



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biochemii, Zakład Regulacji Metabolizmu

dr hab. Katarzyna Winiarska, prof. ucz.

e-mail: k.winiarska5@uw.edu.pl

tel. 22 5543208



Warszawa, 21 marca 2025

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Adriana Sówki

pt. *Desaturaza stearoilo-CoA 1 jako regulator metabolizmu i funkcji wydzielniczej okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w zaburzeniach towarzyszących otyłości*

wykonanej w Pracowni Molekularnej Biochemii Medycznej
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
pod opieką promotorską Pana prof. dr. hab. Pawła Dobrzyńia

Pan mgr Sówka nadał swojej rozprawie doktorskiej formę klasycznej pisemnej dysertacji, przygotowanej w języku polskim i dodatkowo opatrzonej anglojęzycznym streszczeniem. Jest to w pełni zgodne z wymogami formalnymi określonymi w art. 187 *Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.*

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekkan@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Ocena ogólnej wiedzy teoretycznej Doktoranta: POZYTYWNA

Uzasadnienie:

Niewątpliwym świadectwem rozległej i dogłębnej wiedzy teoretycznej Pana mgr. Sówki jest – znakomicie wprowadzający w tematykę rozprawy – Wstęp. Doktorant dowiódł w nim bardzo dobrej znajomości zagadnień dotyczących funkcjonowania tkanki tłuszczowej, szczegółowo omawiając jej metabolizm i aktywność wydzielniczą. We Wstępie Pan mgr Sówka wyczerpująco przedstawił także dotychczasowy stan wiedzy na temat desaturazy stearoilo-CoA 1 oraz jej znaczenia w funkcjonowaniu tkanki tłuszczowej i układu sercowo-naczyniowego. Co więcej, należy wyraźnie podkreślić, że Doktorant wykazał się nie tylko samą wiedzą, ale także umiejętnością jej bardzo sprawnego porządkowania (a spis piśmiennictwa obejmuje niebagatelną liczbę ponad czterystu pozycji).

Jednak, w mojej opinii, najdobitniejszym dowodem przyswojonej przez Doktoranta wiedzy teoretycznej jest część rozprawy poświęcona dyskusji uzyskanych wyników, w której Pan mgr Sówka z wielką swobodą skonfrontował swoje osiągnięcie z obszernym piśmiennictwem z zakresu podjętej tematyki badawczej.

Ocena umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktoranta: POZYTYWNA

Uzasadnienie: Nie mam wątpliwości, że w tym punkcie recenzji Pan mgr Sówka zasługuje nie tylko na ocenę pozytywną, ale – na ocenę wysoce pozytywną. Nim jednak przejdę do uzasadnienia tej opinii, upomnę się o „wielkie nieobecne” – dlaczego Autor rozprawy, obok bardzo jasno określonych celów pracy, nie przedstawił konkretnych hipotez badawczych? Ich brak to największy, choć jednocześnie jedyny naprawdę znaczący, mankament rozprawy.

Cała reszta świadczy o doskonałym przygotowaniu Doktoranta do samodzielnej pracy naukowej. Pan mgr Sówka dowiódł umiejętności prawidłowego planowania doświadczeń, właściwego doboru metod eksperymentalnych i należytej analizy uzyskanych wyników. Moje wielkie uznanie budzi rozległość opanowanego przez Pana mgr. Sówkę warsztatu metodycznego – od technik biologii molekularnej, przez oznaczenia chromatograficzne, zawansowane techniki mikroskopowe i cytometrię przepływową, na pomiarach funkcjonalnych (np. kurczliwości komórek mięśniowych) kończąc. Szczególnie wysoko oceniam także krytycyzm i wnikliwość, którymi Doktorant wykazał się podczas dyskusji uzyskanych wyników. Ale za najważniejszy przejaw dojrzałości naukowej Pana mgr. Sówki uważam zdolność syntetycznego zestawiania faktów i klarownego formułowania wniosków (tak, tu dołączam pochwałę za rycinę podsumowującą rozprawę).

Integralnym elementem pracy naukowej jest umiejętność pisania tekstów naukowych – praca Pana mgr. Sówki dowodzi, że Autor ma ją opanowaną na dobrym poziomie. Pan mgr. Sówka posługuje się poprawnym językiem, jasno formułuje myśli. Dysertacja nie jest wolna od pomniejszych błędów, zarówno terminologicznych jak i stylistycznych, ale mają one marginalne znaczenie dla końcowej oceny pracy, nie będę więc przytaczać ich w recenzji (obietuję za to, że wytknę je Doktorantowi w kularowej rozmowie).

Ocena oryginalności rozwiązania problemu naukowego przez Doktoranta: POZYTYWNA

Uzasadnienie: Dodam, że i w tym punkcie jest to ocena wysoce pozytywna. Badania przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej mają pionierski charakter. Wprawdzie działanie destaturazy stearoilo-CoA 1 zostało wcześniej szczegółowo opisane w tkance tłuszczowej o innych lokalizacjach, znaczenie tego enzymu w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej pozostawało dotąd nieznane. Podejmując się rozwiązania tego problemu, Pan mgr Sówka postawił sobie więc zadanie bardzo ambitne – i od razu należy dodać, że wywiązał się z niego znakomicie, w czym na pewno pomógł Mu świetnie opanowany warsztat eksperymentalny (o czym już wspominałam w poprzednim punkcie recenzji), dostęp do niezbędnej aparatury oraz współpraca z innymi specjalistami.

Nowatorskość rozprawy Pana mgr. Sówki nie budzi wątpliwości. Ogromnym atutem pracy jest kompleksowość badań i różnorodność rozwiązań eksperymentalnych, z dużym powodzeniem łącząca zastosowanie modeli *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro*. Co więcej, Doktorant nie poprzestał na badaniach dotyczących wyłącznie okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej, ale przeanalizował również, jak zmiany aktywności wydzielniczej tejże tkanki wpływają na funkcjonowanie komórek mięśniówki gładkiej i śródbłonna naczyń krwionośnych. Duża część wyników została już opublikowana w bardzo dobrym czasopiśmie naukowym (*Journal of Cellular Physiology*; IF₅ = 5,3; Q1).

Na koniec warto wyraźnie podkreślić, że tematyka badań podjętych przez Pana mgr. Sówkę jest tematyką o priorytetowym znaczeniu i potencjalnym aspekcie aplikacyjnym – dotyczy bezpośrednio problemu otyłości i towarzyszących jej powikłań, na czele z chorobami sercowo-naczyniowymi, które pozostają główną przyczyną zgonów w Europie, w tym także w Polsce. Przyznam zresztą, że elementem, którego mi nieco zabrakło w zamieszczonej w rozprawie Dyskusji, jest wskazanie, w jaki sposób wyniki uzyskane przez Doktoranta mogą przyczynić się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych. Liczę na rozwinięcie tego zagadnienia podczas obrony!

Wniosek końcowy

W mojej opinii, rozprawa doktorska Pana mgr. Adriana Sówki w pełni spełnia warunki określone w art. 187 *Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie Pana mgr. Adriana Sówki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora

Ponadto, zważywszy nowatorski charakter badań, ich kompleksowość oraz niewątpliwy istotny wkład w rozwój dziedziny, wnioskuje o wyróżnienie rozprawy.



Katarzyna Winiarska



Kraków, 31 marca 2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Adriana Sówki

'Desaturaza stearoilo-CoA 1 jako regulator metabolizmu i funkcji wydzielniczej okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w zaburzeniach towarzyszących otyłości'

Chociaż naczynia krwionośne nie spełniają wszystkich kryteriów samodzielnego narządu, ze względu na strategiczne funkcje, jakie pełnią w procesach fizjologicznych i zjawiskach patologicznych, są często określane mianem 'funkcjonalnego narządu rozproszonego'. Ich dysfunkcja odgrywa kluczową rolę w rozwoju chorób układu krążenia. Istotne znaczenie w tym kontekście mają nie tylko komórki śródbłonna, którym najczęściej przypisuje się krytyczną rolę w utrzymaniu homeostazy układu krążenia, lecz także okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa (ang. perivascular adipose tissue, PVAT). PVAT reguluje funkcję naczyń krwionośnych poprzez uwalnianie adipokin, których profil wydzielniczy ulega istotnym, niekorzystnym zmianom w warunkach otyłości. Zmiany te sprzyjają mechanizmom prozapalnym, które prowadzą m.in. do dysfunkcji śródbłonna, stresu oksydacyjnego, sztywności naczyń oraz zmian fenotypowych i funkcjonalnych komórek mięśniówki gładkiej naczyń (ang. vascular smooth muscle cells, VSMC).

Zaburzenia metabolizmu lipidów odgrywają nadrzędną rolę w patogenezie otyłości i powiązanych chorób, takich jak cukrzyca typu 2 i miażdżyca. Jednym z kluczowych enzymów regulujących metabolizm lipidów jest desaturaza stearoilo-CoA 1 (ang. stearyl-CoA desaturase 1, SCD1), katalizująca konwersję nasyconych kwasów tłuszczowych – kwasu stearynowego i palmitynowego – do ich jednonienasyconych odpowiedników, kwasu oleinowego i palmitoleinowego. Dotychczasowe badania wykazały, że ekspresja i aktywność SCD1 jest zwiększona w tkance tłuszczowej u pacjentów otyłych i hiperlipidemicznych. Myszy pozbawione SCD1 wykazują korzystny profil lipidowy, zredukowaną masę tkanki tłuszczowej oraz zwiększoną wrażliwość tkanek na insulinę. Co ciekawe, mimo że są chronione przed otyłością wywołaną dietą wysokotłuszczową, wykazują większą podatność

na rozwój miażdżycy. **Badania przeprowadzone przez Pana Adriana Sówkę koncentrują się na dotychczas nieopisanej roli SCD1 w PVAT w odpowiedzi na dietę wysokotłuszczową,** obejmując analizę wpływu niedoboru SCD1 na metabolizm lipidów, dynamikę mitochondriów, polaryzację makrofagów infiltrujących PVAT oraz parakrynną funkcję adipocytów w regulacji odpowiedzi angiogennej komórek śródbłonka i fenotypu VSMC. **Uzyskane wyniki wnoszą nową wiedzę i przybliżają zrozumienie roli SCD1 i PVAT w biologii naczyń krwionośnych, co stanowi istotny wkład w rozwój nauk biologicznych.**

Rozprawa doktorska ma formę monografii i obejmuje standardowe rozdziały: streszczenie (także w języku angielskim), wykaz skrótów, wstęp, założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski końcowe, bibliografię zawierającą 416 pozycji oraz spis publikacji Doktoranta. Warto podkreślić, że **część wyników przedstawionych w pracy została opublikowana w czasopiśmie *Journal of Cellular Physiology* z wiodącym autorstwem Doktoranta.**

We wstępie pracy opisano budowę i funkcje tkanki tłuszczowej, w tym PVAT, oraz mechanizmy związane z różnicowaniem adipocytów i metabolizmem tkanki tłuszczowej. Przedstawiono również przegląd dotychczasowej wiedzy dotyczącej SCD1, regulacji jej ekspresji i aktywności oraz znaczenia w modulacji metabolizmu, funkcji tkanki tłuszczowej i układu krążenia. **Ta część rozprawy jest bardzo dobrze napisana. Zawiera liczne schematy, które świetnie ilustrują treść i ułatwiają zrozumienie opisywanych mechanizmów. Świadczy to o dużej wiedzy Doktoranta w zakresie omawianej tematyki.**

Cel pracy został precyzyjnie sformułowany i uzasadniony. Doktorant wyznaczył trzy cele szczegółowe: 1) określenie roli SCD1 w regulacji metabolizmu energetycznego TPVAT i APVAT (odpowiednio części piersiowej i brzusznej PVAT) myszy, 2) zbadanie wpływu ekspresji SCD1 na rozwój stanu zapalnego w PVAT wywołanego dietą wysokotłuszczową, 3) analizę wpływu SCD1 na związek pomiędzy funkcją wydzielniczą adipocytów okołonaczyniowych a funkcją komórek śródbłonka naczyniowego i VSMC. **Brakuje jednak w tej części pracy jasno podanej hipotezy, na podstawie której zostały sformułowane powyższe cele badawcze.**

Część Materiały i metody szczegółowo opisuje dwa modele badawcze: myszy z nokautem SCD1 karmione dietą wysokotłuszczową przez 8 lub 16 tygodni oraz model pierwotnych adipocytów okołonaczyniowych izolowanych od tych zwierząt. Przedstawiono

także szeroki wachlarz metod biochemicznych oraz biologii molekularnej i komórkowej, które zostały zastosowane w badaniach. Procedury laboratoryjne są opisane w sposób umożliwiając ich powtórzenie, podano również sposób analizy statystycznej uzyskanych wyników. **Na tej podstawie można stwierdzić, że Doktorant biegle posługuje się licznymi technikami laboratoryjnymi, umożliwiającymi projektowanie doświadczeń dających odpowiedź na postawione w pracy pytania.**

Wyniki badań zostały przedstawione w formie czytelnych i dobrze opisanych rycin, choć w nielicznych przypadkach opisy mogłyby być bardziej precyzyjne. Są one ułożone w logiczny ciąg prowadzący do uzyskania odpowiedzi na zadane pytania badawcze. Wyniki zostały prawidłowo zinterpretowane. Doktorant wykazał, że poziom glukozy, cholesterolu i triacylogliceroli jest niższy w osoczu myszy SCD1 KO karmionych dieta wysokotłuszczową w porównaniu do myszy typu dzikiego. Myszy SCD1 KO wykazują również lepszą tolerancję glukozy oraz aktywację szlaków lipolizy i β -oksydacji kwasów tłuszczowych w adipocytach. Mitochondria SCD1 KO charakteryzują się zwiększeniem ekspresji białek łańcucha mitochondrialnego i szybszym tempem zużycia tlenu. Ponadto, wyciszenie SCD1 nasila infiltrację tkanki okołonaczyniowej przez makrofagi o fenotypie prozapalnym. PVAT myszy SCD1 KO wykazuje właściwości prozapalne, proangiogenne i negatywnie reguluje fenotyp i funkcję komórek VSMC. Te oraz wiele innych wyników przedstawionych w pracy odpowiada na pytania badawcze zadane przez Doktoranta. **Dyskusja wyników jest rzetelna i odnosi się do aktualnej literatury**, wskazując zarówno na potwierdzenie wcześniejszych doniesień, jak i na nowatorskie aspekty badań. Z obowiązku recenzenta dodam, że styl tej części pracy, zarówno opisu wyników jak i dyskusji, choć precyzyjny, momentami utrudnia płynną lekturę, co może wynikać z jednej strony z dużej liczby analiz, ale również w pewnym stopniu ograniczonej narracji kontekstowej. **Ta drobna uwaga edytorska nie zmienia jednak mojej wysokiej oceny badań przeprowadzonych przez Doktoranta, który zaprezentował w pracy duże umiejętności eksperymentalne, szeroką wiedzę merytoryczną i dojrzałość naukową.**

W trakcie lektury nasunęły mi się następujące pytania, które chętnie przedyskutuję z Doktorantem:

- Jeden z wniosków mówi, że komórki EC traktowane pożywkami z adipoocytów pierwotnych izolowanych od myszy SCD1 wykazywały duży potencjał angiogeny *in vitro*

(Ryc. 37). Czy została sprawdzona żywotność komórek EC hodowanych na matriżelu w tych pożywkach? Czy analizowano formowanie struktur naczyńopodobnych w dłuższych niż 120 minut punktach czasowych (zwykle są to punkty około 12-16 godzinne)? Czy zastosowano kontrolę pozytywną w tej analizie?

- Czy hodowla adipocytów bez FBS przez 24 h wpływa na ich żywotność?

- Jakie było kryterium wyboru izolacji pierwotnych adipocytów z części piersiowej PVAT, a nie brzusznej?

- Rycina 26A, grupa 16HF, plot CD45 vs F4/80 - z czego wynika przyjęcie strategii analizy, w której komórki są w dużej mierze poza bramką, przy czym odpowiednie bramki nie są identyczne w pozostałych grupach? Jaka kontrola (FMO, kontrole izotypowe?) została użyta w analizie cytometrycznej makrofagów naciekających PVAT?

- Co może być przyczyną odmiennej regulacji poziomu trimetylacji lizyny 27 histonu 3 w genach *Adipoq* i *Il6* indukowanej zaburzoną równowagą SFA/MUFA?

Inne pomniejsze uwagi, o których warto wspomnieć:

- Human umbilical vein endothelial cells są komórkami śródbłonna pochodzącymi z żyły pępowinowej, a nie odpiszczelowej (str. 59).

- Rycina 11, 13, 14, 15 – liczba punktów prezentowanych na wykresach nie pokrywa się z liczbą myszy na grupę w opisie – w jaki sposób były analizowane te dane?

Podsumowując, przedstawiona do oceny dysertacja porusza aktualne i ważne problemy naukowe, a wyniki przeprowadzonych badań przyczyniają się w szerszym kontekście do pełniejszego zrozumienia mechanizmów determinujących znaczenie SCD1 i PVAT w stanie otyłości. 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. Adriana Sówki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ze względu na wysoką jakość naukową zaprezentowanych badań, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

dr hab. Anna Grochot-Przęczek, prof. UJ
Zakład Biotechnologii Medycznej
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

Gdańsk, 31 marca 2025

Prof. dr hab. Tomasz Śledziński
Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń
Dyrektor Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego PAN

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Adriana Sówki pt. „Desaturaza stearoilo-CoA 1 jako regulator metabolizmu i funkcji wydzielniczej okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w zaburzeniach towarzyszących otyłości”.

Praca doktorska mgr. Adriana Sówki ma formę monografii zawierającej typowe elementy tj. spis skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i bibliografię. Na końcu umieszczono listę publikacji Doktoranta, wśród których jest publikacja oparta na części wyników z pracy doktorskiej w bardzo dobrym czasopiśmie *Journal of Cellular Physiology* (wyd. Wiley, Impact Factor = 4,5, 1 kwartył IF). W pracy tej Doktorant jest pierwszym autorem. Praca doktorska liczy łącznie 193 strony. Jest przygotowana w klarowny sposób i przedstawia bardzo złożone problemy.

Głównym zagadnieniem którego dotyczy praca doktorska jest rola desaturazy stearoilo-CoA 1 (SCD1) w metabolizmie okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej (PVAT) oraz wpływ wyciszenia genu kodującego ten enzym w adipocytach pochodzących z PVAT na komórki śródbłonna i mięśni gładkich naczyń krwionośnych. SCD1 jest kluczowym enzymem odpowiedzialnym za przemianę nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) w jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA) w organizmie ssaków. Zmiany zawartości SFA i MUFA w komórkach znacząco wpływają na metabolizm. Modelem badawczym były myszy z wyciszonym genem kodującym SCD1 poddane diecie wysokotłuszczowej, która służy uzyskaniu doświadczalnego modelu otyłości. Otyłość jest bardzo istotnym problemem zdrowotnym i społecznym a częstość występowania tego schorzenia ciągle rośnie. Otyłość jest związana z licznymi powikłaniami do których należą choroby sercowo-naczyniowe. Dlatego przedstawione w pracy obszerne badania nad rolą SCD1 w powstawaniu zaburzeń metabolizmu PVAT towarzyszących otyłości są bardzo ważne w kontekście zarówno poznawczym jak i praktycznym, ponieważ mogą stanowić podstawę dalszych badań mających na celu zapobieganie sercowo-naczyniowym powikłaniom otyłości.

Głównym celem ocenianej pracy doktorskiej było zbadanie roli SCD1 w regulacji metabolizmu energetycznego i stanu zapalnego w PVAT oraz wpływu cząsteczek wydzielanych przez adipocyty pochodzące z PVAT z wyciszonym genem kodującym SCD1 na komórki śródbłonna i mięśni gładkich naczyń krwionośnych.

Badania zostały przeprowadzone w dobrze opisanym modelu myszy z wyciszonym genem kodującym SCD1. Myszy zostały poddane diecie wysokotłuszczowej (HFD), co z kolei stanowi znany model otyłości doświadczalnej. HFD była stosowana przez okres 8 i 16 tygodni. Z kolei w badaniach *in vitro* użyto hodowli pierwotnej adipocytów uzyskanych z PVAT z odcinka piersiowego, a następnie medium z hodowli adipocytów użyto do traktowania komercyjnych linii komórek śródbłonka i mięśni gładkich naczyń krwionośnych, aby sprawdzić wpływ cząsteczek wydzielanych przez adipocyty na funkcję komórek naczyń.

Należy podkreślić bardzo rozbudowaną i wszechstronną metodykę użytą w badaniach doktoranta, co pozwoliło zbadać wpływ SCD1 na wiele procesów zachodzących w dwóch badanych skupiskach PVAT (z odcinka piersiowego, TPVAT i brzuszego, APVAT) oraz w komórkach naczyń po traktowaniu ich medium z hodowli adipocytów z wyciszonym SCD1. Do najważniejszych metod laboratoryjnych zaliczam: metody obrazowe – analizy histochemiczne, badanie gęstości naczyń, mikroskopię elektronową, wybarwienie lipidów czerwieńią oleistą; badanie aktywności ATGL, pomiar tempa lipolizy, badanie polaryzacji makrofagów za pomocą cytometrii przepływowej, analiza ekspresji genów na poziomie mRNA i białka metodami RT-qPCR i western blotting, analiza profilu kwasów tłuszczowych metodą GC-MS, rozdział frakcji lipidów metodą TLC, analiza mitochondriów, pomiary poziomu ATP, tempa zużycia tlenu i produkcji ROS w hodowlach komórkowych, immunoprecypitacja chromatyny i ChIP-qPCR, a także metody stosowane w badaniach komórek naczyń – testy angiogenezy, migracji, proliferacji (cytometria przepływowa) i badanie zdolności skurczu. Jest to imponujący zestaw stosowanych metod, a i tak nie wymieniłem wszystkich.

Najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań to:

- 1) Wyciszenie SCD1 u myszy karmionych HFD zapobiegło wzrostowi masy ciała i poziomu cholesterolu we krwi, oraz ograniczyło wzrost masy tkanki tłuszczowej, zawartość kropli lipidowych w PVAT, poziom glukozy i triacylogliceroli (TAG) we krwi. Z kolei myszy z wyciszeniem SCD1 miały wyższą zawartość kolagenu w aorcie.
- 2) Wyciszenie SCD1 u myszy karmionych HFD spowodowało obniżenie poziomu TAG a zwiększenie zawartości diacylogliceroli (DAG) i wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) w PVAT oraz hodowlach adipocytów pochodzących z PVAT. Stwierdzono także zmiany profilu kwasów tłuszczowych w obu badanych skupiskach PVAT.
- 3) Stwierdzono zwiększoną lipolizę oraz aktywność ATGL u myszy SCD1 *-/-* karmionych HFD w porównaniu do myszy WT. Wyższa była także lipoliza w adipocytach pochodzących z PVAT od myszy SCD1 *-/-* w porównaniu do izolowanych z PVAT myszy WT.
- 4) Stwierdzono zwiększoną aktywność mitochondriów i gęstość ich grzebieni u myszy SCD1 *-/-* karmionych HFD w porównaniu do myszy WT.
- 5) Prozapalna polaryzacja makrofagów wywołana HFD była wyższa u myszy SCD1 *-/-* niż u myszy WT, co wiązało się z wyższym poziomem markerów stanu zapalnego u myszy z wyciszeniem SCD1.
- 6) Wyciszenie SCD1 spowodowało zmianę profilu wydzielanych adipokin, a także wzrost poziomu adiponektyny i obniżenie poziomu IL6 w adipocytach pochodzących z PVAT.

- 7) Traktowanie komórek mięśni naczyń żywnością z hodowli adipocytów SCD1 -/- spowodowało wzrost migracji i proliferacji, natomiast upośledziło zdolność skurczu.
- 8) Traktowanie komórek śródbłonna naczyń żywnością z hodowli adipocytów SCD1 -/- spowodowało wzrost aktywacji eNOS i AMPK oraz wzrost angiogenezy.

Na podstawie wykonanych badań autor wnioskuje, że wyciszenie genu kodującego SCD1 w PVAT w doświadczalnie wywołanej otyłości powoduje ograniczenie akumulacji TAG w tej tkance, co związane jest ze zwiększoną lipolizą i aktywacją mitochondriów. Jednocześnie dochodzi do indukcji stanu zapalnego w PVAT. Zmiany metabolizmu w PVAT wpływają z kolei na komórki naczyń powodując aktywację eNOS i zwiększenie angiogenezy w komórkach śródbłonna, podczas gdy w komórkach mięśni gładkich naczyń dochodzi do ograniczenia zdolności tych komórek do skurczu.

Badania przedstawione w pracy doktorskiej oceniam jako bardzo ważne w kontekście poznawania mechanizmów zaburzeń związanych z otyłością, szczególnie tych związanych z układem sercowo-naczyniowym. Część wykazanych w badaniach efektów spowodowanych wyciszeniem SCD1 wydaje się korzystna, podczas gdy inne mogą raczej pogarszać przebieg choroby. Niemniej jednak, dzięki bardzo obszernym i szczegółowym badaniom mechanizmów zmian związanych z wyciszeniem SCD1 w PVAT, praca ta otwiera nowe pole do poszukiwań celów terapeutycznych, które mogą pozwolić zapobiegać lub leczyć powikłania otyłości. Moja ocena pracy jest jednoznacznie pozytywna, jednakże, mam pewne uwagi, między innymi do metodyki pracy jak i interpretacji wyników. Uwagi te wymieniam poniżej i proszę doktoranta o ustosunkowanie się do najważniejszych z nich w czasie obrony pracy doktorskiej.

1. Uwagi do wstępu: Str. 23 Napisano, że lipogeneza de novo jest kosztowna energetycznie ponieważ polega na utlenieniu glukozy w celu wytworzenia acetylo-CoA. To stwierdzenie jest nieprawidłowe, ponieważ acetylo-CoA jest dopiero substratem do syntezy lipidów, a jego wytworzenie z glukozy ma dodatni bilans energetyczny. Dalej na stronie 24 napisano że, w reakcji glikolizy powstaje glicerolo-3 fosforan. Ten metabolit nie powstaje w procesie glikolizy, jego prekursorem jest metabolit glikolizy – fosforan dihydroksyacetonu. Na rycinie 5 zaznaczono transport elektronów na kompleksy III i IV łańcucha oddechowego bezpośrednio z NADH, podczas gdy kofaktor ten przekazuje elektrony na kompleks I.
2. Str. 44. Opis modelu zwierzęcego jest niepełny. Nie podano metody eutanazji zwierząt. Nie podano pełnego składu kwasów tłuszczowych w stosowanej paszy dla zwierząt (jedynie zawartość 16:1 i 18:1). Dokładny profil kwasów tłuszczowych w paszy można określić metodą GC/MS, która była stosowana przez doktoranta. Nie podano jakiego antykoagulantu użyto do uzyskania osocza krwi. Powyższe informacje są ważne ponieważ mogą mieć wpływ na uzyskane wyniki.
3. W pracy nie wytłumaczono dlaczego adipocyty uzyskiwano z TPVAT a nie z APVAT. Wyniki pracy wskazują na pewne różnice pomiędzy tymi skupiskami PVAT, dlatego wpływ cząsteczek wydzielanych przez adipocyty z tych dwóch skupisk na komórki naczyń może się różnić.

4. Dlaczego do doświadczeń nad wpływem cząsteczek wydzielanych przez mysie adipocyty wybrano linie komórek ludzkich (śródbłonek) i szczurzych (mięśnie gładkie), a nie linie komórek mysich? Białka wydzielane przez adipocyty (adipokiny, cytokiny) mogą się różnić między gatunkami i receptory w komórkach ludzkich lub szczurzych niekoniecznie muszą reagować z białkami mysimi.
5. Dlaczego w analizie GC/MS wybrano kwas pentadekanowy jako standard wewnętrzny? Ten kwas tłuszczowy jest obecny w organizmie myszy a dieta wysokotłuszczowa może wpływać na jego zawartość (<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.106135>), podczas gdy standard wewnętrzny nie powinien naturalnie występować w badanym materiale, gdyż jego obecność może zaburzać wyniki badań. Ponadto przy identyfikacji kwasów tłuszczowych warto zastosować wzorce tych metabolitów, które są komercyjnie dostępne w zestawach obejmujących najczęściej występujące związki z tej grupy.
6. W opisie analiz statystycznych napisano, że użyto testów ANOVA i post-hoc Tukey'a oraz t-test w przypadku porównania 2 grup. Są to testy dla danych o rozkładzie normalnym. Czy wszystkie wyniki w pracy spełniały ten warunek i czy nie było potrzeby użycia testów nieparametrycznych?
7. U myszy z wyciszonym genem kodującym SCD1 nie stwierdzono wzrostu masy ciała w wyniku karmienia HFD, pomimo że wzrósł stosunek masy VAT do masy ciała (Ryc. 10). Czy doktorant uważa że może to wynikać z obniżenia masy mięśniowej i czy taki parametr był badany?
8. Na rycinach 13 i 14 wyrażono masę PVAT w gramach i wyniki wskazują, że masa tej tkanki jest wyższa niż masa ciała myszki. Chyba doszło do pomyłki w jednostkach na osi y.
9. Str. 103. Na podstawie wyliczonych indeksów desaturacji autor wnioskuje, że aktywność SCD1 w PVAT zwiększa się w odpowiedzi na HFD. Wydaje mi się, że wniosek może być pochopny, ponieważ jak podano w metodyce pasza HFD zawiera dużą zawartość 18:1 i 16:1, co może wpływać na zawartość tych kwasów w PVAT i wzrost indeksów desaturacji może wynikać również z diety a nie tylko aktywności SCD1.
10. Zbadano poziom białek adiponektyny i IL-6 w adipocytach, jednakże nie zbadano poziomu tych adipokin w pożywce hodowlanej adipocytów którą traktowano komórki naczyń. Takie badanie można prosto wykonać przy pomocy testów ELISA. Warto by było także oznaczyć stężenia wisfatyny, rezystyny i leptyny w tych pożywkach, ponieważ jak napisano w dyskusji również te adipokiny mogą mieć wpływ na komórki naczyń.

Podsumowując, praca doktorska mgr Adriana Sówki stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i wnosi znaczący wkład w badania roli SCD1 w rozwoju sercowo-naczyniowych powikłań otyłości, a także wyznacza dalsze kierunki badań w tym temacie, które mogą doprowadzić do praktycznego zastosowania tej wiedzy w leczeniu pacjentów. Wstęp pracy potwierdza szeroką teoretyczną wiedzę doktoranta na temat metabolizmu

lipidów. Przedstawienie wyników i ich interpretacja wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Uważam, że przedstawiona 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 Adriana Sówki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ze względu na istotny problem stanowiący przedmiot rozprawy, bardzo duży zakres wykonanych badań z wykorzystaniem różnych zaawansowanych metod badawczych, oraz fakt, że część wyników zawartych w pracy doktorskiej została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie Journal of Cellular Physiology (wyd. Wiley, Impact Factor = 4,5, 1 kwartył IF), wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem

Tomaz Skedini