



Warszawa, dn. 02.01.2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Karola Maksymiliana Górskiego
pt. *„Ocena wpływu klozapiny i olanzapiny na ekspresję wybranych genów szlaku
insulinowego oraz wybranych cząsteczek regulacji epigenetycznej w ludzkich
preadipocytach”*

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w II Klinice Psychiatrii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. n. med. Tadeusz Pietras, a Promotorem pomocniczym dr Michał Karbownik.

Pan mgr Karol Górski ukończył Wydział Farmacji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Obecnie jest zawodowo związany z Zakładem Farmakologii Klinicznej Łódzkiego Uniwersytetu Medycznego. W roku 2021 ukończył podyplomowe studia na kierunku Biologia Molekularna na Uniwersytecie Jagiellońskim. Dotychczas opublikował 3 prace o łącznym wskaźniku IF > 10.

Rozprawa zawiera wszystkie elementy pracy doktorskiej, w tym spis treści, wykaz skrótów, wprowadzenie, hipotezy, cel pracy oraz wyniki. Pracę zamykają dyskusja, podsumowanie wyników, wnioski oraz streszczenia. Dysertacja napisana jest w języku polskim i cechuje ją bogate piśmiennictwo (ok. 200 pozycji).

Wartość naukowa rozprawy

Rozprawa dotyczy analizy wpływu klozapiny i olanzapiny, leków przeciwpsychotycznych II generacji, na aktywność wybranych genów szlaku insulinowego oraz wybranych cząsteczek RNA (tj. microRNA oraz lncRNA). Insulinooporność odgrywa kluczową rolę w rozwoju zespołu metabolicznego, który stanowi istotny problem medyczny i społeczny. W Polsce średnio u co trzeciej osoby po 40 roku życia można zdiagnozować zespół metaboliczny, a kryterium podstawowym rozpoznania zespołu jest otyłość brzuszna. Nietolerancja glukozy, wysoka glikemia,



nadciśnienie tętnicze, wysokie stężenie trójglicerydów oraz niskie stężenie cholesterolu frakcji HDL należą do kryteriów współistniejących. Proponuje się, że istnieje związek pomiędzy występowaniem zespołu metabolicznego a zaburzeniami zdrowia psychicznego. Wskazuje się, że u osób otyłych ryzyko rozwoju zaburzeń psychicznych zwiększa się o ponad połowę.

Przyjmuje się, że tak jak w przypadku innych chorób kompleksowych, podłoże genetyczne odgrywa istotną rolę w patogenezie insulinooporności/zespołu metabolicznego, choć jak dotąd wiedza na ten temat jest ograniczona. Dodatkowym problemem, który zasygnalizował sam Doktorant jest obserwacja, że same leki neuroleptyczne (do których należą klozapina oraz olanzapina) wykazują potencjał diabetogenny. Mechanizm tego zjawiska jest słabo poznany, ale wskazuje się, że leki te mogą indukować insulinooporność, przyrost masy ciała oraz prowadzić do rozwoju innych składowych zespołu metabolicznego. Zatem przedmiot badań jest ważny zarówno społecznie, jak i z naukowego punktu widzenia w kontekście zrozumienia roli genetycznych składowych patogenezy zespołu i insulinooporności.

Interesujące jest podejście eksperymentalne, w którym Doktorant łączy elementy farmakologii klinicznej z analizą procesów i mechanizmów molekularnych w kontekście regulacji genów kodujących białka szlaku insulinowego. Mechanizmy insulinooporności są badane od lat, ale zastosowanie nowoczesnych technik molekularnych pozwala na szerszą analizę patogenezy z uwzględnieniem ekspresji genów związanych z zaburzeniami prawidłowej aktywności szlaku insulinowego. Celem jaki postawił sobie Doktorant była ocena wpływu klozapiny i olanzapiny na ekspresję mRNA czterech genów szlaku insulinowego (IRS-1, PTEN, PIK3R1 i PIK3CG) oraz ocena ekspresji cząsteczek RNA, które uczestniczą w epigenetycznej regulacji ekspresji genów (microRNA i lncRNA): miR-152-3p, miR-214-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-126-3p oraz XIST, H19, SNHG16 i PVT1. Badania prowadzone były z wykorzystaniem linii komórkowej ludzkich wisceralnych preadipocytów w warunkach *in vitro*. Doktorant testował efekt badanych



leków w trzech punktach czasowych i przy zastosowaniu różnych stężeń leków. Otrzymane wyniki zostały odpowiednio przeanalizowane i przedyskutowane. Doktorant sformułował 11 wniosków wskazując m.in., że w niższych stężeniach klozapina i olanzapina zwiększają żywotność komórek. Jednocześnie zaobserwował w tych komórkach obniżoną ekspresję genów IRS-1 i PIK3CG. W przeciwieństwie do zaobserwowanej obniżonej ekspresji szlaku insulinowego, ekspresja badanych miR-152-3p, miR-214-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p oraz lncRNA SNHG16 była zwiększona. Wyniki te świadczą o tym, że atypowe neuroleptyki mogą istotnie deregulować poziom ekspresji genów i molekularnych regulatorów szlaku insulinowego.

Przedstawione badania nad mechanizmami epigenetycznymi, które są kluczowe w regulacji ekspresji genów szlaku insulinowego mają charakter nowatorski. Można oczekiwać, że dane te będą opublikowane w czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym.

Wartość merytoryczna rozprawy

Wartość merytoryczną rozprawy całościowo oceniam pozytywnie. Wstęp jest obszerny. Doktorant omawia poszczególne zagadnienia płynnie, łącząc pozornie dalekie obszary wiedzy. Części dotyczące opisu zespołu metabolicznego, jak i charakterystyki leków uwzględniając ich skutki uboczne oraz co najważniejsze, insuliny i szlaku insulinowego są wyczerpujące. Podane informacje są oparte na bogatej literaturze. Całą pracę uzupełniają czytelne i informatywne tabele i schematy. W mojej ocenie niedosyt pozostawia zbyt pobieżna charakterystyka roli microRNA i lncRNA w regulacji ekspresji genów.

Cel, pytania badawcze oraz hipotezy zostały poprawnie zdefiniowane. Wyniki zostały właściwie opisane i zaprezentowane w postaci wykresów. Dodatkowo, każdy wynik został opatrzony krótkim komentarzem. Analiza statystyczna/dobór testów był właściwy.



Dyskusja jest bardzo wartościowym elementem dysertacji. Doktorant wyczerpująco omawia otrzymane dane i odnosi się do dostępnych danych literaturowych. Bardzo pozytywnie oceniam włączenie do pracy sekcji „Ograniczenia”. W tej części Doktorant analizuje elementy, które mogły wpłynąć na otrzymane dane, proponując jednocześnie działania, które w przyszłości mogą posłużyć do weryfikacji otrzymanych danych. Sposób analizy wyników przedstawiony w Dyskusji świadczy o dojrzałości naukowej i dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktoranta.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Praca jest napisana poprawnym językiem, z zachowaniem adekwatnej terminologii. Układ pracy oraz styl oceniam pozytywnie. Błędy edytorskie i językowe są nieliczne. Tekst jest wzbogacony schematami i tabelami. Pewien problem stanowi zapis podziałów sekcji, mamy bowiem np. trzy sekcje 2.1: „2.1. Podział neuroleptyków na str. 19”, a następnie „2.1. Test żywotności komórek MTT na str. 53” oraz „2.1. Ekspresja mRNA po 24 – godzinnej ekspozycji preadipocytów na leki przeciwpsychotyczne na str. 71”.

Uwagi i pytania

Przedstawione poniżej uwagi i pytania nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy. Poproszę Doktoranta o zapoznanie się z poniższymi komentarzami i odniesienie się do pytań 3-5:

1. W sekcji „Wykaz skrótów” Doktorant podaje rozwinięcie skrótu kDa. Moim zdaniem poprawniej byłoby rozwinąć ten skrót jako „jednostka masy atomowej/cząsteczkowej” zamiast „molowej”. Jednocześnie zabrakło rozwinięcia skrótu Da, który został użyty na str. 29 (i tu już Doktorant odniósł się do „masy cząsteczkowej” insuliny).

Zwracam też uwagę na zapis „schemat XYZ” – str. 57 .

2. Na str. 49 pojawia się opis składu podłoża hodowlanego. Uważam, że powinien być podany dokładny skład medium, zamiast lakonicznego stwierdzenia „zawiera wszystkie



potrzebne substancje”.

3. Dlaczego w badaniach ograniczono się tylko do analizy ekspresji wybranych genów i miRNA/lncRNA. Czym Doktorant kierował się przy ich wyborze? Dlaczego Doktorant nie zdecydował się na zastosowanie techniki RNAseq do oceny ekspresji genów w badanych/traktowanych lekami komórkach.

4. Ad. Sekcji „1.2 Ekspozycja komórek na leki neuroleptyczne”. Czy próbami kontrolnymi były komórki traktowane DMSO (str. 52)?

5. Dlaczego nie podjęto się walidacji wyników z wykorzystaniem techniki Western blot? Czy nie byłoby celowym sprawdzenie nie tylko poziomu ekspresji badanych genów, ale również poziomu ich aktywacji (z użyciem odpowiednich przeciwciał)?

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pana mgr. Karola Maksymiliana Górskiego „*Ocena wpływu klozapiny i olanzapiny na ekspresję wybranych genów szlaku insulinowego oraz wybranych cząsteczek regulacji epigenetycznej w ludzkich preadipocytach*” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.).

Zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Karola Maksymiliana Górskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.