



Ocena
Rozprawy Doktorskiej
mgr Marcina Wołosiewicza
pt.: „Rola desaturazy stearoilo-CoA 4 w regulacji metabolizmu i funkcji mięśnia
sercowego myszy”
wykonanej pod opieką prof. dr hab. Pawła Dobrzynia
w Pracowni Molekularnej Biochemii Medycznej Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN, w Warszawie

Faculty of Biochemistry,
 Biophysics and Biotechnology
 Jagiellonian University
 Department of General
 Biochemistry
 Professor Jolanta Jura

Otyłość to stan, w którym nadmiar tkanki tłuszczowej w organizmie osiąga poziom, który może negatywnie wpływać na zdrowie. Taki stan zwiększa ryzyko wielu chorób, takich jak cukrzyca typu 2, choroby serca, nadciśnienie, a także problemy z układem kostnym. Współczesny styl życia, w tym niewłaściwa dieta i brak aktywności fizycznej, sprzyja rozwojowi tego schorzenia. Leczenie otyłości wymaga zmiany nawyków żywieniowych, regularnej aktywności fizycznej oraz, w niektórych przypadkach, interwencji medycznych. Problem otyłości jest obecnie coraz poważniejszym wyzwaniem dla służby zdrowia, ponieważ dotyczy coraz większej grupy społeczeństwa. Dlatego tematyka badawcza podjęta w ramach przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej dotyczy bardzo ważnego pod względem społecznym zagadnienia.

Doktorant postawił sobie za cel zbadać wpływ wyciszenia ekspresji *Scd4* na strukturę, funkcję i metabolizm serca w stanie fizjologicznym oraz w otyłości. Żeby ten cel osiągnąć Doktorant podjął się realizacji 4 zadań:

1. Określenie roli SCD4 w regulacji ogólnoustrojowego metabolizmu myszy;
2. Zbadanie wpływu wyciszenia *Scd4* na funkcję i strukturę serca w warunkach fizjologicznych i w otyłości;
3. Identyfikacja szlaków metabolicznych, przez które SCD4 reguluje metabolizm lipidów w sercu, ze szczególnym uwzględnieniem lipogenezy, lipolizy i β -oksydacji;
4. Określenie wpływu ekspresji *Scd4* na strukturę i aktywność mitochondriów w kardiomiocytach.

W badaniach wykorzystano myszy C57BL/6 z zahamowaną ekspresją genu *Scd4* w całym organizmie (*Scd4*^{-/-}) w wyniku usunięcia trzeciego egzonu genu *Scd4* metodą *Cre-LoxP* przez grupę Gan i wsp., opisaną w 2022 roku. Natomiast grupę kontrolną stanowiły myszy typu dzikiego. Badania wykonywano na samcach w momencie osiągnięcia wieku piętnastu tygodni. W celu wywołania otyłości stosowano paszę bogatą w tłuszcze (HFD – 60 % kalorii z tłuszczu) przez 8 tygodni.

Jak wykazały przeprowadzone przez Doktoranta badania, wyłączenie genu kodującego SCD4 u myszy wywarło pozytywny efekt ogólnoustrojowy u myszy poddanych karmieniu paszą wysokotłuszczową. Już w wieku 15 tygodni, w dniu rozpoczęcia eksperymentu myszy *Scd4*^{-/-} miały mniejszą masę ciała niż myszy WT, natomiast zastosowanie diety wysokotłuszczowej (HFD) zwiększyło ich masę tylko o 26 % w stosunku do masy wyjściowej, a w przypadku myszy typu dzikiego na tej samej diecie masa zwiększyła się o 44%. Ponadto, zaobserwowano również znacznie niższą masę trzewnej tkanki tłuszczowej u myszy z grupy *Scd4*^{-/-} HFD w porównaniu do myszy z grupy WT HFD. U tych myszy zaobserwowano również hiperinsulinemię i

Address:
 Gronostajowa 7
 30-387 Krakow
 tel. +48(12) 664 63 59
 fax +48(12) 664 69 02
 email: jolanta.jura@uj.edu.pl

hipercholesterolemię oraz zwiększenie wrażliwości na insulinę. Z kolei analizy echokardiograficzne wykazały nieznaczne zmiany przebudowy lewej komory serca.

Badania prowadzone na komórkach HL-1 z wyciszoną ekspresją genu *Scd4* (*siSCD4*) traktowanych kwasem stearynowym (18:0) wykazały zmniejszoną akumulację kropli lipidowych i triacylogliceroli w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Z kolei nie zaobserwowano odwrotnego wyniku, tj. zwiększenia akumulacji lipidów w warunkach zwiększonej ekspresji genu *Scd4*. Doktorant wyjaśnił, że zwiększona ekspresja *Scd4* była niefunkcjonalna, chociaż szkoda, że wyjaśnił, co dokładnie miał na myśli pisząc o niefunkcjonalnej ekspresji.

Analizę aktywności szlaków metabolicznych lipidów przeprowadzono korzystając z gotowego zestawu nCounter (NanoString Technologies), umożliwiającego analizę 748 genów zaangażowanych w 36 szlaków i procesów metabolicznych (Mouse Metabolic Pathways Panel). W grupie myszy karmionych dietą wysokotłuszczową zmieniona została ekspresja 118 genów w sercu myszy WT oraz 129 genów w sercu myszy *Scd4*^{-/-} w porównaniu do myszy kontrolnych (dieta standardowa). Zidentyfikowane transkrypty kodują białka zaangażowane m.in. w szlaki metaboliczne związane z kardiomiopatią cukrzycową, szlakiem AMPK, ROS i insulinoopornością. Jaka dokładnie była brana pod uwagę krotkość zmian w badanych grupach? Czy wyniki były poddane walidacji przez RT-PCR?

Doktorant zbadał wpływ wyciszenia ekspresji genu *Scd4* na gospodarkę glukozową poprzez analizę poziomu fosforylacji białek zaangażowanych w metabolizm glukozy. Doktorant w podsumowaniu zaznaczył, że metabolizm glukozy w sercu myszy WT i *Scd4*^{-/-} na diecie wysokotłuszczowej był zahamowany. Ale czy rzeczywiście zahamowany, czy obniżony? Ponadto, jak sam Autor dysertacji zaznaczył: „GLUT4 odgrywa kluczową rolę w zachowaniu funkcji serca w warunkach stresowych, jak np. niedokrwienie, natomiast w warunkach standardowych transport glukozy przeprowadza głównie GLUT1”. W związku z powyższym zachodzi pytanie, dlaczego w testach na myszach nie sprawdzono poziomu GLUT1?

Myszy pozbawione SCD4 na diecie wysokotłuszczowej miały znacząco wyższy poziom czynnika transkrypcyjnego regulującego ekspresję genów lipogenezy – SREBP1c, oraz białek FAS i GPAT1. Jednocześnie te myszy wykazują wyższą aktywność lipazy ATGL w wyniku zwiększonej zawartości białek aktywujących ten enzym (ABHD5, PKA), co świadczy o wzmożonej lipolizie. Dodatkowo wykazano wzmożoną β -oksydację kwasów tłuszczowych, co wyjaśnia, w jaki sposób wyciszenie *Scd4* zmniejsza indukowany przez dietę wysokotłuszczową wzrost kropli lipidowych w kardiomiocytach. Badając zawartość transporterów kwasów tłuszczowych Doktorant wykazał, że z 3 badanych mRNA tylko poziom transkryptu *Fabp5*, kodującego białko wiążące kwasy tłuszczowe w cytozolu i zmniejszające ich toksyczność był nieznacznie podwyższony w sercu myszy *Scd4*^{-/-}.

Ponieważ w gospodarce energetycznej serca mitochondria pełnią kluczową rolę Doktorant sprawdził jak wyłączenie *Scd4* wpływa na morfologię mitochondriów, ich degradację oraz produkcję ROS. Jak wykazano, w kardiomiocytach z wyciszoną ekspresją *Scd4* w warunkach przeciążenia lipidami przerost mitochondriów i nadprodukcja ROS indukowane przez akumulację i toksyczne działanie lipidów są zahamowane. Jest to skorelowane z wzmożonym procesem kontroli jakości mitochondriów (mitofagii) i spadkiem aktywności dehydrogenazy NADH, a w konsekwencji niższym poziomem ROS. Ponadto, Doktorant pokazał, że dochodzi do aktywacji białek zaangażowanych w regulację homeostazy wapnia w sercu myszy z wyłączonym genem *Scd4* na diecie wysokotłuszczowej, co z kolei ma wpływ na regulację szlaków lipolizy, lipogenezy, β -oksydacji kwasów tłuszczowych oraz strukturę i aktywność mitochondriów.

Opis wyników jest bardzo szczegółowy, co zasługuje na podkreślenie, jednak Doktorant zbyt dużo uwagi poświęcał porównaniu wyników uzyskanych na myszach *Scd4^{-/-}* na diecie wysokotłuszczowej z myszami typu dzikiego na diecie standardowej. W ten sposób przedstawione wyniki zacierają rzeczywisty obraz, mający na celu położenie nacisku na pozytywną rolę SCD4 na regulację metabolizmu mięśnia sercowego w stanie otyłości. Brakuje mi w podsumowaniach poszczególnych etapów mocniejszego podkreślenia, że myszy z grupy *Scd4^{-/-}* na diecie wysokotłuszczowej mają znacznie lepsze parametry niż myszy typu dzikiego na tej samej diecie. Niemniej jednak użycie do badań 4 -ch grup myszy, a następnie szczegółowa analiza wyników jest bardzo istotna, ale też czasami trudna do opisu.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że badania szlaków metabolicznych wykonano na dużej grupie zwierząt – ok. 10 na grupę. Natomiast barwienia wykonano już tylko dla 3 zwierząt na grupę.

Rozdział *Dyskusja* jest napisana w sposób bardzo dojrzały z uwzględnieniem danych literaturowych, porównujących wyniki Doktoranta z już dostępnymi wynikami na temat roli SCD4 w procesach fizjologicznych i patologicznych. Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością literatury oraz bardzo w sposób przemyślany zinterpretował uzyskany wyniki.

Poza uwagami zawartymi w ocenie wyników mam jeszcze kilka drobnych uwag o komentarzy:

1. W j. polskim nie stosuje się określenia kilozasad do przedstawienia długości genu/transkryptu. Jednostką stosowaną są tysiące (par) zasad.
2. Ponieważ zgodnie z przyjętą nomenklaturą skrót genu u myszy oznacza się pierwszą dużą literą i pozostałymi małymi literami to myszy z wyłączonym genem *Scd4* (knock-out) powinny być oznaczone jako *Scd4^{-/-}*, a nie *SCD4^{-/-}*.
3. Przy opisie traktowania komórek HL-1 kwasem stearynowym (18:0) na stronie 43 i nie tylko, zastosowano skrót myślowy: „W celu zbadania żywotności komórek HL-1 w obecności 18:0, przeprowadzono eksperyment...).
4. Ryc 9 przedstawia poziom wyciszenia genu *Scd4* w komórkach HL-1 po wyciszeniu jego ekspresji przy użyciu transfekcji siRNA. Badanie wykonano stosując RT-PCR. Nie pokazano, czy wyciszenie prowadzi do obniżenia poziomu białka, tak, jak w przypadku sprawdzenia nadekspresji (Ryc.10).
5. Celem ekspresji genu *Scd4* przygotowano konstrukc genetyczny z insertem cDNA tego genu. Brakuje informacji, czy sekwencja otrzymanego konstrukt była sprawdzona przez sekwencjonowanie, tym bardziej, że egzogenna ekspresja *Scd4* nie wywoływała efektów fenotypowych/biochemicznych odwrotnych do tych obserwowanych po wyciszeniu genu kodującego SCD4.
6. W pracy zastosowano całą gamę metod molekularnych i biochemicznych, co wzbudza uznanie, jednak, nie jest jasne, czy wszystkie metody, w tym analiza kwasów tłuszczowych z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) były wykonywane przez Doktoranta?
7. Strona graficzna jest bardzo ładna ale mimo wszystko zasługuje na minimalne poprawki. Mam na myśli wolne przestrzenie na niektórych stronach, które wymagałyby reorganizacji tekstu i rycin. Przykładem może być str. 77 i 78.

Powyższe uwagi nie podważają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej mgr Marcina Wołosiewicza.

Doktorant posiada solidną wiedzę teoretyczną na temat przedmiotowych zagadnień, która stanowiła fundament do realizacji pracy doktorskiej. Jego znajomość literatury pozwala na właściwą interpretację i analizę badanych kwestii.

Ponadto, Doktorant potrafi łączyć zdobytą wiedzę teoretyczną z praktycznymi metodami badawczymi, co umożliwi mu przeprowadzenie rzetelnych i innowacyjnych badań. Doktorant opanował szereg metod i analiz biochemicznych i molekularnych zarówno na modelu *in vitro*, jak i znacznie bardziej wymagającym modelu *in vivo*. Informacje zawarte wskazują, że Doktorant oprócz doskonałej znajomości technik jest dojrzałym naukowcem, wykazującym się dużą samodzielnością.

Przedstawiona **praca doktorska w mojej ocenie jest oryginalna** i wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat roli desaturazy stearoilo-CoA 4 w funkcjonowaniu mięśnia sercowego. Badania przedstawione w pracy dostarczają nowych informacji na temat wpływu tej desaturazy na mechanizmy fizjologiczne, jak i patologiczne, szczególnie w kontekście otyłości. Ponadto, uzyskane wyniki mają charakter nie tylko charakter poznawczy, ale również potencjał aplikacyjny. Dalsze badania są niezbędne, żeby rozważyć białko SCD4 jako potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu schorzeń związanych z otyłością.

Recenzowana rozprawa doktorska **mgr Marcina Wołosiewicza spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dn. 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 Marcina Wołosiewicza do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora**



Dr hab. Marek Skrzypski

Poznań, 09.02.2025

Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ul. Wołyńska 35,

60-637 Poznań

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Marcina Wołosiewicza pt. *Rola desaturazy stearoilo-CoA 4 w regulacji metabolizmu i funkcji mięśnia sercowego myszy*

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została zrealizowana pod opieką Pana prof. dr. hab. Pawła Dobrzynia w Pracowni Molekularnej Biochemii Medycznej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie. Badania sfinansowano w ramach projektu Sonata Bis 6 (NCN).

Otyłość jest jednym z najistotniejszych problemów zdrowotnych dotyczących współczesne społeczeństwa, w szczególności w krajach wysokorozwiniętych i rozwijających się. Zgodnie z raportami WHO jej występowanie w ostatnich latach znacznie wzrosło, a tendencja ta najprawdopodobniej będzie się utrzymywać z zachowaniem trendu wzrostowego. Występowanie otyłości związane jest z obecnością licznych zaburzeń metabolicznych, zwiększonym występowaniem cukrzycy typu 2 oraz schorzeń układu sercowo-naczyniowego. Podłoże wspomnianych nieprawidłowości stanowią w istotnej mierze zaburzenia metabolizmu lipidowego. Dlatego też dokładna charakterystyka białek zaangażowanych w regulację przemian metabolicznych lipidów jest bardzo istotnym i aktualnie intensywnie analizowanym problemem badawczym. Tematyka naukowa rozprawy doktorskiej mgr. Marcina Wołosiewicza wpisuje się we wspomniany i aktualny nurt badawczy a jej najważniejszym celem naukowym była charakterystyka roli desaturazy stearoilo-CoA 4 (SCD4) w regulacji metabolizmu ze szczególnym naciskiem na rolę tego enzymu w mięśniu sercowym.

Ocena formalna i edytorska pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy ponad 130 stron i zawiera wszystkie niezbędne elementy pracy doktorskiej z zachowaniem klasycznego dla tego typu rozpraw układu rozdziałów, które stanowią przemyślaną i spójną całość. Wszystkie ryciny i tabele są czytelne i wyczerpująco opisane. Warto zauważyć, że praca została również przygotowana bardzo starannie pod względem stylistycznym i edytorskim. Podsumowując, wszystkie wymogi formalne jakie stawiane są rozprawie doktorskiej zostały tutaj zachowane.

Ocena merytoryczna

Rozprawę doktorską otwiera rozdział *Wstęp*, który w mojej ocenie jest wyczerpujący i świadczy o dużej wiedzy teoretycznej mgr. Wołosiewicza. Rozdział ten, jak i cała praca doktorska, zawiera odniesienia do najnowszych jak i klasycznych pozycji literaturowych. Mgr Wołosiewicz w sposób klarowny wprowadza czytelnika do omawianych zagadnień skupiając się na dokładnej charakterystyce metabolizmu lipidów oraz glukozy w sercu, ze szczególnym naciskiem na dotychczasowy stan wiedzy na temat roli desaturaz kwasów tłuszczowych w mięśniu sercowym. Uważam, że rozdział ten może stanowić nie tylko cenne źródło dydaktyczne, ale również podstawę do artykułu przeglądowego. Kolejny rozdział rozprawy stanowi opis metodyki oraz zastosowanych materiałów. W przeważającej części jest on wyczerpujący i zawiera wszystkie najistotniejsze informacje, pozwalające na odtworzenie eksperymentów. W tym miejscu warto podkreślić, że warsztat badawczy mgr. Wołosiewicza jest bardzo bogaty i obejmuje on doświadczenia *in vitro* oraz *in vivo* z wykorzystaniem najnowszych narzędzi biologii molekularnej. Co więcej, prowadząc badania Doktorant niejednokrotnie współpracował z badaczami spoza jednostki macierzystej, np. w doświadczeniach nad echokardiograficznym obrazowaniem serca czy podczas obrazowania mikroskopowego. Kolejnym i bardzo istotnym elementem pracy jest opis wyników. Opis stanowi logiczną całość i zawiera uzasadnienie wszystkich przeprowadzonych eksperymentów. Do najważniejszych wyników pracy należy zaliczyć wykazanie, że u myszy usunięcie SCD4 związane było z zaburzeniami metabolicznymi obserwowanymi nie tylko w sercu, ale i całym organizmie. Ponadto odnotowano, że u myszy utrzymywanych na diecie tłuszczowej wyłączenie ekspresji SCD4 związane było z poprawą wrażliwości na insulinę, manifestowało się ograniczeniem zawartości tkanki tłuszczowej oraz spadkiem cholesterolu we krwi. Co więcej, dowiedziono, że brak ekspresji SCD4 u myszy, którym podawano dietę wysokotłuszczową, przeciwdziałał koncentrycznej przebudowie serca. Ponadto, u myszy tych zauważono obniżoną akumulację lipidów w kardiomiocytach jak i ograniczony wzrost kropli

lipidowych, co zgodnie z przedstawionymi wynikami, wynikało w znacznej mierze z wzmożonego procesu lipolizy, będącego prawdopodobnie skutkiem wzrostu ekspresji białka ABHD5 (aktywatora lipazy ATGL). Ponadto, najważniejsze obserwacje z eksperymentu *in vivo*, potwierdzono w doświadczeniach *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej kardiomiocytów HL-1. Eksperymenty te dowiodły, że wyciszenie ekspresji SCD4 w kardiomiocytach hamuje efekty lipotoksyczności, między innymi ograniczając stres oksydacyjny i wzmagając kontrolę jakości mitochondriów czy homeostazę jonów wapnia.

Ostatnim rozdziałem rozprawy jest *Dyskusja*, w której mgr Wołosiewicz gruntownie analizuje otrzymane wyniki i konfrontuje je z rezultatami innych zespołów badawczych. Warto tutaj podkreślić, że w trakcie dyskusji wyników swoich jak i opublikowanych przez innych badaczy, Autor rozprawy niejednokrotnie wskazuje na ich pewne ograniczenia, sugerując konieczność dodatkowych badań, co świadczy o nie tylko wnikliwej analizie literatury, ale też o biegłej znajomości tematyki, samodzielności naukowej oraz zdolności do tworzenia koncepcji badawczych.

Podsumowanie

Podsumowując, uważam, że wartość merytoryczna pracy jest bardzo wysoka. Układ badawczy z wykorzystaniem myszy typu dzikiego oraz SCD4^{-/-} utrzymywanych na normalnej oraz wysokotłuszczowej diecie, jak i wykorzystanie komórek z wyhamowaną oraz indukowaną ekspresją SCD4, pozwolił na kompleksową wnikliwą realizację postawionych celów badawczych. Obszerny wstęp, jak i wyczerpująca dyskusja wyników pozwalają wnioskować o wysokim poziomie ogólnej wiedzy teoretycznej mgr. Wołosiewicza w dyscyplinie, którą reprezentuje. Otrzymane wyniki sugerują nie tylko bardzo istotną rolę SCD4 metabolizmie lipidów oraz glukozy w mięśniu sercowym, ale dostarczają dowodów na ogólnoustrojowe znaczenie badanego enzymu. Co ważne, obserwacja ta jest istotna szczególnie w świetle dotychczasowej wiedzy, wskazującej na specyficzną ekspresję SCD4 w sercu, co stanowić może inspirację do dalszych badań nad rolą SCD4 w innych tkankach, o czym mgr Wołosiewicz zasadnie wspomina w swojej rozprawie. Kolejnym argumentem wysokiej wartości merytorycznej ocenianej pracy doktorskiej jest fakt, że większa część wyników w niej zawartej, została już opublikowana w pracy pt. *SCD4 deficiency decreases cardiac steatosis and prevents cardiac remodeling in mice fed a high-fat diet* (2024 Sep;65(9):100612) w cenionym czasopiśmie *Journal of Lipid Research*. Co istotne, w publikacji tej Doktorant jest pierwszym autorem co dowodzi, że jego wkład był wiodący. Podsumowując wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej mgr. Marcina Wołosiewicza jest bardzo wysoka.

Z obowiązku recenzenta mam jednak do Doktoranta kilka uwag i zapytań, jakie nasunęły mi się podczas lektury rozprawy doktorskiej:

1. Jak wspomniano kilkakrotnie w pracy doktorskiej SCD4 jest izoformą specyficzną dla serca, a zgodnie z informacjami zawartymi w dyskusji specyficzność jej ekspresji analizowano między innymi w tkankach takich jak wątroba, czy mięśnie, które są kluczowe w utrzymaniu homeostazy energetycznej. Która tkanka, poza sercem, zdaniem Doktoranta może odpowiadać za ogólnoustrojowe zaburzenia metaboliczne zaobserwowane u myszy SCD4^{-/-}?
2. Odnosząc się do myszy SCD4^(-/-), Autor rozprawy często używa określenia „wyciszenie ekspresji”. Wyciszenie może sugerować, że myszy wykazują jedynie obniżony poziom ekspresji mRNA, a jak pokazano na Rycinie 24D u myszy SCD4^{-/-} ekspresji nie wykryto.
3. Na rycinie 14A zademonstrowano masę tłuszczu trzewnego u badanych zwierząt. W opisie metod nie znalazłem jednak informacji w jaki sposób dokonywano tego pomiaru. W opisie doświadczenia *in vivo* nie podano również informacji, czy i na jak długo przed uśmierceniem, zwierzęta pozbawiono dostępu do pokarmu.
4. Jednym z istotniejszych wyników otrzymanych w pracy, jest obserwacja pokazująca, że myszy SCD4^{-/-} wykazywały obniżony poziom ekspresji genów zaangażowanych w regulację metabolizmu glukozy w sercu, co zgodnie z danymi zawartymi w rozdziale *Dyskusja*, było przeciwne do wyników otrzymanych na myszach SCD1^{-/-}. Czy Autor rozprawy ma jakieś hipotezy/przypuszczenia, dlaczego efekt ten był odmienny w przypadku dwóch form tego samego białka?
5. Czy Autor rozprawy ma jakieś przypuszczenia, dlaczego potwierdzona na poziomie białka nadekspresja SCD4 w komórkach linii karidomiocytów nie była funkcjonalna?
6. Czy Autor rozprawy mógłby uzasadnić w jaki sposób wybrano długość okresu żywienia myszy dietą wzbogaconą w tłuszcz (HFD) oraz czy uważa, że jego przedłużenie mogłoby istotnie wpłynąć na otrzymane wyniki? Co ciekawe, mimo zastosowania HFD, w pracy nie zaobserwowano, by serca zwierząt żywionych dietą wysokotłuszczową, charakteryzowały się zwiększoną zawartością kolagenu.
7. Założenia i cele pracy zostały jasno przedstawione. Uważam jednak, że pracy można było postawić jasno sprecyzowaną hipotezę badawczą.
8. Wyniki (Western blot). Myślę, że należało podać masę cząsteczkową badanych białek. Ponadto, brak informacji, czy wszystkie sygnały odczytywano z tej samej membrany. W przypadku sekwencji starterów (Tabela 4) warto było również podać szczegółowy

nr sekwencji, którą wykorzystano do ich zaprojektowania. Nie znalazłem również informacji w jaki sposób dokonano pomiaru poziomu stężenia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia (Ryc. 36A).

Wiosek końcowy

Praca doktorska mgr. Wołosiewicza dostarczyła nowych i cennych informacji na temat roli desaturazy stearoilo-CoA 4 w metabolizmie lipidowo-węglowodanowym w sercu myszy, ale też wartościowych i nowatorskich informacji wskazujących na ogólnoustrojową rolę tego białka, przyczyniając się znacznie do poszerzenia aktualnego stanu wiedzy. Dlatego też podsumowując powyższą recenzję, uważam, że rozprawa doktorska mgr. Marcina Wołosiewicza stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i 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. Marcina Wołosiewicza do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ponadto, ze względu na nowatorski charakter otrzymanych wyników i ich wysoką wartość merytoryczną, wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku

Marek Sypski



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Tytuł: *Rola desaturazy stearoilo-CoA 4 w regulacji metabolizmu i funkcji mięśnia sercowego myszy*

Autor: mgr Marcin Wołosiewicz

Promotor: prof. dr hab. Paweł Dobrzyń

Recenzentka: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej z 13 grudnia 2024 r. . oraz pismo dyrektor Instytutu prof. dr hab. Agnieszki Dobrzyń syg. RN-123/53/2024 z 16 grudnia 2024 r.

1. Wprowadzenie

Rozprawa doktorska autorstwa mgr Marcina Wołosiewicza dotyczy istotnej problematyki dotyczącej z metabolizmu lipidów w mięśniu sercowym. Praca została przeprowadzana na modelu zwierzęcym (myszy) oraz na modelu komórkowym linii HL-1, co umożliwiło szczegółową analizę mechanizmów molekularnych jednego z enzymów – desaturazy stearoilo-CoA 4 (SCD4), biorącego udział w tych przemianach.

Zagadnienia dotyczące metabolizmu lipidów mają kluczowe znaczenie w zrozumieniu patofizjologii chorób sercowo-naczyniowych, zwłaszcza w kontekście zaburzeń metabolicznych, leżących u podłoża m. in. niewydolności serca czy kardiomiopatii. Wybór SCD4 u myszy jako głównego przedmiotu badań jest uzasadniony jej rolą w homeostazie lipidowej, potencjalnym wpływem na funkcję serca oraz selektywną obecnością tego enzymu w kardiomiocytach

Praca wpisuje się w nurt podstawowych badań biomedycznych, których wyniki mogą w przyszłości ułatwić zrozumienie procesów ważnych w organizmie człowieka. Badania były finansowane ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki (grant Sonata BIS 6 UMO-2016/22/E/NZ4/00650).

2. Ocena formalna pracy

Rozprawa składa się z 133 stron zasadniczego tekstu, podzielonego na typowe dla dysertacji rozdziały: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz bibliografię. Praca zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim, które zwięźle przedstawiają istotę badań. W pracy zamieszczono 11 tabel oraz 36 rycin, które są czytelne,

dobrze opisane i stanowią istotne uzupełnienie przedstawionej treści. Liczba cytowanych pozycji literaturowych wynosi 355, co potwierdza dobrą znajomość przez Doktoranta piśmiennictwa naukowego z zakresu analizowanej tematyki.

Układ pracy jest przejrzysty, a język użyty w rozprawie jest poprawny i dostosowany do wymagań tekstów naukowych.

3. Ocena merytoryczna

3.1. Wybór tematu i jego uzasadnienie

Tematyka rozprawy jest oryginalna i dotyczy kluczowych mechanizmów regulacyjnych w metabolizmie lipidów. Badania nad desaturazą stearylo-CoA 4 wpisują się w obecne trendy w naukach biomedycznych, zmierzające do identyfikacji molekularnych regulatorów funkcji kardiomiocytów. W niniejszej pracy Autor skoncentrował się w sposób szczególny na aspekcie metabolicznym kardiomiocytów. Wybrany temat jest dobrze uzasadniony i ma znaczenie poznawcze. Doktorant przedstawił szczegółowy opis metabolizmu wolnych kwasów tłuszczowych i glukozy w sercu, rolę desaturazy stearylo-CoA w metabolizmie z uwzględnieniem jej czterech izoform, w tym badanej w pracy SCD4, jak również wpływ mitochondriów i jonów wapnia na funkcję oraz metabolizm serca.

Zakończenie wstępu stanowi podsumowanie udziału powyższych czynników w procesie przebudowy i dysfunkcji serca w przebiegu otyłości.

3.2. Cel pracy i hipotezy badawcze

Cele pracy zostały jasno sformułowane. Autor, dotyczyły wpływu wyciszenia ekspresji *Scd4* u myszy na strukturę, funkcję i metabolizm serca w warunkach fizjologicznym oraz w otyłości.

3.3. Materiały i metody

Rozdział „Materiały i metody” został opracowany starannie i szczegółowo. Praca ma charakter eksperymentalny z uwzględnieniem technik *in vivo* i *in vitro*. W badaniach *in vivo* wykorzystano model myszy C57BL/6 z zahamowaną ekspresją genu *Scd4* w całym organizmie (SCD4^{-/-}). Grupę kontrolną stanowiły myszy typu dzikiego (WT). Myszy przez 8 kolejnych tygodni przebywały na diecie standardowej (ang. chow diet) odpowiednio WT chow i SCD4^{-/-} chow; lub wysokotłuszczowej – odpowiednio WT HFD i SCD4^{-/-} HFD. W ósmym tygodniu badania u myszy wykonano badanie echokardiograficzne i przeprowadzono dootrzewnowy test tolerancji glukozy. Następnie myszy zostały poddane eutanazji w celu pobrania krwi i tkanek do badań histopatologicznych i biochemicznych. Badania *in vitro* z kolei zostały przeprowadzone na liniach komórek mięśnia sercowego (HL-1), w których wyciszono, jak również zwiększono ekspresję genu *Scd4*.

3.4. Wyniki

Wyniki zostały przedstawione w sposób przejrzysty i uporządkowany, co było zadaniem trudnym wzięwszy pod uwagę dużą liczbę przeprowadzonych eksperymentów. W pierwszej grupie badań Doktorant wykazał, że zastosowanie diety wysokotłuszczowej (HFD) w porównaniu z dietą standardową (chow) skutkowało zwiększoną masą ciała oraz zmienionym profilem metabolicznym, -zwiększonym współczynnikiem insulinooporności HOMA-IR oraz zwiększonym stężeniem glukozy, insuliny i cholesterolu w osoczu badanych zwierząt, przy czym zmiany te były bardziej widoczne u myszy genetycznie zmodyfikowanych (czyli szczepu *Scd4*^{-/-}) niż u myszy szczepu dzikiego (*wt*). Dodatkowa analiza lipidów zawartych w tkance serca, wykonana metodą chromatografii cienkowarstwowej, a następnie spektrometrii masowej wykazała wzrost zawartości lipidów (szczególnie trójglicerydów) u myszy karmionych paszą wysokotłuszczową w porównaniu do grup myszy karmionych paszą standardową przy jednoczesnym względnym zmniejszeniu zawartości lipidów (szczególnie trójglicerydów) w sercach myszy genetycznie zmodyfikowanych. Niemniej jednak, u myszy genetycznie zmodyfikowanych zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) okazała się relatywnie mniejsza niż u zwierząt szczepu dzikiego, odwrotnie niż dla nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) oraz jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA), co ma związek z aktywnością badanego w pracy enzymu. Ocena wpływu genu *Scn4* na zawartość lipidów w tkance została dodatkowo wzmocniona badaniami na linii komórkowej HL-1, gdzie wykazano, że zmniejszenie aktywności genu *Scn4*^{-/-} prowadzi do zmniejszenia magazynowania lipidów, natomiast nadekspresja tego genu – do wzrostu zawartości lipidów. Kolejna grupa wyników dotyczyła badań echokardiograficznych wykonanych u wszystkich badanych myszy, w których wykazano, że zastosowanie diety wysokotłuszczowej u zwierząt szczepu dzikiego zwiększa parametr RWT (względna grubość ściany lewej komory), zmniejszając jednocześnie EDV (objętość końcoworozkurczową), co stanowi wykładnik przerostu koncentrycznego. Wspomnianej zależności nie zaobserwowano u myszy *Scd4*^{-/-}, przy czym warto podkreślić, że myszy genetycznie zmodyfikowane nawet przy zastosowaniu diety zwykłej prezentowały zwiększoną wartość RWT i zmniejszoną wartość EDV (– kwestię tę Doktorant szczegółowo objaśnił w dyskusji). W kolejnej grupie wyników Doktorant przedstawił wpływ diety u obu grup myszy na ekspresję enzymów biorących udział w szlakach lipolizy i lipogenezy wykazując, że zastosowanie paszy wysokotłuszczowej zmniejsza ekspresję enzymów odpowiadających za lipogenezę u myszy szczepu dzikiego, natomiast zwiększa ekspresję tych enzymów u myszy *Scd4*^{-/-}. Dla enzymów lipolitycznych wykazano natomiast, że defekt genu *Scd4* prowadzi do zwiększenia ich aktywności u myszy. Powyższe wyniki zostały uzupełnione o wyniki badań na linii komórkowej HL-1. Dodatkowe eksperymenty, ocena zwłóknienia mięśnia sercowego (brak wpływu wyciszenia *Scd4* badanie profilu transkryptomicznego za pomocą techniki NanoString (zmianę ekspresji co najmniej kilkudziesięciu genów między poszczególnymi grupami, przy czym geny te kodowały przede wszystkim enzymy szlaków metabolicznych), badanie szlaku metabolizmu glukozy (wykazano obniżony metabolizm glukozy pod wpływem zarówno diety wysokotłuszczowej, jak i samej mutacji *Scd4*^{-/-}), ocena aktywności mitochondriów i poziomu wolnych rodników tlenowych (spadek mitofagii, czyli selektywnej degradacji mitochondriów u myszy szczepu

dzikiego na diecie wysokotłuszczowej, odwrotnie niż u myszy genetycznie zmodyfikowanych oraz obniżona zawartość wolnych rodników tlenowych u myszy *Scd4*^{-/-}, szczególnie na diecie standardowej) oraz badanie oceny gospodarki jonów wapnia w komórce (zmiany poziomu ekspresji białek odpowiadających za gospodarkę wapniową zarówno wskutek zastosowania paszy HFD, jak i mutacji genu *Scd4*) wykazały istotny wpływ zablokowania ekspresji badanego w pracy genu *Scd4* na parametry czynnościowe zarówno samych kardiomiocytów, jak i serca (działanie potencjalnie kardioprotekcyjne)

3.5. Dyskusja

Dyskusja jest wnikliwa i oparta na aktualnej literaturze. Doktorant na początku przedyskutował wyniki parametrów masy ciała, zawartości tkanki tłuszczowej oraz parametrów metabolicznych (poziom cholesterolu, glukozy, współczynnika HOMA-IR) u badanych zwierząt w kontekście innych prac wykonanych zarówno na mysich modelach otyłości, jak i na myszach ze zmniejszonym poziomem ekspresji poszczególnych enzymów, m.in. pozostałych enzymów z grupy SCD. Kolejne elementy dyskusji dotyczyły wpływu diety wysokotłuszczowej na parametry echokardiograficzne, zawartość poszczególnych frakcji lipidowych w tkance serca, enzymów biorących udział w szlakach przemian lipidowych (m.in. lipolizy i lipogenezy), białek regulujących funkcje mitochondriów oraz gospodarkę wapniową.

Magister Marcin Wołosiewicz dokonał ciekawego zestawienia prac innych autorów, ukierunkowanego w sposób szeroki na procesy metaboliczne (np. akumulacja tłuszczów w sercu przy genetycznym defekcie białka MTP), jak również na potencjalny wpływ innych enzymów z grupy SCD (szczególnie SCD1 i SCD2) na badane przez Doktoranta procesy

3.6. Wnioski

Wnioski są zgodne z uzyskanymi wynikami i odpowiednio odnoszą się do celów pracy. Podkreślają znaczenie enzymu SCD4 jako ważnego elementu przemian lipidów u myszy, podkreślając jego potencjalne znaczenie ogólnoustrojowe.

4. Uwagi

Praca jest napisana w sposób staranny, przeprowadzone badania są niezwykle szczegółowe i rozbudowane, metodologia adekwatnie dostosowana, niemniej jednak Doktorant nie ustrzegł się pewnych mankamentów. Przeprowadzając badania echokardiograficzne, Doktorant ocenił morfologię oraz funkcję skurczową (EF, FS, CO, SV) lewej komory serca, ale zabrakło oceny funkcji rozkurczowej, która w warunkach otyłości indukowanej dieta jest zaburzona. Wartościowe byłoby zatem również zmierzenie, a następnie porównanie parametrów dysfunkcji rozkurczowej takich jak pole lewego przedsionka (*left atrial area*) oraz czas izolwolumetrycznej relaksacji lewej komory (IVRT).

Ważną kwestią pozostaje brak omówienia uzyskanych przez Doktoranta wyników w kontekście lepszego zrozumienia analogicznych procesów w organizmie człowieka, co

mogłoby mieć potencjalne przełożenie na aspekty kliniczne. Zabrakło chociażby przedstawienia analogicznych enzymów w organizmie człowieka i wzmianki, na ile procesy katalizowane przez desaturazy u ludzi pozostają poznane w kontekście regulacji lipidów w kardiomiocytach.

Ponadto, Doktorant w Dyskusji wspominał o kwestii skrócenia czasu relaksacji kardiomiocytu z dysfunkcją genu *Scd4* jako dowodu wskazującego na przyczynową rolę defektu enzymu SCD4 w rozwoju niewydolności serca o fenotypie rozkurczowym, co jest porównaniem zbyt daleko idącym, tym bardziej, że dysfunkcja rozkurczowa serca nie była w pracy Doktoranta badana.

Wspomniane uwagi jednak nie umniejszają wartości pracy doktorskiej oraz nie odbierają jej ewidentnych walorów, do których przede wszystkim należy kompleksowość uzyskanych wyników w kontekście roli enzymu SCD4 w organizmie myszy.

5. Podsumowanie i ocena końcowa

Rozprawa doktorska autorstwa mgr. Marcina Wołosiewicza jest pracą oryginalną, dobrze opracowaną metodologicznie i wnoszącą istotny wkład w rozwój wiedzy o mechanizmach regulacji metabolizmu i funkcji mięśnia sercowego w modelu mysim. Uzyskane wyniki mogą potencjalnie wpłynąć na projektowanie dalszych prac, już bardziej ukonstytuowanych w obrębie medycyny translacyjnej.

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

Mając na uwadze nakład wykonanej przez Doktoranta pracy eksperymentalnej oraz oceniając jej wartość naukową wnoszę o wyróżnienie przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej.

prof. dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska
Kierownik

Katedry i Zakładu Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej WUM

Warszawa, 3 marca 2025 r.