Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

Katowice / 10.07.2023 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej Pani Magister Anny Kiepury z Katedry Farmakologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie
zatytułowanej: *„Rola receptora dla kwasów tłuszczowych FFAR4 w hamowaniu miażdżycy oraz niealkoholowego stłuszczenia wątroby"*
wykonanej pod opieką Profesora Rafała Olszaneckiego

Klinika
Chorób Wewnętrznych
i Farmakologii Klinicznej
Katedry Farmakologii

40-752 Katowice,
ul. Medyków 18
www.sum.edu.pl

KIEROWNIK KATEDRY i KLINIKI
prof. Bogusław Okopień
bokopien@sum.edu.pl

SEKRETARIAT KATEDRY
tel.: +48 32 252 39 02
fax: +48 32 288 85 32
farmklin@sum.edu.pl

SEKRETARIAT KLINIKI
tel.: +48 32 789 43 40
fax: +48 32 789 43 43
cwf@uck.katowice.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Przedstawiona do oceny dysertacja liczy 58 stron, na które składają się trzy opublikowane prace naukowe o współczynniku oddziaływania IF 15 punktów (MEiN=340) (Kwartyle: Q1 jedna praca, Q2 dwie prace) wraz z komentarzami w języku polskim. We wszystkich publikacjach Kandydat jest pierwszym autorem. Doktorantka zamieściła również streszczenia w języku polskim i angielskim, 23 pozycje piśmiennictwa do komentarzy oraz oświadczenia współautorów publikacji o ich udziale w tworzeniu dzieł na stronach 59-72.

Głównym zagadnieniem poszukiwań naukowych Pani magister Anny Kiepury było ustalenie jakie mechanizmy molekularne są zaangażowane w przeciwmiażdżycową i przeciwstłuszczeniową aktywność receptorów FFAR4. W tym aspekcie Badaczka oceniła działanie agonisty tego receptora, tj. związku TUG-891. W pracy przeglądowej Doktorantka przedstawiła ustalone mechanizmy działania agonistów FFAR4 w korygowaniu zaburzeń metabolicznych.

Następnie wykazała eksperymentalnie, że agonista TUG-891 przekształca makrofagi do ochronnego dla tkanek fenotypu M2. Wreszcie Kandydatka wykazała, że stłuszczeniowe uszkodzenie wątroby można osłabić pobudzeniem receptora FFAR4.

Autorka na wstępie dokładnie przedstawia etiopatogenezę miażdżycy i stłuszczenia wątroby, a szczególną uwagę zwraca na kontekst metaboliczny tj. insulinooporność i aktywację układu odpornościowego. Umiejętnie opisuje zmiany patomorfologiczne towarzyszące tym procesom.

Następnie Doktorantka analizuje kwasy tłuszczowe i miejsca ich działania, zwłaszcza receptory błonowe sprzężone z białkami G (FFAR). Wiadomości zestawia w dokładnej autorskiej tabeli. Logicznie opisuje efekty pobudzenia receptora FFAR4 (Cell 2010, 142, 687). Wreszcie analizuje podobieństwa i różnice w działaniu i swoistości agonistów receptora FFAR4 (Mol. Pharmacol. 2013, 84, 710).

Później Kandydatka formułuje cele pracy oraz dokonuje wyboru założeń wyjściowych. U ich podstaw legł przeprowadzony wcześniej gruntowny przegląd aktualnego piśmiennictwa.

Pani magister Anna Kiepura detalicznie komentuje zastosowany materiał i wykorzystane przez siebie metody badawcze. Przytacza numer zezwolenia Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie z 2018 roku (str. 39). Autorka włączyła do eksperymentu myszy transgeniczne apoE-Knockout podając im od ósmego tygodnia dietę zawierającą 10% tłuszczu. Następnie dokonała podziału na grupę kontrolną oraz otrzymującą TUG-891 podskórnie w dawce 20mg/kg 3 razy w tygodniu przez 4 miesiące. Opisano procedurę przygotowania i przechowywania roztworu do iniekcji. Tkanki potrzebne do oznaczeń po zakończeniu badania to aorta, serce, wątroba, krew i płyn otrzewnowy.

Wykonano typowe barwienia Oil Red i hematoksylina-eozyna. Zmiany fenotypu określono metodą RT-PCR i barwieniami immunohistochemicznymi z wybranymi znacznikami.

Badaczka wykorzystała także cytometrię przepływową oraz proteomikę różnicową. Powszechnie stosowanymi metodami mierzono stężenie lipidów we krwi i w wątrobie, enzymów wątrobowych, cytokin i molekuł adhezyjnych.

Kandydatka izolowała także makrofagi ze szpiku kostnego myszy, hodowała je przez tydzień na odpowiednim podłożu i po zastosowaniu LPS oraz TUG-891 oznaczała ekspresję mRNA markerów fenotypu makrofagów.

Doktorantka posługiwała się w ocenie wyników metodami statystycznymi typowymi dla badań przedklinicznych na zwierzętach. Do ich wykonania wykorzystała odpowiednie oprogramowanie.

Pierwsza z zaliczonych do osiągnięcia praca ukazała się w Biomedicines 2021, 9, 467 (IF=4,757): „Anti-atherosclerotic potential of free fatty acid receptor 4 (FFAR4)". Doktorantka

zarówno co do tej jak i następnych publikacji cyklu dokładnie przedstawiła swój przeważający udział w ich wykonaniu, jest też pierwszym autorem każdej z nich. Praca to wyczerpujące studium wykorzystania stymulacji receptora 4 dla wolnych kwasów tłuszczowych w modulacji fenotypu makrofagów. Wśród 49 pozycji celnie cytowanego piśmiennictwa znalazło się nawiązanie do wcześniej uzyskanych wyników (Pharmacol. Rep. 2019, 71, 551). Pani magister Kiepura wskazuje na możliwe terapeutyczne wykorzystanie agonistów FFAR4 w leczeniu miażdżycy i stłuszczenia wątroby.

Kandydatka przeprowadziła także ważny eksperyment *in vivo* potwierdzający hamowanie progresji miażdżycy poprzez pobudzenie receptora FFAR4. Opisała te obserwacje w drugiej publikacji osiągnięcia „The anti-atherosclerotic action of FFAR4 agonist TUG-891 in apoE-knockout mice is associated with increased macrophage polarization towards M2 phenotype" (Int. J Mol. Sci. 2021, 22, 9772) IF=6,208. Skomplikowany tekst został bardzo dobrze uzupełniony tabelami, rycinami i fotografiami dla ułatwienia odbioru. Znakomicie wykorzystano techniki badawcze, tj. barwienia, oznaczenia ekspresji mRNA, immunohistochemię, cytometrię przepływową. W 26 pozycjach cytowanego piśmiennictwa znalazła się autocytacja pierwszej pracy osiągnięcia. Autorka dokonała logicznej konstatacji, że zahamowania postępu miażdżycy związane jest z fenotypową transformacją makrofagów blaszek miażdżycowych po pobudzeniu receptora FFAR4.

Trzecia praca to dokonanie oryginalne opublikowane online 27.01.2023 w Cardiovasc. Drugs. Ther. (https://doi.org/10.1007/s10557-023-07430-7) IF=3,947. Tytuł: „ The influence of the FFAR4 agonist TUG-891 on liver steatosis in apoE-knockout mice".

Pani magister Kiepura wykazała *in vivo*, że pobudzenie receptora FFAR4 istotnie hamuje progresję stłuszczenia wątroby. Ponownie zastosowano nowoczesne procedury badawcze, tj. RT-PCR, chromatografię cieczową, izolację subfrakcji mitochondrialnej i cytozolowej hepatocytów, spektrometrię masową oraz zaawansowane sposoby grupowania i interpretacji wyników. Bogata dokumentacja została umiejętnie i wyczerpująco przedyskutowana w oparciu o 50 pozycji trafnie zacytowanego piśmiennictwa.

Poziom merytoryczny prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej docenili recenzenci i redaktorzy uznanych międzynarodowych periodyków naukowych.

Eksperymenty zostały zaplanowane i wykonane w znakomitym Ośrodku Pana Profesora Rafała Olszaneckiego pod Jego opieką, a zarazem są twórczą kontynuacją osiągnięć Pana Profesora.

Na zakończenie Badaczka przeprowadza liczącą cztery strony dyskusję zakończoną podsumowaniem i wnioskami. Lektura tego komentarza pozwala dobrze usystematyzować dane z prac wybranych do osiągnięcia. Doktorantka umiejętnie wiąże wykonane eksperymenty z zapalną przyczyną miażdżycowego uszkodzenia naczyń (Immunity 2013, 38, 1154; Cell 2010, 142, 687). Dostrzega wspólne ogniwa tych procesów z sygnałem insulinowym. Opisuje mechanizmy transformacji makrofagów z blaszek miażdżycowych, szpiku kostnego oraz jamy otrzewnowej myszy. Pani magister nie ogranicza dyskusji jedynie do makrofagów, omawia efekty stymulacji FFAR4 na endocytach aorty i miocytach mięśni gładkich (Chem. Biol. Interact. 2020, 316, 108916).

Kolejnym wątkiem wywodu jest prewencja stłuszczeniowego zapalenia wątroby poprzez pobudzenie receptora FFAR4 (Eur. J Pharmacol. 2018, 820, 31). Poruszane są efekty osłabienia lipogenezy w hepatocytach oraz utlenianie w tych komórkach wolnych kwasów tłuszczowych.

Ważne, że Kandydatka zdaje sobie sprawę z ograniczeń eksperymentów polegających na braku możliwości zdefiniowania, który bezpośrednio mechanizm łączy sygnał z receptora FFAR4 ze zmianą fenotypu komórek biorących udział w powstawaniu miażdżycy. Umiejętność krytycznego spojrzenia na własne dokonania to bardzo trudny, ale niezbędny dowód dojrzałości naukowej.

Uzyskane wyniki nie tylko potwierdzają znaczenie szlaków związanych z FFAR4 dla metabolizmu, ale wyraźnie zachęcają do prowadzenia dalszych badań w tym zakresie. Doktorantka celnie upatruje zasadności porównania efektów działania hepatoprotekcyjnego TUG-891 ze znanym lekiem hamującym stłuszczenie wątroby i insulinooporność, tj. metforminą. Interesującym przedmiotem badań farmakodynamicznych byłoby jednoczesne z podawaniem TUG-891 podanie antagonisty FFAR4, np. AH-7614. Wreszcie zadaniem na przyszłość będzie zsyntetyzowanie specyficznego agonisty FFAR4, najlepiej do podawania doustnego, dla ewentualnego zastosowania leczniczego. Oczywiście możliwość taka zaistnieje po optymalizacji dawek i kompozycji związków chemicznych w próbach klinicznych.

Trudno mówić o niedociągnięciach w przypadku opublikowanych już i ocenionych przez recenzentów znakomitych czasopism, manuskryptów. Prace te jasno dowodzą, że Kandydatka posiadła umiejętność trafnego doboru piśmiennictwa oraz projektowania i przeprowadzania żmudnych i skomplikowanych eksperymentów.

Dlatego w konkluzji stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska została bardzo dobrze wykonana. Wnosi ona ważne i nowe informacje do naszej wiedzy na temat efektów pobudzenia receptora FFAR4 mających potencjalne implikacje terapeutyczne.

Cel rozprawy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Badaczki, która opanowała niełatwy i na wskroś nowoczesny warsztat badawczy oraz uzyskała znakomite przygotowanie merytoryczne. Praca ta stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych i w pełni odpowiada wymaganiom stawianym dysertacjom doktorskim, o czym niewątpliwie świadczy analiza bibliometryczna wybranych przez Doktorantkę publikacji.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 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 2017 r., poz. 1789).

Zatem mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pani magister Anny Kiepury do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie ocenionej pracy po spełnieniu wymogów formalnych obowiązujących w Uniwersytecie Jagiellońskim Collegium Medicum w Krakowie.

W opinii recenzenta, po zapoznaniu się z nadesłaną dokumentacją, Kandydatka spełniła warunki wyróżnienia dysertacji.

KIEROWNIK
Katedry Farmakologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
prof. dr hab. n. med. Bogusław Okopień