



Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Poznań, 7.08.2024

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Agnieszki Kingi Seligi pt.

„Udział kwasu palmitynowego w regulacji wytwarzania czynnika von Willebranda przez ludzkie komórki śródbłonna (HUVEC): rola TLR4 i NF- κ B”

Zespół dr hab. Joanny Bandorowicz-Pikuły z Instytutu Biologii Doświadczalnej w Warszawie zajmuje się wyjaśnianiem molekularnego podłoża funkcjonowania komórek śródbłonna w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych, takich jak insulinooporność czy wysoki poziom cholesterolu i kwasów tłuszczowych. Zrozumienie jak kwas palmitynowy (PA) wpływa na wydzielanie czynnika von Willebranda (vWF) przez komórki śródbłonna jest istotne, ponieważ u osób otyłych stężenie tego czynnika w osoczu jest podwyższone, co może przyczyniać się do rozwoju zaburzeń sercowo-naczyniowych z powodu jego prozakrzepowego działania. Dzięki badaniom nad odpowiedzią prozapalną indukowaną przez PA oraz udziałem czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, a także receptorów Toll-like (TLR2 i TLR4), można lepiej zrozumieć mechanizmy aktywacji odpowiedzi komórek śródbłonna na kwasy tłuszczowe. W pracy scharakteryzowano odpowiedź komórek śródbłonna na PA w warunkach sprzyjających zwiększeniu ilości białek adhezyjnych, bez wpływu na przeżywalność tych komórek. Badano wpływ PA na wytwarzanie i wydzielanie vWF, potencjalne mechanizmy regulujące to wydzielanie oraz udział ścieżki sygnałowej NF- κ B i receptorów TLR w tym procesie. Wyniki tych badań mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów prowadzących do zaburzeń sercowo-naczyniowych u osób otyłych i potencjalnie wskazać nowe cele terapeutyczne.

Formalny opis rozprawy

Praca przedstawiona do recenzji napisana jest ładnym, zwięzłym i jasnym językiem, zawiera, co należy podkreślić, ładną oprawę graficzną. Tekst jest bardzo staranny, bez literówek i błędów stylistycznych. Zastrzeżenia redakcyjne dotyczą: jedynie niejednolitego zapisu pozycji literaturowych (tj. tytułów artykułów pisanych w całości lub w przypadku tylko pierwszego słowa z dużych liter).

Praca, licząca w sumie 132 strony, zawiera 40 rycin oraz 9 tabel. Układ pracy jest typowy i obejmuje: spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski końcowe, oraz liczącą 338 publikacji bibliografię, w większości złożoną z pozycji literaturowych opublikowanych w ostatnich 10 latach. Na końcu rozprawy umieszczono informację o publikacji w *International Journal of Molecular Sciences* (IF ~6) z 2024 r., w której pierwszym autorem jest Doktorantka. W publikacji tej znajduje się większość wyników opisanych w ocenianej pracy doktorskiej. Jestem przekonana, że wyniki badań Doktorantki wzbudzą zainteresowanie w środowisku naukowym.

Merytoryczna ocena rozprawy

Poprzedzający część doświadczalną, liczący 21 strony Wstęp stanowi ciekawie napisany przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego budowy i roli śródbłonna naczyniowego oraz nieprawidłowości w jego funkcjonowaniu związanych z otyłością, w tym

ze zwiększonym poziomem PA. W podrozdziałach dotyczących czynnika vWF szczegółowo omówiono jego modyfikacje potranslacyjne i multimeryzacje, poszczególne domeny i ich funkcje, magazynowanie w ciałkach Weibel-Palade'a, oraz proces wydzielania. Opisano także najważniejsze zagadnienia dotyczące receptorów TLR i czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Lektura tego rozdziału przekonuje o dużej wiedzy Doktorantki i znajomości najważniejszych pozycji literaturowych dotyczących omawianych zagadnień.

Uwagi i pytania do Wstępu:

- Ryciny 1, 6 i 7 powinny zawierać szczegółowe opisy a także wytłumaczenie wszystkich używanych nazw i skrótów. W przypadku niektórych z nich nie ma informacji w całej pracy.
- Nie wspomniano o roli mitochondriów w sygnalizacji komórkowej za pośrednictwem TLR. Czy coś wiadomo na temat udziału mitochondriów komórek śródbłonka w tym procesie?
- O powiązaniu dojrzewania i wydzielania vWF z procesem autofagii wspomniano dopiero w Wynikach i Dyskusji. Krótkie wprowadzenie powinno znaleźć się także we Wstępie bo przecież Autorka badała wpływ PA na autofagię komórek śródbłonka.

Rozdział Materiały i metody (14 stron) zawiera staranne opisy stosowanych metod badawczych. Uwagę zwraca różnorodność stosowanych technik, świadcząca o dużej kompetencji Doktorantki w pracy doświadczalnej. Podczas badań prowadzono: hodowlę pierwotnych komórek śródbłonka HUVEC w różnych warunkach, immunodetekcję białek i test immunoenzymatyczny ELISA, pomiar ekspresji genów metodą RT-qPCR oraz obrazowanie komórek przy użyciu mikroskopii konfokalnej.

Uwagi i pytania do rozdziału Materiały i metody:

- W pracy brakuje informacji o stężeniu albuminy surowicy bydlęcej (BSA) podawanego w kontroli i z PA. Czy neutralizowano roztwór BSA?
- Ocenę przeżywalności odklejonych od podłoża i przemytych komórek śródbłonka dokonano za pomocą cytometrii przepływowej. Nie brano pod uwagę komórek uwolnionych do pożywki. Czy mogło to mieć znaczenie dla otrzymanych wyników?

W rozdziale Wyniki, który obejmuje 37 strony, Autorka szczegółowo opisuje wyniki przeprowadzonych badań zgrupowanych w 3 główne punkty. Wyniki badań są prezentowane w sposób klarowny i logiczny, a zastosowane metody badawcze są odpowiednie i nowoczesne. Każdy punkt otwiera krótkie wprowadzenie i kończy krótkie podsumowanie, porządkujące kolejne etapy badawcze. Ze względu na różne zmiany obserwowane dla badanych parametrów, analiza otrzymanych wyników była czasami trudna, nie zawsze prowadząc do jednoznacznej interpretacji. Trzeba podkreślić, że Doktorantka, zachowując krytycyzm, umiejętnie analizowała otrzymane wyniki.

Doktorantka podjęła się trudnego zadania badania złożonej, wieloetapowej i rozgałęzionej sygnalizacji komórkowej od receptorów TLR do efektu komórkowego czyli wydzielania vWF. Przedstawione wyniki wskazują, że PA nie wpływa na mechanizm wydzielania ciałek Weibel-Palade'a (WPBs), a zwiększone wydzielanie vWF wynika raczej ze zwiększonej ekspresji genu i zwiększonej zawartości dojrzałego białka vWF zmagazynowanego w tych wydzielniczych organellach komórek śródbłonka. Ekspresja genu *VWF* w komórkach traktowanych PA nie jest regulowana czynnikami transkrypcyjnymi ERG i GATA3. Otrzymane wyniki wskazują także, że nasilone dojrzewanie vWF pod wpływem PA nie jest bezpośrednio regulowane przez zwiększenie ilości proteazy furyny. Badanie zmian w poziomie białek markerowych autofagii nie potwierdziło jednoznacznie związku między aktywacją autofagii a – zwiększonym pod wpływem PA – wytwarzaniem i w efekcie wydzielaniem vWF. Nie zauważono zmian w organizacji szkieletu aktynowego komórek śródbłonka traktowanych PA. Nie obserwowano także wpływu PA na lokalizację WPBs w

traktowanych komórkach śródbłonna, a wpływ na ekspresję genów kodujących białka związane z WPBs był ograniczony i niejednoznaczny.

Zwiększone poziomy ekspresji genów *VWF* i *TNF* (cytokiny, czynnika martwicy guza) oraz zwiększone poziomy białek adhezyjnych (ICAM1 i VCAM1) potwierdziły wpływ PA na aktywację ścieżki sygnałowej NF- κ B w komórkach śródbłonna. Badania nie dały jednak jednoznacznej odpowiedzi, która ścieżka sygnałowa, kanoniczna czy alternatywna, jest związana ze zwiększoną przez PA ekspresją genu *VWF*. Obserwowano, że PA wpływa na poziom białek receptorowych TLR2, TLR4 i TLR6. Wykazano, że inhibitor TLR4 istotnie hamuje efekt PA na zwiększoną ilość transkryptu *TNF*. Wyniki te wskazują, że aktywacja ścieżki sygnałowej NF- κ B, prowadząca do zwiększenia wytwarzania vWF pod wpływem PA, jest przynajmniej częściowo związana z aktywacją receptora TLR4.

Ponadto, stosując inhibitory receptorów TLR2 i TLR4 oraz wyciszenie ekspresji ich genów wykazano, że pomiędzy tymi receptorami występuje efekt kompensacyjny, obserwowany na poziomie zarówno aktywności receptorów, jak i mRNA oraz białka.

Oto kilka uwag i spostrzeżeń do przedyskutowania:

- Jedynie sprawdzając wpływ PA na poziom białka vWF w pożywce (Rycina 12) oraz aktywność metaloproteinaz (Rycina 19) badano wpływ samej surowicy BSA wobec kontroli bez BSA. W Dyskusji (strona 87) Autorka wspomina o potencjalnym prozapalnym działaniu BSA czy jej wpływie na aktywację receptora TLR4 i ścieżki sygnałowej NF- κ B. Czy zatem badania nie powinny być prowadzone także w warunkach kontrolnych bez BSA? Tak na przykład, badania przeżywalności komórek śródbłonna w obecności BSA (Rycina 9) wskazują na ~8% udział komórek martwych oraz ~8% udział komórek apoptycznych. Czy te stosunkowo duże wartości nie są spowodowane działaniem samej surowicy?

- Ta sama detekcja aktywny służy jako kontrola detekcji dwóch białek o zbliżonej masie cząsteczkowej (~60 kDa), ATG5 (Rycina 20) i p62 (Rycina 22). Czy stosowano odplukiwanie przeciwciał i ponowną detekcję? Detekcja białka vWF i vWFpp jest złej jakości (Rycina 13). Wysuwanie wniosków o zmianach ilościowych bez kontroli nałożenia białka oraz markerów masy jest niepewne.

- Strona 77. Badając wpływ inhibitorów C29 i TAK-242 na poziom białek receptorów TLR2 i TLR4 (Rycina 34) nie użyto komórek traktowanych PA, ponieważ jak pisze Autorka: „... zwiększenie transkrypcji *TNF* przez C29 jest niezależne od obecności PA... (Rycina 33)”. Nie wzięto jednak pod uwagę wyniku, przedstawionego na Rycinie 33, że zmniejszenie poziomu mRNA *TNF* przez TAK-242 było zależne od obecności PA. Czy powtórzenie tego doświadczenia, porównując komórki traktowane PA i nietraktowane, nie wniosłoby istotnych wskazówek? Tym bardziej, że kolejne doświadczenie (Rycina 35), w którym badano wpływ inhibitorów na ekspresję genów *TRL2*, *TRL4* i genów białek adaptorowych oraz koreceptora CD36, wykazało zmiany istotne statystycznie jedynie w obecności PA w porównaniu z komórkami nietraktowanymi.

Liczący 19 stron i podzielony na 3 punkty rozdział Dyskusja w zasadzie wyczerpuje aspekty wynikające z wyników własnych na tle w pełni wykorzystanych wyników innych badaczy. Lektura tego rozdziału, podobnie jak Wstępu, świadczy o dużej wiedzy Autorki i swobodnym poruszaniu się w literaturze. W rozdziale tym przedyskutowano (i) wpływ PA na komórki śródbłonna i wydzielanie vWF, (ii) aktywację ścieżki sygnałowej NF- κ B w obecności PA za pośrednictwem TLR4 i niepotwierdzonym udziałem TLR2 w tej aktywacji, oraz (iii) zaobserwowany po raz pierwszy kompensacyjny efekt pomiędzy TLR2 i TLR4. Autorka solidnie i krytycznie przedyskutowała otrzymane wyniki, choć ich interpretacja nie zawsze była jednoznaczna. Wykazała się również umiejętnością właściwej interpretacji uzyskanych danych w kontekście istniejącej literatury. Co należy podkreślić, wskazała obszary w których

otrzymane wyniki nie przyniosły jednoznacznych odpowiedzi oraz zaproponowała dalsze badania.

W czasie lektury tej części pracy nasunęły mi się pytania:

- Biorąc pod uwagę złożone, rozgałęzione i wymienne etapy przesyłania sygnałów od receptorów TRL do efektu komórkowego czyli wydzielania vWF oraz na podstawie uzyskanych wyników – czy można wykluczyć udział TRL2 w aktywacji ścieżki sygnałowej NF- κ B w obecności PA?
- Czy uzyskane wyniki dają już jakąś wskazówkę dla opracowania nowych, lub modyfikacji istniejących, strategii terapeutycznych dla osób otyłych z ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych?

Podsumowanie

Wspomniane wcześniej uwagi nie mają wpływu na moją bardzo pozytywną ocenę przedstawionej pracy, jej wartości merytorycznej oraz znaczenia przeprowadzonych badań. Wyniki eksperymentów i analiz przedstawione w rozprawie są istotne dla zrozumienia molekularnych mechanizmów, za pomocą których kwas palmitynowy wpływa na wytwarzanie czynnika von Willebranda przez ludzkie komórki śródbłonna. Autorka opisała rolę receptorów TLR4 oraz szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B w tym procesie, co ma ważne implikacje zarówno dla podstawowych badań nad fizjologią komórek śródbłonna, jak i dla zrozumienia patogenezy chorób układu sercowo-naczyniowego. Należy podkreślić, że większość prezentowanych wyników została już opublikowana.

Biorąc pod uwagę merytoryczną i innowacyjną wartość pracy, znaczenie przeprowadzonych badań, różnorodność doświadczeń i analiz a także umiejętność prezentowania i dyskusowania wyników, uważam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną i dobrą znajomością literatury przedmiotu Autorki a także wskazuje na jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Agnieszki Kingi Seligi do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora i o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz

Kraków, 19.08.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kingi Seliga pt. „Udział kwasu palmitynowego w regulacji wytwarzania czynnika von Willebranda przez ludzkie komórki śródbłónka (HUVEC): rola TLR4 i NF- κ B”

Przedłożona do recenzji praca doktorska porusza niezwykle istotne aspekty dotyczące mechanizmów rozwoju dysfunkcji śródbłónka naczyniowego związane z niekorzystnymi dla zdrowia skutkami zwiększonego stężenia kwasów tłuszczowych we krwi krążącej, które jest skutkiem ich uwalniania z nadmiernej ilości nagromadzonej tkanki tłuszczowej, jak i może wynikać z niewłaściwej diety. W szczególności, Doktorantka zogniskowała swoje doświadczenia na zbadaniu zależności pomiędzy zwiększeniem stężenia kwasu palmitynowego (PA) i zwiększeniem wydzielaniem czynnika von Willebranda (vWF) przez komórki śródbłónka naczyniowego (linia HUVEC), co świadczy o zmianie fenotypu komórek śródbłónka na pro-zakrzepowy. Doktorantka podjęła także próbę zbadania mechanizmów, które są odpowiedzialne za zwiększone uwalnianie vWF w odpowiedzi na zwiększone stężenie PA. Praca doktorska została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Joanny Bandorowicz-Pikuła.

Oceniana praca składa się z następujących głównych części: Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusja, a załączona Bibliografia zawiera 338 pozycji literaturowych. Zarówno Wstęp jak i Dyskusja wskazują, że Doktorantka posiada dobrze ugruntowaną i szeroką wiedzę teoretyczną z zakresu dziedziny, w ramach której prowadziła badania, w stopniu odpowiednim dla osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora. We Wstępie Doktorantka w sposób zrozumiały i zwięzły dokonała przeglądu literatury naukowej w sposób umożliwiający czytającemu późniejsze zrozumienie zarówno celu przeprowadzonych badań, jak i pozwalający na interpretację otrzymanych wyników, oraz śledzenie poszczególnych wątków dyskusji. W występującej we Wstępie Tabeli 1 na str. 15 warto byłoby dodać, że TGF β wykazuje właściwości pro-zakrzepowe, gdyż indukuje ekspresję genu i sekrecję białka PAI1 przez komórki ([https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)00259-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)00259-2)). Ponadto, warto byłoby podać we Wstępie krótkie informacje dotyczące poznanych do tej pory ścieżek sygnałowych regulujących ekspresję czynnika vWF, które Doktorantka później badała (tj. zależne od czynników transkrypcyjnych ERG i GATA3; Rycina 15), oraz informacje dotyczące mechanizmów wydzielania vWF, które mogą być zależne od aktywacji autofagii, a które również były przez Doktorantkę obszernie badane (Ryciny 20, 21, 22, 23).

W części obejmującej swym zakresem Materiały i Metody Doktorantka wyczerpująco, obszernie i zrozumiale przedstawiła wachlarz metod, które zastosowała do realizacji celów naukowych swojej pracy doktorskiej. Obejmują one m. in. metodykę prowadzenia hodowli komórkowej, wyciszenie ekspresji genów z zastosowaniem techniki siRNA, oznaczanie poziomu białek techniką Western blot czy pomiar aktywności metaloproteinaz metodą zymografii.

Część obejmująca Wyniki jest najbardziej obszerna i liczy 37 stron, na których jest zamieszczonych łącznie 32 Ryciny. Doktorantka rozpoczęła tę część rozprawy doktorskiej od przedstawienia wyników na podstawie których zostały wybrane optymalne warunki traktowania komórek śródbłonna PA (Ryciny 8 i 9). Następnie Doktorantka przeszła do przedstawienia wyników wskazujących, że PA nasila ekspresję genu vWF (Rycina 10), a także zwiększa wydzielanie dojrzałej formy vWF z komórek (Ryciny 11 i 12). W kolejnym etapie Doktorantka zaprezentowała wyniki badań dotyczące mechanizmów regulujących wydzielanie vWF pod wpływem PA, które okazało się nie być zależne od czynników transkrypcyjnych ERG i GATA3 (Rycina 15), aktywacji furyny (Ryciny 16, 17, 18, 19), aktywacji autofagii (Ryciny 20, 21, 22, 23), organizacji cytoszkieletu aktynowego i dystrybucji WPBs w komórkach (Rycina 24) i wytwarzania innych niż vWF białek wchodzących w skład WPBs (Rycina 25). Zatem w poszukiwaniu mechanizmu odpowiedzialnego za zwiększone wydzielanie vWF pod wpływem PA Doktorantka zbadała i potwierdziła udział ścieżki sygnałowej zależnej od czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (Ryciny 26, 27, 28, 29). Na koniec, Doktorantka podjęła udaną próbę identyfikacji, który z receptorów TLR jest zaangażowany w aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B przez PA i wykazała że jest to receptor TLR4 (Ryciny 30, 31, 32, 33, 34, 35). Na uznanie zasługuje fakt, że Doktorantce udało się wykazać istnienie efektu kompensacyjnego pomiędzy receptorami TLR2 i TLR4: zahamowanie aktywacji receptora TLR2 prowadziło do zwiększenia aktywacji receptora TLR4 poprzez zwiększenie ekspresji jego genu i poziomu białka przy zastosowaniu techniki wyciszenia ekspresji genów TLR2 i TLR4 z wykorzystaniem odpowiednich siRNA (Ryciny 36, 37, 39). Po dogłębnej analizie wyników, Recenzentka chciałaby uzyskać odpowiedzi na następujące pytania: **(1)** Na str. 49 (Rycina 8) przedstawiono wyniki dotyczące poziomu białek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1: reprezentatywne wyniki Western blot, oraz ich analizę densytometryczną w przypadku inkubacji komórek z PA (100 μ M i 200 μ M) po czasie: 6 godzin, 24 godziny i 48 godzin. Czy w przypadku zdjęcia przedstawiającego sygnał chemiluminescencyjny dla VCAM-1 istotnie była możliwa analiza densytometryczna w większości bardzo słabo widocznych na zdjęciu prążków pozwalająca na wiarygodne wyznaczenie różnic, które oznaczone są jako statystycznie istotne na wykresie VCAM-1; 200 μ M PA w punktach czasowych 6 godzin i 24 godziny i na wykresie VCAM-1; 100 μ M PA w punkcie czasowym 6 godzin? **(2)** Jeśli chodzi o Rycinę 11, str. 52, wykres vWFpp, Recenzentka chciałaby zapytać czym podyktowana jest różna ilość powtórzeń doświadczenia dla dawki 200 μ M PA (n=6) w

porównaniu do dawki 100 μM PA ($n=3$)? Czy może być tak, że to dwukrotnie większa ilość powtórzeń dla dawki 200 μM ($n=6$) zdecydowała o wystąpieniu istotności statystycznej, a mniejsza ilość powtórzeń ($n=3$) spowodowała brak istotności statystycznej dla dawki 100 μM mimo wyraźnie widocznej tendencji? (3) Na str. 53 (Rycina 12) przedstawiono wpływ PA na stężenie vWF wydzielonego z komórek śródbłonna. Czy próbki z grup: podstawowe i 1 μM histamina oraz DMSO i 10 μM forskolina były zbierane z tych samych doświadczeń i mierzone równocześnie? Jeśli tak, interesujące byłoby także np. porównanie wpływu samego PA w danej dawce i PA w tej dawce po aktywacji komórek histaminą lub forskoliną (np. 200 μM PA vs 200 μM PA + histamina). (4) Na str. 54 (Rycina 13) przedstawiono reprezentatywne zdjęcie poziomu dojrzałej formy vWF jak i formy vWFpp. Doktorantka pisze że „... po inkubacji w obecności PA, jak i po dodatkowej stymulacji komórek histaminą zwiększona jest jedynie ilość vWFpp...”. Warto byłoby zamieścić tutaj także dane ilościowe (wykres). (5) Do Ryciny 19 na str. 60 także warto byłoby dołączyć wykres. (6) Na str. 74 Doktorantka pisze: „ Peptydoglikan powoduje zwiększenie ekspresji genu *TNF* zarówno w komórkach kontrolnych inkubowanych z BSA, jak i inkubowanych z PA (Rycina 31)”. Nie ma zaznaczonych na wykresie odpowiadających temu stwierdzeniu istotności statystycznych.

Dyskusja otrzymanych wyników została podzielona na trzy części. W pierwszej części Doktorantka dokonała interpretacji uzyskanych przez siebie wyników dotyczących wpływu PA na komórki śródbłonna i wydzielanie vWF w oparciu o dostępną literaturę naukową w kontekście wyników uzyskanych przez innych badaczy w innych modelach badawczych np. cukrzyca typu II. W tej części Doktorantka podkreśliła, że jako pierwsza, w sposób kompleksowy i w tych samych warunkach doświadczalnych, wykazała że PA zwiększa wydzielanie vWF z komórek śródbłonna poprzez zwiększenie transkrypcji genu VWF, czego skutkiem jest zwiększenie ilości dojrzewającego vWF i jego zwiększone wydzielanie przez komórki. Zatem w warunkach zwiększenia stężenia PA dochodzi do powstania środowiska sprzyjającego tworzeniu zakrzepów, co, w połączeniu z wyższym poziomem molekuł adhezyjnych w komórkach śródbłonna, doskonale odzwierciedla mechanizmy rozwoju stanu zapalnego i aktywacji śródbłonna naczyniowego, połączone ze zwiększonym ryzykiem powstania zakrzepów, które są obserwowane *in vivo*. Na uwagę zasługuje także wpływ PA na autofagię w tak zmienionych zapalnie (wyższy poziom ICAM-1, VCAM-1, więcej wydzielanego vWF) komórkach śródbłonna. Paradoksalnie, białka będące markerami aktywacji autofagii wskazują na mniejszą aktywację autofagii dla PA w dawce 200 μM w porównaniu z wpływem PA w dawce 100 μM . Biorąc pod uwagę fakt, że aktywacja autofagii jest mechanizmem obronnym komórek w warunkach stanu zapalnego (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3425450/>), dawkozależne zahamowanie aktywacji autofagii w odpowiedzi na PA (200 μM w porównaniu do 100 μM PA, Rycina 22 i 23) potwierdza uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazujące że PA w stężeniu 200 μM bardziej indukuje stan zapalny śródbłonna naczyniowego (zwiększenie poziomu VCAM-1 i ICAM-1, Rycina 8) i

jego fenotyp prozakrzepowy (zwiększone wydzielanie vWF, Rycina 12) w porównaniu z PA w stężeniu 100 μ M.

W drugiej części Dyskusji Doktorantka, w oparciu o dane literaturowe, omówiła mechanizmy indukcji ekspresji genu *VWF* i zwiększonego wydzielania vWF w odpowiedzi na PA zależne od czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, oraz wiodącą rolę receptora TLR4 w tym procesie. Na podkreślenie zasługuje fakt, że jedynie 200 μ M PA prowadził do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B poprzez tzw. ścieżkę kanoniczną. Jednocześnie właśnie to stężenie PA indukowało wyższy poziom molekuł adhezyjnych VCAM-1 i ICAM-1, nasilało ekspresję, dojrzewanie i wydzielanie vWF i hamowało autofagię, co można interpretować jako zahamowanie istotnego mechanizmu obronnego komórek śródbłonna. Natomiast przypuszczalna aktywacja NF- κ B przez ścieżkę alternatywną mogła być, zdaniem Doktorantki, odpowiedzialna na za zwiększenie ekspresji genu *VWF* przez 100 μ M PA (Rycina 10), co jednak nie prowadziło do istotnego zwiększenia wydzielania vWF z komórek (Rycina 12), a fenotyp prozapalny komórek śródbłonna miał jedynie charakter przejściowy (poziom VCAM-1 był wyższy tylko po 6 godzinach, Rycina 8).

Jeśli chodzi o trzecią część Dyskusji, na podkreślenie zasługuje trafna interpretacja wyników przez Doktorantkę, że w warunkach zahamowania aktywności TLR2 dochodzi do kompensacyjnej aktywacji TLR4, niezależnie od aktywacji TLR4 przez PA: obniżenie zawartości białka receptora TLR2 skutkuje zwiększeniem zawartości białka receptora TLR4, a wyciszenie ekspresji TLR4 jest związane ze wzrostem zawartości białka TLR2. Zdaniem Doktorantki, ten efekt kompensacyjny może być m.in. związany ze zmianami w stabilności ekspresji genów poprzez stabilizację mRNA.

Podsumowując, Pani Magister Agnieszka Kinga Seliga w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej wykazała, że PA zwiększa wydzielanie vWF poprzez zwiększenie ekspresji genu *VWF* i przyspieszenie dojrzewania vWF w sposób zależny od aktywacji ścieżki sygnałowej zależnej od NF- κ B i aktywacji receptora TLR4, a pomiędzy receptorami TLR4 i TLR2 występuje zjawisko kompensacji. Najważniejsze wyniki zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej są przedstawione schematycznie na Rycinie 40. Wyniki zawarte w pracy doktorskiej zostały opublikowane w pracy eksperymentalnej: "*Palmitate Stimulates Expression of the von Willebrand Factor and Modulates Toll-like Receptors Level and Activity in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)*" w czasopiśmie: *International Journal of Molecular Sciences* (140 punktów ministerialnych, IF= 4,9; Q2 (wg. bazy Web of Science)). Na podstawie przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej, która wnosi znaczący wkład w poznanie mechanizmów rozwoju dysfunkcji śródbłonna naczyniowego indukowanej zwiększonym stężeniem PA uważam, że Pani Magister Agnieszka Kinga Seliga wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, analizowania literatury naukowej pod kątem prowadzonych badań, planowania i wykonywania doświadczeń, oraz wyciągania odpowiednich wniosków.

Znaczącej wartości naukowej przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej nie umniejszają drobne błędy językowe (np. str. 3: „Abstract” zamiast „Abstrakt”) czy skróty myślowe (np. „płytki (...) wydzielają ziarnistości zawierające różne czynniki prozakrzepowe” zamiast „płytki (...) wydzielają zawartość ziarnistości zawierających różne czynniki prozakrzepowe”), brak wyjaśnienia niektórych zastosowanych w rozprawie doktorskiej skrótów (np. ATG czy ERG), czy pomyłki edytorskie (tj. nieprawidłowo podany nr ryciny na str. 97: Rycina 32 nie przedstawia hamującego wpływu kardamoniny na indukowaną PA zwiększoną ekspresję genu VWF; chodzi zapewne o Rycinę 28).

Zatem uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Agnieszki Kingi Seliga **do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora**”.

dr hab. Marta Smęda

Marta Smęda



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY



ZAKŁAD BIOCHEMII I ŻYWIENIA

Warszawa, 06 września 2024 r.

Prof. dr hab. Katarzyna Koziak
Zakład Biochemii i Żywienia
Wydział Nauk o Zdrowiu
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzja rozprawy doktorskiej

„Udział kwasu palmitynowego w regulacji wytwarzania czynnika von Willebranda przez ludzkie komórki śródbłonna (HUVEC): rola TLR4 i NF- κ B”

autorstwa mgr Agnieszki Seligi

Praca doktorska pani mgr Agnieszki Seligi wykonana została w Pracowni Metabolizmu Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem dr hab. Joanny Bandorowicz-Pikuły, prof. Instytutu Nenckiego.

Nadmierna masa ciała oraz związane z nią zaburzenia należą do ważnych aktualnych problemów medycznych, ekonomicznych, społecznych i psychologicznych. Mimo podejmowanych od lat prób prowadzenia powszechnej edukacji prozdrowotnej i żywieniowej dotyczącej negatywnych dla zdrowia konsekwencji nadmiernej masy ciała, zapadalność na otyłość i choroby z nią związane jest coraz większa. Nie dziwi zatem determinacja naukowców w dążeniu do poznania mechanizmów wiążących otyłość z jej powikłaniami, a zwłaszcza z zaburzeniami funkcji układu naczyniowego i hemostazy. Tylko w ciągu ostatnich trzech lat ukazało się prawie 800 publikacji na ten temat i należy się spodziewać, że nie straci on na popularności mimo rewolucji w leczeniu otyłości, za jaką należy uznać wprowadzenie na rynek analogów glukagonopodobnego peptydu-1 (GLP-1) i polipeptydu insulinotropowego

ul. Banacha 1 B
02-091 Warszawa
www.wum.edu.pl

katarzyna.koziak@wum.edu.pl

zależnego od glukozy (GIP). Korzyści kliniczne związane z ich stosowaniem wykraczają poza regulację gospodarki węglowodanowej i prawdopodobnie mają związek m. in. z obecnością receptorów dla obu tych peptydów w komórkach śródbłonka.

Podjęte przez Doktorantkę prace wykonane zostały w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS12, 2016/23/B/NZ3/0311 „Aneksyny jako znaczniki nieprawidłowego funkcjonowania śródbłonka naczyniowego w warunkach insulinooporności indukowanej *in vitro*”) i doskonale wpisują się one w nurt badań nad znaczeniem otyłości dla rozwoju zaburzeń hemostazy i ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska to bardzo obszerna, 130-stronicowa monografia napisana w języku polskim i podzielona na typowe dla tego typu dysertacji rozdziały. Są to: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Założenia i cele pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Bibliografia oraz Lista publikacji Autorki. Cała rozprawa jest bogato ilustrowana: kilkadziesiąt rycin i oraz zawarte w pracy tabele bardzo ułatwiają podążanie za tokiem rozumowania Doktorantki. Rozprawa została przygotowana bardzo starannie i napisana poprawnym językiem polskim.

W dobrze przygotowanym, teoretycznym wstępie do rozprawy, Doktorantka zawarła siedem podrozdziałów stanowiących pogłębione wprowadzenie do tematyki pracy. Opisała w nich współczesne poglądy dotyczące nieprawidłowości w funkcjonowaniu śródbłonka związane z otyłością, rolę czynnika von Willebranda w utrzymaniu hemostazy, a także patofizjologiczną rolę kwasu palmitynowego w rozwoju chorób metabolicznych i chorób układu sercowo-naczyniowego. Ponadto, we Wstępie przedstawiona została zwięzła charakterystyka receptorów Toll-like (TLR) i czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Wstęp do rozprawy przygotowany został w sposób umożliwiający zrozumienie genezy i celu pracy. Doktorantka zwróciła uwagę na brak danych literaturowych, które pozwoliłyby wyjaśnić, dlaczego u osób z otyłością stwierdza się podwyższone stężenia czynnika von Willebranda. Do uzyskania odpowiedzi na to pytanie miały doprowadzić zaplanowane przez nią eksperymenty. Ich celem było scharakteryzowanie wpływu kwasu palmitynowego na wytwarzanie i wydzielanie czynnika von Willebranda przez komórki śródbłonka i określenie mechanizmu obserwowanych zjawisk, w tym zbadanie ścieżki sygnałowej NF- κ B oraz wybranych receptorów TLR w komórkach HUVEC.

Rozdział Materiały i Metody zawiera szczegółowy opis metodyki badań komórkowych i przeprowadzonych pomiarów. Przyjęta przez Doktorantkę metodologia badawcza jest opisana w

sposób jasny i pozwalający na zrozumienie dokonanego wyboru technik. Na podkreślenie zasługuje szeroki wachlarz metod badawczych świadczący o doskonałych umiejętnościach laboratoryjnych pani mgr Agnieszki Seligi. Wyciszenie genów metodą transfekcji siRNA, zymografia, badanie ekspresji genów i analiza zawartości białek metodą Western blot i immunocytochemiczną to tylko niektóre z technik wykorzystane przez Doktorantkę dla osiągnięcia założonych celów.

Kluczowym elementem rozprawy są wyniki, które są imponujące. Krytyczne omówienie tej części pracy ułatwia ich opublikowanie w artykule, który w grudniu 2023 r. ukazał się w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (IF 4,9): „Palmitate Stimulates Expression of the von Willebrand Factor and Modulates Toll-like Receptors Level and Activity in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)” (Seliga AK, Zabłocki K, Bandorowicz-Pikuła J). Modelem eksperymentalnym wykorzystanym w pracy są ludzkie komórki śródbłonna izolowane żyły pępowinowej (HUVEC) poddane działaniu kwasu palmitynowego w stężeniu, które nie wpływa na przeżywalność komórek, natomiast powoduje zwiększenie ilości białek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1. Doktorantka wykazała, że ekspozycja komórek na działanie kwasu palmitynowego powoduje zwiększenie ekspresji genu *VWF*, wzrost ilości białka, nasilenie jego dojrzewania i wydzielania. W kolejnych eksperymentach, których celem było wskazanie mechanizmu leżącego u podstawy odkrytego zjawiska, Autorka wykazała, że obserwowane zwiększenie ekspresji genu *VWF* nie korelowało ani z ekspresją czynników transkrypcyjnych ERG i GATA3, o których wiadomo, że mogą być zaangażowane w ten proces, ani z ekspresją genu i zawartością w komórce furyny - enzymu uczestniczącego w procesie dojrzewania czynnika von Willebranda. Nie stwierdziła też jednoznacznie wpływu kwasu palmitynowego na autofagię, która związana jest z dojrzewaniem i wydzielaniem czynnika von Willebranda i nie wykazała zmian architektury cytoszkieletu, które mogłyby wpływać na przemieszczanie się i wydzielanie ciałek Weibel-Palade'a, w których magazynowany jest czynnika von Willebranda. Natomiast uzyskane przez panią mgr Agnieszkę Seligę wyniki potwierdziły obserwacje z innych modeli komórkowych, zgodnie z którymi kwas palmitynowy może aktywować ścieżkę sygnałową NF-κB i prowadzić do zmian w ilości związanych z tą ścieżką receptorów TLR. Doktorantka jako pierwsza ujawniła istnienie zjawiska kompensacji pomiędzy TLR2 a TLR4 i choć wyjaśnienie jego podstaw biochemicznych wymaga dalszych badań, to już teraz można przypuszczać, że może to prowadzić do zaburzenia odpowiedzi zapalnej.

Wszystkie uzyskane wyniki zostały poddane dogłębnej i dojrzałej dyskusji. Jej lektura wskazuje na dobrą znajomość zagadnień związanych z tematyką pracy i zdolność do krytycznej analizy własnych obserwacji w oparciu o dane literaturowe.

Podsumowanie i wnioski końcowe to sekcja rozprawy, w której Autorka przedstawiła prawdopodobny mechanizm, w jakim kwas palmitynowy już w stężeniu tylko nieznacznie przewyższającym wartości normalne, zwiększa wytwarzanie i wydzielanie czynnika von Willebranda przez komórki HUVEC.

Ostatnim rozdziałem rozprawy doktorskiej jest obfita, zawierająca 338 pozycji bibliografia.

W trakcie lektury rozprawy nasunęło mi się kilka pytań i uwag do Autorki. 1) Czy w hodowlach komórkowych wykorzystywane były komórki pochodzące od jednego dawcy czy komórki spulowane od kilku dawców? W literaturze opisywany jest wpływ płci na odpowiedź komórek HUVEC, m. in. autofagię czy wrażliwość na czynniki apoptotyczne. Czy ten aspekt brany był pod uwagę podczas analizy wyników? 2) W zeszłym roku ukazała się metaanaliza ujawniająca korzystny wpływ utraty masy ciała na poziom biomarkerów funkcji śródbłonka, w tym E-ICAM-1 i VCAM-1 czyli białek adhezyjnych, których ilość zwiększa się pod wpływem kwasu palmitynowego. Nie wykazano jednak znaczącego wpływu redukcji masy ciała na poziom czynnika von Willebranda. Jak można byłoby wyjaśnić tę obserwację? ("Effects of dietary-based weight loss interventions on biomarkers of endothelial function: a systematic review and meta-analysis" European Journal of Clinical Nutrition; 77, 10, 927, Oct 2023). 3) Statyny należą do grupy leków często stosowanych u chorych z otyłością. Wiadomo, że plejotropowe działanie statyn obejmuje także hamowanie ekspresji receptora TRL4 i spadek poziomu czynnika von Willebranda. Jak można się odnieść do tych danych mając na uwadze wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej?

Podsumowując, rozprawa doktorska pani mgr Agnieszki Seligi jest bardzo dobrym opracowaniem oryginalnego problemu badawczego. Dbałość o wnikliwą i rzetelną prezentację, interpretację i dyskusję wyników badania, a także umiejętność pisania tekstów naukowych. Dzięki dociekliwości badawczej Doktorantki, jej przygotowaniu warsztatowemu pozwalającemu na zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentów z właściwie dobraną metodyką, udało jej się wypełnić lukę w badaniach dotyczących mechanizmów wiążących dysfunkcje komórek śródbłonka ze zwiększonym stężeniem kwasów tłuszczowych stwierdzanym w przebiegu otyłości.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie pani mgr Agnieszki Seligi do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoki poziom merytoryczny przedstawionej rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.