@sum.edu.pl

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 208 85 93
tel.: (+48 32) 208 88 32
fax: (+48 32) 208 88 31

cmd@sum.edu.pl



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Bartosza Zglinickiego:

„Wpływ usunięcia genu *Dicer1* w tkance tłuszczowej na metabolizm myszy transgenicznym *DicerAdipoqCreERT2*”.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest efektem serii eksperymentów wykonanych w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem promotora Pani profesor Urszuli Wojdy oraz promotora pomocniczego Pana doktora Witolda Konopki.

Przedmiotem pracy jest analiza efektów obserwowanych u zwierząt transgenicznym, u których metodami inżynierii genetycznej indukowano w sposób tkankowo-specyficzny, hamowanie ekspresji genu *Dicer 1*. Efektem tych manipulacji był brak w tkance tłuszczowej cząsteczek mikroRNA. W opisanych badaniach wykorzystane zostały myszy transgeniczne ze szczepu *Dicer^{AdipoqCreERT2}*.

Oceniana dysertacja została zredagowana w formie klasycznej monografii zajmującej 122 strony, podzielone na rozdziały i podrozdziały typowe dla tego rodzaju opracowań. Rozprawę rozpoczynają wyjaśnienia wszystkich skrótów wykorzystanych przez autora podczas redagowania pracy, a po nich następują streszczenia treści rozprawy w języku angielskim i polskim. W streszczeniu angielskim zamiast terminu „wild type mice” bardziej precyzyjne byłoby zamieszczenie nazwy użytego szczepu – C57Bl/6J, ta uwaga odnosi się też do streszczenia w języku polskim. Generalnie używanie terminu „zwierzęta typu dzikiego” jest nie wskazane, szczególnie w pracy, w której badano zwierzęta transgeniczne, gdyż może to prowadzić do mylącej interpretacji, iż chodzi o zwierzęta o genotypie dzikim, ale ze szczepu genetycznie modyfikowanego, w tym przypadku *Dicer^{AdipoqCreERT2}*. W części angielskiej znajduje się też kilka niedopatrzeń językowych jak np. w wyrazach „posttranskrypcyjny”, „applied”, czy „tissue”.

W części polskiej dostrzegłem pewną niekonsekwencję nomenklaturową. W akapicie pierwszym doktorant pisze: „Zastosowanymi restrykcjami pokarmowymi była głodówka krótkookresowa (24-godzinna) oraz restrykcja kaloryczna (...)”. W drugim akapicie natomiast, pojawia się określenie „odstępstwo od pokarmu”. Możemy się domyślać, że chodzi tu o głodówkę, ale jednolita terminologia byłaby bardziej czytelna.

Pierwszy rozdział to „Wprowadzenie”, które jest wyczerpującym zbiorem wiedzy bibliograficznej związanej z dysertacją. Doktorant wprowadza czytającego w różnorakie aspekty regulacji metabolizmu i termogenezy, związane z białą i brązową tkanką tłuszczową. Osobny podrozdział dotyczy funkcji jaką pełnią cząsteczki mikroRNA w regulacji procesów biologicznych.

W rozdziale tym, podobnie jak w pozostałych, można dostrzec dość liczne „literówki” oraz dużą swobodę piszącego w szafowaniu przecinkami. Doktorant zamieścił w tej części pracy liczne schematy i ilustracje, które ułatwiają zrozumienie tego dość skomplikowanego aspektu fizjologii jakim jest termoregulacja. Zdaniem recenzenta wskazane byłoby też zamieszczenie w tym rozdziale informacji na temat systemu tkankowo-specyficznej rekombinacji Cre/loxP i rekombinacji indukowanej, gdyż ten aspekt doświadczalny jest bardzo istotny dla całego doświadczenia leżącego u podstaw tej pracy doktorskiej.

„Założenia i cel pracy” to drugi z kolei rozdział, zawierający opis merytorycznej koncepcji podjętych badań oraz zebrane w postaci punktów cztery cele szczegółowe, na których oparto szkielet badań. Wydaje się, iż w punkcie drugim termin „charakteryzacja” należałoby zastąpić terminem „charakterystyka”.

Rozdział 3 to „Materiały i metody”, w którym doktorant opisuje techniczne aspekty przeprowadzonych eksperymentów. Pierwszy podrozdział (3.1) dotyczy zwierząt doświadczalnych wykorzystanych w badaniach. W tej części brak informacji, dlaczego możliwe było porównywanie myszy szczepu C57Bl/6J z myszami modyfikowanymi genetycznie szczepu DicerAdipoqCreERT2.

Piszący ogranicza się do informacji „Myszy transgeniczne hodowano na podłożu genetycznym C57Bl/6J”. Które ze szczepów, czy oba wyjściowe, czy DicerAdipoqCreERT2, co to oznacza? Informacja dotycząca Instytutu Maxa Plancka powinna być uzupełniona o nazwę Instytutu, ponadto Max Planck Institute for Heart and Lung Research znajduje się w Bad Nauheim, a nie Bad Neuheim.

W dalszej części tekstu pojawia się informacja, iż loxP składa się 42 nukleotydów. Zgodnie z wiedzą recenzenta loxP składa się z 34 nukleotydów. Może też przydała by się informacja, iż loxP posiada swój kierunek, od którego zależy efekt działania rekombinazy Cre.

Na rycinie numer 10 umieszczono schemat działania systemu Cre/loxP w przeprowadzonym eksperymencie. Ze schematu nie do końca wynika fakt, iż oba transgeny znajdują się w genomie tego

samemu osobnika. Ponadto nie jest prawdą, iż po wycięciu sekwencji nukleotydowej pomiędzy sekwencjami loxP pozostają dwa loxP. Pozostaje jedno loxP złożone z części dwóch wyjściowych. W eksperymencie wykorzystano też linię transgeniczną myszy reporterowych Rosa26-tdTomato, brak jest informacji o pochodzeniu tych zwierząt - hodowca, dostawca.

Podrozdział 3.2 zawiera informacje na temat warunków hodowli zwierząt doświadczalnych. Jednym z elementów metodycznych doświadczenia była restrykcja pokarmowa, natomiast w tekście pojawia się informacja o wzbogacaniu środowiska poprzez „tunele z celulozy”. Myszy wykorzystując takie tunele zjadają je w znacznym stopniu. Czy nie zachodziła obawa, iż fakt spożywania celulozy mógł zakłócić restrykcje pokarmowe i kaloryczne stosowane w czasie badań?

W podrozdziale 3.3 „Pobieranie tkanek do analizy” pojawia się informacja o sposobie eutanazji zwierząt: „W celu pobrania tkanek do analizy myszy uśmiercano przez przerwanie rdzenia kręgowego lub poprzez dootrzewnowe podanie pentobarbitalu sodu (...)”. Cenna byłaby w tym miejscu informacja skąd konieczność dwóch różnych metod eutanazji. Interesujące wyniki w odniesieniu do interakcji pomiędzy pentobarbitem, a kwasami tłuszczowymi pojawiają się w rozdziale „Wyniki”, ale zdaniem recenzenta ich miejsce było raczej rozdziale numer 3. Można też było uśmiercić wszystkie zwierzęta poprzez dyslokację kręgów szyjnych, przedawkować ketaminę lub CO₂.

W podrozdziale 3.3.2 powinno być napisane: „Pobierano niewielki fragment tkanki (...), zawsze z tego samego płata wątroby”.

Podrozdział 3.3.3 „Fragment ogona”. Recenzent domyśla się, iż fragment ogona (bioptat) był pobierany w celu ekstrakcji DNA do genotypizacji, jednak 5mm to chyba znacznie za dużo, szczególnie w przypadku młodego zwierzęcia. W tym celu wystarczy pobrać 1mm. Nie uważam za słuszne tworzenie podrozdziału 3.3. „Pobieranie tkanek zwierzęcych do analiz”. Nie dość, że niepotrzebnie mnożą się podrozdziały, to efektem tego jest podrozdział 3.3.3 o tak mało „fachowym” tytule. Metoda pobierania tkanek powinna być opisana przy opisie poszczególnych analiz i tak, opis wykonywania biopsji ogona powinien znaleźć się w podrozdziale 3.4.4 „Analiza genotypu zwierząt transgenicznych”. Mam też uwagę do opisu warunków reakcji PCR. Zdaję sobie sprawę, iż na wyświetlaczu urządzenia PCR pojawia się na koniec cyklu określenie „4°C forever”, ale wyglądało by lepiej, gdyby słowo „forever” zastąpić np. symbolem ∞, lub w ogóle pominąć. Podobnie w podrozdziale 3.4.5.

Podrozdział 3.4 „Podstawowe techniki pracy z kwasami nukleinowymi” jest moim zdaniem również zbędny, a zawarte w nim informacje powinny się znaleźć w opisie dotyczącym odpowiednich oznaczeń, szczególnie iż są to procedury rutynowe. Bardziej restrykcyjne podejście do rozdziału 3 „Materiały i metody”, pozwoliło by zapewne na zmniejszenie liczby podrozdziałów tej części pracy, których jest aż 37!

Wyniki badań zostały opisane w rozdziale 4, liczącym 38 stron i będącym jednocześnie najobszerniejszym rozdziałem dysertacji. Pierwszy podrozdział to dane dotyczące wpływu morbitalu na obecne w osoczu kwasy tłuszczowe. Jak sugerowałem wcześniej wyniki te wraz z wykresami mogłyby się raczej znaleźć w rozdziale 3 „Materiały i metody”. Podrozdziały 4.2 do 4.5 to analiza metaboliczna i hormonalna myszy ze szczepu C57Bl/6J w warunkach standardowych jak i w warunkach restrykcji pokarmowych i restrykcji kalorycznej. Treść jest bogato ilustrowana wykresami pozwalającym na bardziej przystępną analizę dużej ilości danych eksperymentalnych. Wszystkie wykresy zostały przygotowane bardzo starannie, a jedyna uwaga jaką miałbym w tym miejscu to brak we wszystkich załączonych opisach wyjaśnienia skrótu „CR”. Oczywiście czytelnik wie co on oznacza, ale dla zachowania standardów każdy skrót obecny na wykresie powinien zostać wyjaśniony w tekście go opisującym. Kolejne podrozdziały w sposób systematyczny opisują poszczególne aspekty zmian fizjologicznych pod wpływem zmieniających się warunków pokarmowych, odnosząc się do gospodarki energetycznej, metabolizmu i poziomu głównych powiązanych hormonów: insuliny i leptyny. Podrozdział 4.4 to analiza powiązań pomiędzy wahaniami poziomu leptyny oznaczonymi wcześniej, a behawiorem pokarmowym zwierząt szczepu C57Bl/6. Na zakończenie części dotyczącej szczepu C57Bl/6J, w podrozdziale 4.5, doktorant zamieścił wyniki analizy poziomu ekspresji licznych wariantów mikroRNA obecnych w tkance tłuszczowej. Obszerna dokumentacja w postaci wykresów, została uzupełniona listą mikroRNA, których poziom ekspresji zmieniał się w sposób istotny statystycznie w zależności od zastosowanej restrykcji pokarmowej.

W podrozdziale 4.6 doktorant przechodzi do analizy zwierząt transgenicznych szczepu Dicer^{AdipoqCreERT2} przeprowadzonej przy metodycznym udziale szczepu tdTomatoDicer^{AdipoqCreERT2}. Analiza ta rozpoczyna się od przykładowego rozdziału elektroforetycznego będącego podstawą do genotypizacji obu szczepów. Na rycinie podano wprowadzie wielkości fragmentów DNA, na podstawie których identyfikowano poszczególne genotypy, jednak wskazane byłoby podanie wielkości głównych fragmentów, obecnych w markerze. W opisie pod ryciną powinna być też informacja o stężeniu procentowym agarozы użytej do rozdziału. W tym miejscu chciałbym zapytać, czy doktorant sprawdzał liczbę alleli kodujących rekombinazę Cre, a jeżeli nie, to dlaczego?

Podrozdział 4.7 to analiza skuteczności i specyficzności rekombinacji systemu Cre/loxP w zastosowanym modelu eksperymentalnym. W tym celu doktorant wykorzystał ilościową metodę RT-PCR oraz technikę CLARITY, pozwalającą na lokalizację sygnału fluorescencyjnego bez wykonywania preparatów histologicznych. Piszący tę rozprawę nie odniósł się do technicznych aspektów tej metodyki w rozdziale „Materiały i metody”. Rycina 27 zawiera wyniki analizy ekspresji w postaci dwóch paneli. W opisie znajdującym się pod ryciną powinny zostać wyjaśnione wszystkie skróty jakimi opisano wykresy i zdjęcie. Przedstawione wyniki potwierdziły skuteczność i specyficzność

tkankową rekombinacji z niewielkimi „nieszczelnościami”, które są standardowym niedociągnięciem systemu Cre/loxP.

Podrozdział 4.8 można było właściwie pominąć lub też jego wyniki przedstawić w rozdziale „Materiały i metody”, w podrozdziale 3.5 „Indukowanie systemu Cre-loxP”.

W podrozdziale 4.9 pojawia się stwierdzenie, iż „Restrykcja kaloryczna nie została uwzględniona w doświadczeniu ze względu na duże podobieństwo do głodówki i zaangażowanie tych samych procesów metabolicznych”. Recenzentowi nasuwa się więc pytanie, dlaczego nie zrezygnowano z restrykcji kalorycznej w przypadku badań nad szczepem C57Bl/6J?

W podrozdziale 4.10 zamieszczona została rycina 31, opisana jako „Porównanie zmian poboru pokarmu (wykres dolny) oraz zmian wagi w trakcie stanu bazowego zwierząt Dicer^{AdipoqCreERT2}”. Co przedstawia lewy a, a co prawy panel wykresy dolnego? Czy chodzi o porównanie fazy jasnej i ciemnej? Wykres górny nie przedstawia zmian wagi, ale zmiany masy ciała.

Podrozdziały 4.11 do 4.16 dotyczą analizy zmian metabolizmu w tkance tłuszczowej brązowej pod wpływem termogenezy, wywołanej podaniem agonisty receptora beta3-adrenergicznego. Analiza ta dotyczy zarówno zwierząt ze szczepu C57Bl/6J jak i zwierząt transgenicznych ze szczepu Dicer^{AdipoqCreERT2}. Badania te prowadzono z wykorzystaniem systemu Phenomaster, a w przypadku zwierząt transgenicznych Dicer^{AdipoqCreERT2}, dodatkowo przy użyciu kamery termowizyjnej. Dla recenzenta nie jest do końca jasne, dlaczego w przypadku szczepu C57Bl/6J zrezygnowano z wykorzystania kamery termowizyjnej.

Ostatnim podrozdziałem części „Wyniki” jest podrozdział 4.16 dotyczący analizy profilu mikroRNA w brązowej tkance tłuszczowej po indukcji procesu termogenezy. Analiza ta została przeprowadzona w sposób zbliżony do opisanej w podrozdziale 4.5, a jej wyniki zostały podsumowane i przedstawione w analogiczny sposób.

Po rozdziale „Wyniki” następuje rozdział numer 5 „Dyskusja”, który wydaje się być mało obszerny wzięwszy pod uwagę ilość przedstawionych wyników. To tylko niecałe 8 stron, stanowiących raczej podsumowanie wyników niż ich porównanie z danymi eksperymentalnymi, uzyskanymi przez inne zespoły naukowe, szczególnie, że rozdział 7 „Literatura” zawiera ponad 200 pozycji bibliograficznych. Część informacji zawartych w rozdziale 5 mogłaby się znaleźć w rozdziale „Wprowadzenie”.

Rozdział 6 „Podsumowanie i wnioski” zawiera cztery punkty podsumowujące wyniki oraz wniosek wskazujący na istotną funkcję, jaką pełnią mikroRNA w przemianach metabolicznych zachodzących w tkance tłuszczowej.

Całość dysertacji zamyka rozdział „Literatura” zawierający ponad 200 pozycji.

Podsumowanie:

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest bez wątpienia efektem znacznego nakładu pracy ze strony doktoranta, który podczas jej redagowania nie ustrzegł się licznych dość błędów redakcyjnych. Na błędy te wskazałem podczas analizy poszczególnych rozdziałów pracy. Czytając tekst rozprawy nie mogłem też oprzeć się wrażeniu pewnego chaosu w rozplanowaniu tekstu pracy i jej bardzo licznych rozdziałów i podrozdziałów. Część zajmująca się analizą szczepu C57Bl/6J sprawia wrażenie osobnej całości, a czytając dostrzegłem zbyt mało punktów wspólnych i porównań szczepu C57Bl/6J i szczepu Dicer^{AdipoqCreERT2}.

Powyższe uwagi wątpliwości nie mają na celu podważenia jakości opisanych wyników i poddania w wątpliwość całości rozprawy doktorskiej, a są jedynie efektem wnikliwego zapoznania się z rozprawą. Jak wspomniałem wcześniej, ocena praca doktorska jest efektem znaczącego nakładu pracy i badań naukowych prowadzonych na wysokim poziomie naukowym i z wykorzystaniem nowoczesnego zaplecza metodycznego.

Przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668) oraz załącznika nr 1 Regulaminu Rady Naukowej z 13.04.2018 roku, w związku z czym wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr Bartosza Zglinickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
tel.: +48618528503 wew. 1150
e-mail: mfigiel@ibch.poznan.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Bartosza Zglinickiego pt.:
*Wpływ usunięcia genu Dicer1 w tkance tłuszczowej na
metabolizm myszy transgeniczných Dicer^{AdipoqCreERT2}*

Rozprawa doktorska w formie manuskryptu została wykonana w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Praca została napisana w typowym układzie zgodnym ze standardami pracy naukowej zawierającej najważniejsze sekcje takie jak wstęp, założenia pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusję.

Wprowadzenie pracy obejmuje 23 strony i zawiera w pierwszej części bardzo dobry przegląd wiedzy na temat białej i brązowej tkanki tłuszczowej, procesów fizjologicznych i metabolicznych zachodzących w tych tkankach. Druga część wprowadzenia zawiera informacje na temat biogenezy mikro RNA, a także roli tych cząsteczek w regulacji procesów biologicznych. Druga część wprowadzenia została przygotowana w mojej ocenie skromniej. Brakuje w nim głębszego omówienia dotychczasowej wiedzy związanej z regulacją szeroko pojętego metabolizmu komórkowego przez mikro RNA, a także pozycji opisujących funkcje mikro RNA w tkance tłuszczowej. W czasie obrony proszę o krótkie zreferowanie tego obszaru wiedzy. Wprowadzenie zawiera szereg estetycznych rycin pomagających zrozumieć przedstawioną wiedzę.

W omówieniu założeń i celów pracy czytamy, że inspirację do podjęcia tematu badawczego doktorant czerpał z wcześniejszych badań na modelach mysich z usuniętą rybonukleazą Dicer w mózgu. Usunięcie tej rybonukleazy całościowo zaburzało produkcję mikro RNA w mózgu myszy, co podwyższało ich zdolności uczenia się. Okazało się również że myszy te znacznie przybierały na wadze, co powiązano z zaburzeniami głodu i sytości na skutek

deregulacji mikro RNA i ścieżki mTOR w podwzgórzu, które integruje sygnały obwodowe z tkanki tłuszczowej, wpływając na homeostazę energetyczną. Natomiast tkanka tłuszczowa jest odpowiedzialna za stan energetyczny całego organizmu. Dlatego naczelnym celem pracy, który odnosi się do tytułu pracy, było sprawdzenie, czy inaktywacja rybonukleazy Dicer ograniczona do tkanki tłuszczowej i podobno skutkująca usunięciem mikro RNA w tkance tłuszczowej modelowej transgenicznej myszy $Dicer^{AdipoqCreERT2}$ spowoduje zmiany w metabolizmie organizmu. W celach szczegółowych pracy znalazł się także obszerny cel dotyczący opisanie wpływu 24-godzinnego głodzenia oraz ograniczonej podaży kalorii na profil metaboliczny organizmu (nietransgenicznej myszy typu dzikiego). Kolejnym celem pracy było poznanie metabolicznej charakterystyki procesu termogenezy aktywowanego farmakologicznie z pomocą agonisty receptorów $\beta 3$ -adrenergicznych w nietransgenicznej myszy typu dzikiego C57Bl6. Prawdopodobnie, celem przeprowadzenia tej części eksperymentów było stworzenie i walidowanie modelowego zestawu testów metabolicznych i behawioralnych, które można będzie zastosować do badania metabolizmu zwierząt $Dicer^{AdipoqCreERT2}$. W celach pracy nie jest to dokładnie wyjaśnione, natomiast dopiero w rezultatach wspomina się o wybraniu odpowiedniej strategii doświadczalnej do określenia wpływu mikro RNA na funkcjonowanie tkanki tłuszczowej.

Materiały i metody w pracy charakteryzują się obfitością i zróżnicowaniem. Obejmują krzyżowanie transgenicznych szczepów myszy typu CreERT2 pod promotorem genu Adipoq ze szczepem myszy $Dicer^{flox/flox}$ co skutkuje rekombinacją i inaktywacją genu Dicer w tkance tłuszczowej. Wykorzystany został także szczep $tdTomato^{AdipoqCreERT2}$. Wszystkie szczepy wymagały starannego krzyżowania, indukcji tamoxifenem, genotypowania, pobierania organów, krwi, osocza, co opisano w pracy. Kolejna grupa metod to oznaczenia biochemiczne metaboliczne, użycie klatek metabolicznych, a także, oznaczenia behawioralne z udziałem zaawansowanych aparatów Phenomaster, klatek motywacyjnych typu „operant behaviour” i monitorowania temperatury z pomocą kamer termowizyjnych. Użyto także metodę CLARITY i obrazowanie fluorescencyjne całego zwierzęcia. Ostatnia grupa użytych metod jest związana z profilowaniem mikro RNA z pomocą qPCR w tkance myszy typu dzikiego pod wpływem restrykcji pokarmowych i farmakologicznej indukcji termogenezy. Do metod zalicza się też opisanie sposobu analizy statystycznej, jednakże brakuje analizy siły statystycznej w odniesieniu do liczby użytych zwierząt. Liczba metod użytych w pracy jest imponująca i godna

habilitacji. Jednak w metodach brakuje podsumowującej tabeli z całkowitą ilością zwierząt użytych do badań we wszystkich eksperymentach oraz użytych do poszczególnych eksperymentów z wyszczególnieniem liczby N.

Już pobieżny przegląd sekcji wynikowej potwierdza wstępny wniosek z metod, że w przygotowanie doświadczeń włożono ogromny nakład pracy. W związku z dużą ilością metod oraz zgromadzonych danych, rozdział zawierający wyniki powinien zawierać rysunek-schemat szczegółowo pokazujący układ eksperymentalny, a także ilości zwierząt w poszczególnych kohortach na różnych etapach pracy. Ułatwiłoby to czytanie wyników również w przyszłej publikacji. Analiza rezultatów z rysunków zawartych w pracy jest znacznie utrudniona, ponieważ rysunki nie zawierają oznaczeń poszczególnych paneli wykresów w formie A, B, C itp. Brak odwoływania się do poszczególnych paneli w tekście wyników. Bardzo utrudnia to też wyłapanie i wskazanie ewentualnych błędów takich jak na rycinie nr 35, gdzie prawy dolny panel jest opisany jako „insulina”, natomiast chyba powinno być „leptyna”.

Sekcję wyników otwiera potwierdzenie wpływu pentobarbitalu na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych i dlatego użycie tego typu anestezji w opisanych badaniach jest niemożliwe. Użycie innych metod anestezji wziewnej również może opóźniać moment poboru materiału, co z kolei sprzyja narastaniu niedotlenienia, które może zmieniać poziom wielu metabolitów. Dlatego użycie dyslokacji kręgów szyjnych ze względu na szybką możliwość poboru tkanek, wydaje się nie mieć alternatywy przy pobieraniu materiału do badań w tej pracy eksperymentalnej.

Następnie przystąpiono do zbadania wpływu restrykcji pokarmowych na profil składników metabolicznych i hormonów u myszy WT. Ogólnie stwierdzono, że wahania stężeń poszczególnych substratów były znacznie większe w przypadku krótkoterminowe głodówki niż restrykcji kalorycznej, jednakże udział substratów energetycznych w wytwarzaniu ATP był podobny w obydwóch podejściach z wyjątkiem zwiększonego użycia ciał ketonowych w głodówce. Zawartość hormonów leptyny i insuliny ostatecznie spadała w czasie restrykcji pokarmowych. Po przeprowadzeniu wielu testów uznano, że profilowanie mikro RNA zostanie przeprowadzone po 6 godzinach dla wariantu głodówki i wariantu popołudniowego CR. Warianty te nie różnią się prawie niczym w ocenie recenzenta, to znaczy mają podobne zróżnicowanie poziomu glukozy, FFA, CB, podobny spadek insuliny i leptyny. Zaprojektowanie tego eksperymentu jest dość skomplikowane, dlatego proszę o wyjaśnienie, dlaczego wybrano

dwa prawie identyczne profile metaboliczne (dwa podejścia restrykcji pokarmowych skutkujące tymi samymi parametrami) do profilowania mikro RNA? Co więcej, jak się okazuje, dwa podobne profile metaboliczne poskutkowały wykryciem różnic w ekspresji mikro RNA w tkance tłuszczowej. Co mogło być przyczyną różnicującego poziomu mikro RNA w dwóch typach restrykcji pokarmowej, jeżeli prawdopodobnie nie był to profil metaboliczny oraz poziom leptyny i insuliny? Czy rolę mogą grać tutaj mediatory i hormony stresu (adrenalina, noradrenalina), który może wystąpić u zwierząt w przypadku 24h głodówki? Czy planowano zbadać lub zbadano poziom tych hormonów w obu restrykcjach pokarmowych? Z literatury wiadomo, że poziom niektórych mikro RNA bywają znacząco zmienione pod wpływem stresu.

W przypadku zwierząt $Dicer^{AdipoqCreERT2}$ poziom FFA, Glukozy i ciał ketonowych zbadano w punkcie czasowym 0 i 24h głodówki. W odczuciu recenzenta wyniki pokazane na Ryc. 29 odbiegają od spodziewanego profilu zaobserwowanego u zwierząt WT Ryc. 12. Dodatkowo profilowanie mikro RNA było przeprowadzone po 6 h głodówki w zwierzętach WT, dlatego profil metaboliczny zwierząt transgenicznych powinien również zawierać podobne punkty czasowe. Podsumowując fenotyp metaboliczny zwierząt $Dicer^{AdipoqCreERT2}$, zaobserwowano niższy wydatek energetyczny u tych zwierząt w porównaniu do zwierząt CRE ujemnych. Zaobserwowano ten fenotyp w warunkach głodówki, dostępu do kołowrotka i po podaniu agonisty receptora β_3 -adrenergicznego - CL-316243. Kamera termowizyjną stwierdzono zaburzenie w generowaniu ciepła po indukcji termogenezy u zwierząt $Dicer^{AdipoqCreERT2}$. Końcowy eksperyment to wykonanie profilowania mikro RNA u zwierząt WT po indukcji termogenezy. Zidentyfikowano szereg mikro RNA, które poddano analizie programem Targetscan. Pozwoliło to wytypować zestaw cząsteczek mikro RNA, które prawdopodobnie celują w geny powiązane z procesem termogenezy. Ostatnie pytanie, które chciałbym zadać w tej recenzji, dotyczy kwestii dalszych badań nad kontrolą termogenezy przez mikro RNA. Czy jest planowany dalszy rozwój tematyki, aby rozstrzygnąć o roli konkretnych mikro RNA w tym procesie?

Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pana mgr. Bartosza Zglinickiego spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668) oraz załącznika nr. 1 Regulaminu Rady Naukowej z 13.04.2018 r. Praca została wykonana z podjęciem ważnego problemu badawczego, jej wykonanie jest oryginalne, wykorzystuje

ogromny zasób innowacyjnych metod badawczych in vivo i wykonano ją wysokim nakładem pracy. Moje uwagi do pracy mają charakter pytań do dyskusji podczas obrony. W związku z moją pozytywną oceną pracy uważam, że Pan mgr Bartosz Zglinicki powinien być dopuszczony do końcowych etapów przewodu doktorskiego.



Maciej Figiel