



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Toksykologii
Kierownik prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Włodarczyk

**pt. „Otyłość oraz wybrane polimorfizmy genetyczne jako czynniki determinujące
poziom endogennych uszkodzeń DNA”**

wykonanej w Zakładzie Biochemii i Farmakogenomiki

Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

promotor: prof. dr hab. Grażyna Nowicka, promotor pomocniczy: Dr Wioletta Olejarz

Według danych światowych, podawanych przez WHO, czy też danych krajowych, podawanych w Polsce przez Główny Inspektorat Sanitarny, otyłość stanowi istotny problem zdrowotny i socjoekonomiczny, dotyczące wszystkich grup społecznych i wiekowych. Szacuje się, iż w Polsce nadmierną masę ciała obserwuje się u 48% mężczyzn i 64% kobiet, jednak najwięcej uwagi zwraca się obecnie na problem otyłości wśród dzieci i młodzieży. Badania poszukujące przyczyn otyłości są więc bardzo aktualne i dotyczą różnych aspektów tego problemu. Wskazuje się m.in. na nieprzestrzeganie rekomendacji Instytutu Żywności i Żywienia przedstawionych w Piramidzie Żywnościowej. Mimo prowadzonych prozdrowotnych kampanii edukacyjnych wciąż niedoceniany jest społeczny problem nadwagi i/lub otyłości oraz możliwych skutków zdrowotnych w przyszłości dla różnych grup etnicznych i społecznych. Poszukiwanie mechanizmów rozwoju czy zwiększonej podatności na rozwój otyłości stwarza szeroki obszar do badań i działań naukowców, które skupiają się na różnych aspektach tego problemu.

W świetle powyższych informacji problem badawczy podjęty przez Panią mgr Martę Włodarczyk poszukujący potencjalnych czynników patogenetycznych otyłości i analizujący związek wybranych polimorfizmów genetycznych, jako czynników determinujących poziom endogennych uszkodzeń DNA, w patogenezie otyłości jest ważny i interesujący. Biorąc pod uwagę, iż dane literaturowe dotyczące tego problemu są wciąż stosunkowo nieliczne, wybór tematu Rozprawy doktorskiej jest trafny, zgodny

z kierunkiem współczesnych badań biomedycznych oraz aktualnym stanem wiedzy. Ponadto tematyka przedłożonej do oceny Dysertacji wpisuje się znakomicie w kierunki badań prowadzonych z powodzeniem od lat przez Promotora, Panią Profesor Grażynę Nowicką, która jest ekspertem w dziedzinie badań nad otyłością i indukowanymi przez nią zaburzeniami.

Ocenianą Rozprawę doktorską stanowi monotematyczny cykl pięciu publikacji – czterech eksperymentalnych, w których zostały przedstawione wyniki uzyskane w ramach prowadzonych badań własnych przez Panią mgr Martę Włodarczyk oraz jednej pogłądowej, która omawia teoretyczne aspekty badanego problemu naukowego, dotyczące powiązania między uszkodzeniami DNA, a otyłością i rozwojem chorób powstających w wyniku zaburzeń biochemicznych jej towarzyszących. Wszystkie te prace zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym znajdujących się na liście JCR takich jak: International Journal of Molecular Sciences, Nutriens, Biochemical Genetics oraz Molecular Biology Reports (2 prace), o łącznej punktacji MNISW=110 i współczynniku wpływu (IF) równym 13,216. We wszystkich tych pracach Pani magister Marta Włodarczyk jest pierwszym autorem, a do każdej z nich dołączone są właściwe oświadczenia pozostałych współautorów.

Zbiór omawianych publikacji opatrzony jest wymaganym dla takiej formy Rozprawy doktorskiej Opracowaniem, na które składa się *Streszczenie*, w języku polskim i angielskim, lista użytych skrótów, *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiał i metody badawcze oraz Wyniki i ich omówienie*, które stanowią zasadniczą część Dysertacji. Opracowanie zawiera ponadto rozdział *Podsumowanie, Wnioski oraz Piśmiennictwo*. Co warte podkreślenia, realizacja założeń niniejszej Rozprawy, dotycząca wpływu diety na poziom uszkodzeń DNA, była częściowo finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu nr. N404042/32/0945 pt. „Spożycie witamin antyoksydacyjnych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych a stabilność genomu”.

Wstęp wprowadza dobrze w zagadnienia dotyczące uszkodzeń w łańcuchu DNA indukowanych czynnikami, które współistnieją z zaburzeniami obserwowanymi u osób z otyłością, jak zaburzenia metabolizmu lipidów i glukozy, rozwój stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego. Przedstawia także znaczenie mechanizmów detoksykacyjnych, antyoksydacyjnych i naprawczych w tych zaburzeniach. *Cel pracy* przekonująco uzasadnia wybór podjętych zadań badawczych i szczegółowo przedstawia ich założenia w postaci czterech celów szczegółowych. W rozdziale *Materiał i metody badawcze* Doktorantka przedstawia charakterystykę badanych osób, skasyfikowanych wg. kryteriów WHO do grupy z nadwagą i otyłością oraz osób z prawidłową masą ciała, które stanowiły grupę odniesienia. Uczestnicy badania byli rekrutowani spośród pacjentów Poradni Chorób Metabolicznych działającej przy Instytucie Żywności i Żywienia w Warszawie. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę właściwej Komisji Bioetycznej, choć w przedstawionym Opracowaniu brakuje numeru zgody tejże komisji, nie znalazłam jej również w opublikowanych pracach. Doktorantka przedstawia kryteria

wyłączenia osób do badania, podaje rodzaj materiału biologicznego wykorzystanego do badań oraz zastosowane metody badawcze, co jest wystarczające dla tego rodzaju Dysertacji, gdyż wszystkie te informacje są odpowiednio opisane w załączonych publikacjach. Rozdział *Wyniki i ich omówienie*, zawiera wszystkie uwzględnione w pracy publikacje, które poprzedzone są syntetycznym ich opisem obejmującym założenia tych prac, uzyskane wyniki oraz ich efekty i znaczenie naukowe. Informacje te, wraz z publikacjami do których się odnoszą, są zgrupowane w odpowiednie podrozdziały, co stanowi właściwą formę ich przedstawienia. *Podsumowanie* oraz *Wnioski*, w liczbie czterech, w sposób syntetyczny przedstawiają i interpretują opisane spostrzeżenia poczynione w wyniku przeprowadzonych badań. Potwierdzają one zasadność wybranego celu pracy oraz wskazują na ich znaczenie nie tylko naukowe ale również potencjalne znaczenie praktyczne. Opracowanie kończy rozdział *Piśmiennictwo*, zawierający 44 pozycje literaturowe sięgające bieżącego roku, które częściowo zostały również zawarte we wchodzących w skład Dysertacji publikacjach.

Przedstawiona do oceny Rozprawa jest oparta na ważnych założeniach i interesujących wynikach badań opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu światowym. Głównym przedmiotem prac składających się na cykl publikacji stanowiący niniejszą Dysertację są badania, oparte na wskazywanym istotnym wpływie określonych składników diety w utrzymaniu integralności genomu u osób z nadwagą i otyłością i ich roli w indukowaniu endogennych zaburzeń genomu. Pani mgr Marta Włodarczyk podejmując próbę oceny wpływu sposobu żywienia, z uwzględnieniem dostarczania z dietą witamin o właściwościach antyoksydacyjnych, na poziom uszkodzeń DNA, bardzo dobrze wpisła się w światowe trendy badań nad otyłością, zwłaszcza na poziomie molekularnym. Interesującym aspektem podjętych przez Panią mgr badań była analiza związku polimorfizmów genetycznych w wybranych genach (takich jak *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *XPD* i *TNF- α*) związanych zarówno z procesem naprawy DNA, jak i z procesem detoksykacji, na poziom endogennych uszkodzeń DNA.

Doktorantka przeprowadziła zasadnicze badania u osób z nadwagą i otyłością, a także z prawidłową masą ciała i odniosła je również do wyników analizy składu ciała dokonaną metodą bioimpedancji przy użyciu aparatu TANITA oraz różnych parametrów laboratoryjnych. Oceńiła zwyczaje żywieniowe i przyjęcie składników pokarmowych z dietą poprzez przeprowadzenie 3-dniowego wywiadu żywieniowego. Uwzględniła także nałóg palenia, oraz określiła kryteria wyłączenia. Badaniami objęła 340 osób (240 kobiet i 100 mężczyzn), w wieku od 19 do 62 lat, choć wskazanym byłoby doprecyzowanie czy w poszczególnych publikacjach wchodzących w skład Dysertacji badania dotyczyły tych samych osób, czy były to wyodrębnione grupy.

Doktorantka w grupie otyłych kobiet wykazała ponad dwukrotnie wyższy poziom uszkodzeń DNA w porównaniu do kobiet bez otyłości. Zaobserwowała istotną, dodatnią korelację między parametrami stanu zapalnego (stężenie hsCRP), a poziomem uszkodzeń DNA. Analiza statystyczna pozwoliła na wskazanie jako istotnych predyktorów poziomu endogennych uszkodzeń DNA takich czynników jak:

wskaźnik masy ciała (BMI), dzienne spożycie energii (kCal/dzień) oraz witaminy C (mg/dzień). Ponadto wykazała, iż wyższe stężenie hsCRP i wyższy poziom uszkodzeń DNA występował u homozygot GG w genie *TNF- α* w stosunku do osób będących nosicielami allala A. Istotną obserwacją było stwierdzenie, iż to jednak otyłość jest kluczowym i niezależnym czynnikiem wpływającym na poziom uszkodzeń DNA. Z kolei u osób zdrowych i niepalących, spośród ocenionych wariantów genetycznych, obecność wariantu zerowego (-) w genie *GSTM1* predysponuje do uszkodzeń DNA. Natomiast u osób palących poziom uszkodzeń DNA był wyższy w porównaniu do niepalących, jednakże zarówno wśród palących jak i niepalących, homozygoty AA miały niższy poziom uszkodzeń DNA niż nosiciele allela C w genie *XPD*. Uzyskane wyniki bezsprzecznie pokazują, co należy podkreślić, iż otyłość jest kluczowym czynnikiem determinującym ilość uszkodzeń DNA, a poziom uszkodzeń DNA u takich osób może być modyfikowany poprzez zwiększone spożycie witamin o właściwościach antyoksydacyjnych, co może stanowić ważne rekomendacje na przyszłość, a także jak podaje Doktorantka, może być pomocne w utrzymaniu integralności struktury DNA u osób otyłych.

Z obowiązku Recenzenta, muszę jedynie zwrócić uwagę na pewne sformułowania pojawiające się w niniejszym Opracowaniu, do którego się odnoszę, gdyż opublikowane manuskrypty prac, zostały już ocenione przez zespół międzynarodowych ekspertów, co pozwala Recenzentowi na ich przeczytanie i analizę z zainteresowaniem. Mogę jedynie wyrazić pozytywną opinię o przeprowadzonych badaniach i wyrazić uznanie do uzyskanych wyników i ważności poczynionych na ich podstawie obserwacji oraz wyciągniętych wniosków. Pewne wątpliwości budzi jedynie określenie „cytochromy P450 (CYP)”, gdyż w nomenklaturze naukowej stosowane jest raczej określenie w liczbie pojedynczej – cytochrom P450 lub izoenzymy cytochromu P450. Ponadto określenie „dowóz z dietą”, powinien być raczej zastąpiony określeniem - dostarczanie z dietą. Również stwierdzenie „Poziom spożycia składników odżywczych z dietą”, powinien być raczej opisany jako „3-dniowy wywiad żywieniowy”. Są to jedynie drobne uwagi, które w żaden sposób nie umniejszają ważności uzyskanych wyników i poczynionych obserwacji.

W oparciu o przedłożoną do oceny Dysertację i załączone publikacje, mogę stwierdzić, iż Pani mgr Marta Włodarczyk w pełni zrealizowała założony cel pracy. Wyrazem naukowej wartości oraz oryginalności i nowatorskiego charakteru przeprowadzonych badań, jak już wspominałam wcześniej, było ich opublikowanie w renomowanych czasopismach z listy JCR, a zatem i recenzowanie przez międzynarodowy zespół ekspercki, co moim zdaniem znacząco podnosi ich ocenę merytoryczną. Przedstawiony do oceny cykl prac, składających się na Rozprawę doktorską Pani mgr Marty Włodarskiej, stanowi oryginalny i znaczący wkład do współczesnej wiedzy na temat patomechanizmów otyłości i roli polimorfizmów genetycznych jako czynników determinujących poziom endogennych uszkodzeń DNA u osób otyłych. Stwarza to jednocześnie przesłanki do ich wykorzystania jako nowych predyktorów, przydatnych w diagnostyce i monitorowaniu omawianych zaburzeń związanych z

otyłością. Kontynuacja tych badań w systemie follow up byłoby cennym uzupełnieniem i rozwinięciem podjętego wątku badawczego.

Reasumując, z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, iż Dysertacja Pani mgr Marty Włodarskiej, opatrzona tytułem „Otyłość oraz wybrane polimorfizmy genetyczne jako czynniki determinujące poziom endogennych uszkodzeń DNA” w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim i spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003 r. (Dz.U.2003 Nr 65 poz. 595 z późn.zm.) dla uzyskania stopnia naukowego doktora i świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia pracy naukowej. Z pełnym przekonaniem przedkładam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Marty Włodarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto zważywszy na elementy nowości naukowej, zawarte w ocenianej Dysertacji, zastosowanie złożonego warsztatu metodycznego, pozwalającego na przeprowadzenie wielostronnych analiz, a także potencjalne znaczenie praktyczne przedstawionych badań, wnoszę o wyróżnienie Rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Włodarskiej.

31.05.2019r., Wrocław

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA i ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
kierownik

prof. dr hab. Agnieszka Piwowar