



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Zakład Histologii i Embriologii

prof. dr hab. Marcin Ruciński

Collegium Anatomicum, ul. H. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

tel.: +48 690 938 038, e-mail: marcinruc@ump.edu.pl

Poznań, 24.03.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Jakuba Bienia

pt. "Rola peptydu MOTS-c w funkcjonowaniu endokrynej części trzustki"

Mgr Jakub Bień uzyskał tytuł zawodowy magistra w dniu 26 czerwca 2019 roku na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Kandydat nie ubiegał się dotychczas o nadanie stopnia doktora. W zakresie doświadczenia zawodowo-naukowego Doktorant jest zatrudniony jako starszy referent techniczny w Katedrze Fizjologii i Biochemii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, w okresach: luty 2019 - sierpień 2022 oraz od lutego 2026 roku do chwili obecnej.

Cukrzyca typu II, otyłość oraz insulinooporność stanowią jedne z najpoważniejszych problemów zdrowotnych współczesnej cywilizacji, dotykając setki milionów ludzi na świecie. W tym kontekście niezwykle istotne są badania podstawowe zmierzające do lepszego zrozumienia regulacji funkcjonowania endokrynej części trzustki, a w szczególności mechanizmów modulujących wydzielanie insuliny i glukagonu. Peptyd mitochondrialnego pochodzenia MOTS-c, odkryty zaledwie dekadę temu przez zespół Lee, budzi rosnące zainteresowanie naukowców ze względu na swoje właściwości regulujące metabolizm, wrażliwość na insulinę oraz masę ciała. Pomimo obiecujących danych dotyczących jego działania na poziomie ogólnoustrojowym, wpływ tego peptydu na fizjologię trzustki pozostawał dotychczas niemal zupełnie niezbadany. Podjęta przez Doktoranta tematyka badawcza jest zatem jak najbardziej aktualna i wpisuje się w nurt

intensywnych poszukiwań naukowych w obszarze endokrynologii trzustki i regulacji metabolizmu.

Przedłożona rozprawa doktorska ma formę cyklu dwóch recenzowanych publikacji naukowych opublikowanych w czasopiśmie *Histochemistry and Cell Biology* (IF = 2,1 każda), uzupełnionych o streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, obszerny wstęp obejmujący aktualny stan wiedzy, szczegółowy opis celów i hipotez badawczych, materiałów i metod, wyników oraz dyskusji. W obu pracach Doktorant pełni rolę pierwszego autora, co świadczy o jego wiodącej roli w zaplanowaniu i przeprowadzeniu badań oraz przygotowaniu manuskryptów. Należy zaznaczyć, że obie publikacje ukazały się w recenzowanych, indeksowanych czasopismach z listy JCR, co potwierdza wartość naukową przedstawionych wyników.

Wstęp do rozprawy jest napisany starannie i w sposób przejrzysty prezentuje aktualny stan wiedzy na temat peptydów mitochondrialnego pochodzenia (MDP), ze szczególnym uwzględnieniem MOTS-c. Doktorant kompetentnie omówił biochemię i biologię MOTS-c, uwzględniając mechanizm jego translacji, konserwatywność sekwencji między gatunkami, szlaki sygnałowe, na które wpływa (AMPK, cykl metioninowo-folianowy), oraz znane efekty ogólnoustrojowe. Solidnie przedstawiono również niezbędny kontekst dotyczący budowy i funkcji trzustki - zarówno w odniesieniu do komórek α i β wysp Langerhansa, jak i wydzielanych przez nie hormonów. Omówiono ponadto patofizjologię cukrzycy i jej klasyfikację, co stanowi właściwe tło dla prezentowanych badań. Stosunkowo skromna literatura dotycząca bezpośredniego wpływu MOTS-c na trzustkę - liczącą kilka pozycji - dobrze odzwierciedla aktualny stan wiedzy i uzasadnia oryginalność podjętej tematyki.

Zastosowany warsztat metodyczny jest szeroki i adekwatny do postawionych celów badawczych. Doktorant wykorzystał komplementarne modele badawcze: linie komórkowe INS-1E (komórki β) i α TC-1 (komórki α), a także izolowane wyspy trzustkowe szczura i świni jako modele bardziej złożone i fizjologicznie bliższe rzeczywistości. Jest to podejście metodycznie uzasadnione i godne pochwały. Do oceny sekrecji i ekspresji MOTS-c, insuliny oraz glukagonu zastosowano odpowiednio: testy ELISA/RIA gatunkowo specyficzne, real-time PCR do oceny transkryptów mRNA, Western blot do oceny ekspresji białkowej oraz barwienie immunofluorescencyjne do lokalizacji peptydu w

tkankach. Żywotność, proliferację i apoptozę komórek oceniano za pomocą standardowych testów (MTT, BrdU, Cell Death Detection ELISA). Dobór stężeń peptydów (1, 10 i 100 nM) oraz składników odżywczych (2, 6 i 16 mM glukozy, wolne kwasy tłuszczowe) jest uzasadniony fizjologicznie. Na pozytywną ocenę zasługuje staranna weryfikacja specyficzności zastosowanego przeciwciała anti-MOTS-c z użyciem dedykowanego peptydu blokującego. Analiza statystyczna (ANOVA z testem post hoc Dunnetta lub Tukeya) jest odpowiednia dla analiz uzyskanych wyników.

Wyniki prezentowane w rozprawie są oryginalne i wnoszą istotny wkład do wiedzy o biologii peptydu MOTS-c. Do najważniejszych odkryć należy zaliczyć: (1) potwierdzenie obecności MOTS-c w komórkach α i β trzustki oraz wyspach trzustkowych obu badanych gatunków; (2) wykazanie sprzężenia zwrotnego między MOTS-c a insuliną - insulina stymuluje wydzielanie MOTS-c, natomiast MOTS-c hamuje sekrecję insuliny; (3) protekcyjny wpływ MOTS-c na żywotność komórek β wysp trzustkowych; (4) odkrycie znacznej różnicy w masie cząsteczkowej MOTS-c między szczurem a świnią, co sugeruje odmienną strukturę i być może funkcję tego peptydu u różnych gatunków; (5) różną lokalizację MOTS-c w trzustce szczura (endokrynną i egzokrynną) w porównaniu do świni (wyłącznie endokrynną).

Dyskusja jest obszerna, osadzona w bieżącej literaturze i krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników. Doktorant w sposób wyważony omawia ograniczenia zastosowanych modeli in vitro oraz różnice między wynikami uzyskanymi na liniach komórkowych i wyspach trzustkowych, co świadczy o jego dojrzałości naukowej.

Mocne strony rozprawy oraz uwagi recenzenckie

1. Tematyka pionierska - są to pierwsze na świecie badania wpływu MOTS-c na funkcjonowanie trzustki z użyciem tak kompleksowego zestawu modeli badawczych, a także pierwsze badania MOTS-c na modelu świni domowej.

2. Komplementarność modeli badawczych - zastosowanie zarówno linii komórkowych (komórki α i β oddzielnie), jak i izolowanych wysp trzustkowych dwóch gatunków reprezentujących różną fizjologię trzustki.

3. Merytoryczna rzetelność - staranne potwierdzenie specyficzności przeciwciała, czytelna analiza statystyczna, prawidłowe normalizacje wyników.

4. Odkrycie różnicy w masie cząsteczkowej MOTS-c między szczurem a świnia - wynik szczególnie oryginalny, otwierający nowe kierunki badań.

5. Dobra znajomość literatury i krytyczne podejście do interpretacji własnych wyników.

Jako recenzent jestem zobowiązany do wskazania zagadnień wymagających wyjaśnienia lub uzupełnienia, które jednak nie obniżają ogólnej bardzo wysokiej oceny rozprawy doktorskiej. Należą do nich:

1. Ograniczenie do modeli in vitro - rozprawa opiera się wyłącznie na modelach in vitro, co Doktorant sam przyznaje w dyskusji. Należy jednak zauważyć pewną niespójność pomiędzy tytułem celu badań a zastosowaną metodologią: Doktorant deklaruje, że celem pracy było określenie wpływu peptydu MOTS-c na funkcjonowanie endokrynej części trzustki, podczas gdy wyniki uzyskane wyłącznie w warunkach in vitro mogą nie w pełni odzwierciedlać fizjologicznego działania MOTS-c w organizmie. Pełna realizacja tak sformułowanego celu wymagałaby uzupełnienia badań o model in vivo

2. Nieznana sekwencja MOTS-c świni - konieczność zastosowania sekwencji ludzkiej w eksperymentach na wyspach świni stanowi istotne ograniczenie interpretacyjne, choć Doktorant uzasadnia ten wybór i jest tego w pełni świadomy.

3. Brak walidacji genów referencyjnych - w badaniach ekspresji mRNA zastosowano pojedyncze geny referencyjne (GAPDH lub TBP) bez przeprowadzenia analizy ich stabilności ekspresji w badanych warunkach doświadczalnych. Czy w ramach wcześniejszych doświadczeń prowadzonych na tych samych modelach (linie INS-1E, α TC-1, wyspy szczura i świni) podjęto próbę walidacji stabilności genów referencyjnych w analogicznych warunkach doświadczalnych? Jeśli tak, czy wyniki tej analizy uzasadniają wybór GAPDH i TBP jako genów referencyjnych w prezentowanych doświadczeniach? Jeśli nie, jakie geny referencyjne Doktorant rozważałby jako alternatywne lub uzupełniające w ewentualnych przyszłych badaniach?

4. Nieznany receptor MOTS-c - brak zidentyfikowanego receptora dla MOTS-c utrudnia mechanistyczną interpretację obserwowanych efektów, jednak jest to ograniczenie wynikające z aktualnego stanu wiedzy w tej dziedzinie.

5. Brak skali lub powiększenia na zdjęciach immunofluorescencyjnych - na fotografiach prezentowanych w pracy nie zamieszczono paska skali ani informacji o zastosowanym powiększeniu obiektu w opisach rycin

6. Brak rozwinięcia niektórych skrótów - w wykazie skrótów lub przy pierwszym użyciu w tekście brakuje rozwinięcia następujących skrótów: BrdU (5-bromo-2'-deoksyurydyna), FBS (fetal bovine serum / płodowa surowica bydłęca), MTT (bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylotetrazoliowy), PVDF (polifluorek winylidenu) oraz SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Należy uzupełnić wykaz skrótów lub rozwinąć skróty przy ich pierwszym wystąpieniu w tekście.

7. Błędne użycie terminu „śmiertelność komórek” - w tekście rozprawy Doktorant posługuje się pojęciem „śmiertelność komórek”, które jest niepoprawne w kontekście biologii komórki. Termin „śmiertelność” odnosi się do zjawisk epidemiologicznych i populacyjnych (np. śmiertelność chorych). W odniesieniu do komórek należy używać określenia „śmierć komórek” (ang. cell death).

Mam również kilka pytań do doktoranta na które będę prosił o krótką odpowiedź w trakcie publicznej obrony:

1. W eksperymentach z liniami komórkowymi wykazano, że MOTS-c zwiększa żywotność komórek INS-1E (test MTT), jednocześnie obniżając apoptozę obu linii. Natomiast na komórkach α TC-1 obserwowano obniżenie żywotności (MTT) przy jednoczesnym zmniejszeniu apoptozy. Jak Doktorant interpretuje tę pozorną sprzeczność?

2. W doświadczeniach na wyspach trzustkowych szczura wykazano, że MOTS-c obniża zarówno sekrecję insuliny, jak i glukagonu, jednocześnie zwiększając ekspresję mRNA obu tych hormonów. Jak Doktorant tłumaczy tę rozbieżność pomiędzy poziomem sekrecji a poziomem transkryptu?

3. Do eksperymentów z liniami komórkowymi użyto sekwencji MOTS-c gatunkowo specyficznej (mysiej dla α TC-1, szczurzej dla INS-1E), natomiast w przypadku komórek INS-1E podana w rozdziale 6.2 sekwencja szczurza (MKRKEMGYIFFSQRTLRLNPL) liczy 20 aminokwasów, a nie 16 jak podają Lee i wsp. (2015). Proszę o wyjaśnienie tej rozbieżności.

4. Masę cząsteczkową MOTS-c świni oceniono na ok. 42 kDa, podczas gdy znane warianty tego peptydu u innych ssaków mają ok. 5 kDa. Czy Doktorant rozważał, że sygnał Western blot na tej wysokości może odzwierciedlać oligomeryzację MOTS-c lub niespecyficzne wiązanie przeciwciała z innym białkiem? Jakie dodatkowe eksperymenty mogłyby potwierdzić tożsamość tego białka jako MOTS-c świni?

5. Wyniki uzyskane na wyspach świni różnią się znacząco od wyników ze szczura - m.in. glukoza w stężeniu 6 mM powoduje najwyższe wydzielanie MOTS-c u świni, a najniższe u szczura. Biorąc pod uwagę, że w eksperymentach na świni zastosowano ludzki wariant peptydu MOTS-c, jak Doktorant ocenia, w jakim stopniu te różnice odzwierciedlają prawdziwą biologię MOTS-c świni, a w jakim mogą wynikać z ograniczeń zastosowanego modelu?

6. Jakie są perspektywy translacyjne opisanych badań? W jakim kierunku Doktorant planuje rozwinąć tę tematykę - czy przyszłe badania będą obejmować model *in vivo*, a jeśli tak, to jaki model patologiczny (np. szczur z STZ-indukowaną cukrzycą, mysz db/db) byłby najbardziej odpowiedni do weryfikacji protekcyjnego działania MOTS-c na komórki β ?

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr. Jakuba Bienia stanowi cenny i oryginalny wkład do wiedzy na temat biologicznej roli bioaktywnych peptydów w tym peptydu MOTS-c. Przeprowadzone badania, jako pierwsze na świecie opisujące w tak kompleksowy sposób wpływ tego peptydu na endokrynną część trzustki, posiadają zarówno wymiar poznawczy, jak i potencjalne implikacje dla zrozumienia patofizjologii cukrzycy typu II. Zastosowane metody badawcze są adekwatne i nowoczesne, wyniki zostały rzetelnie przedstawione i kompetentnie omówione, a Doktorant wykazał się dobrą znajomością podejmowanej problematyki naukowej oraz umiejętnością krytycznej oceny własnych wyników. Fakt, że prezentowane wyniki zostały opublikowane w dwóch artykułach w recenzowanym czasopiśmie z listy JCR, potwierdza ich wartość naukową.

Nie mam wątpliwości, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym

i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie mgr. Jakuba Bienia do dalszych etapów obrony. Mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną rozprawy opartej na załączonych publikacjach wnioskuję o jej wyróżnienie.

Marcin Ruciński



Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Jakuba Bienia ze względu na:

1. **Pionierski charakter badań** - pierwsze na świecie kompleksowe opracowanie dotyczące roli peptydu MOTS-c w funkcjonowaniu endokrynnej części trzustki.
2. **Oryginalne odkrycia** - identyfikacja różnic międzygatunkowych w masie cząsteczkowej i lokalizacji MOTS-c, otwierająca nowe kierunki badań.
3. **Wysoki poziom metodologiczny** - zastosowanie komplementarnych modeli badawczych (linie komórkowe oraz izolowane wyspy trzustkowe dwóch gatunków) oraz szerokiego spektrum nowoczesnych technik eksperymentalnych.
4. **Publikacyjny charakter rozprawy** - wyniki opublikowane w recenzowanym czasopiśmie z listy JCR, co potwierdza ich wysoką jakość i znaczenie naukowe.
5. **Dojrzałość naukowa Doktoranta** - umiejętność krytycznej interpretacji wyników, świadomość ograniczeń oraz wskazanie kierunków dalszych badań.
6. **Potencjał translacyjny** - wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad rolą MOTS-c w patofizjologii cukrzycy i zaburzeń metabolicznych.

Biorąc pod uwagę powyższe argumenty, rozprawa w pełni zasługuje na wyróżnienie.

Wojciech Kucman