

Warszawa, dn. 07.09.2023

Prof. dr hab. Jadwiga Hamułka
Katedra Żywnienia Człowieka
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jarosława Oczkowicza

pt. „Wpływ resweratrolu i sprzężonych dienów kwasu linolowego na ekspresję wybranych genów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych w adipocytach 3T3-L1”.

wykonanej w Katedrze Żywnienia Człowieka i Dietetyki
na Wydziale Technologii Żywności,
Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
pod kierunkiem naukowym **prof. dr hab. inż. Anety Kopeć**
oraz **dr hab. inż. Anety Koronowicz, prof. URK**, jako promotora pomocniczego.

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Recenzja została wykonana na podstawie Uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie - pisma Przewodniczącego Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, dr hab. inż. Marcina Łukasiewicza, prof. URK (DTŻ 520.33.235.2023, z dnia 5-06-2023) oraz rozprawy doktorskiej mgr inż. Jarosława Oczkowicza.

Podstawą prawną niniejszej recenzji są: Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, art. 13.1 z późn. zm.) oraz Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669).

2. Uzasadnienie wyboru tematu rozprawy doktorskiej

Epidemia XXI w., jaką jest otyłość oraz niezakaźne choroby przewlekłe związane z nadmiernym gromadzeniem tkanki tłuszczowej w organizmie spowodowała poszukiwanie nowych rozwiązań profilaktycznych, w tym określenie / zbadanie wpływu związków o właściwościach bioaktywnych na metabolizm kwasów tłuszczowych. O ile wpływ poszczególnych związków bioaktywnych o właściwościach przeciwutleniających i przeciwzapalnych, takich jak np. polifenole, karotenoidy czy sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA) jest łatwiejszy do określenia i częściej badany, o tyle kombinacje tych związków nie dają tak jednoznacznych rezultatów i wymagają dalszych badań. Nadmierne gromadzenie tkanki tłuszczowej jest jednym z głównych przyczyn zwiększonego stresu oksydacyjnego, jak również nasilenia procesów zapalnych w organizmie, co z kolei prowadzi do większego zużycia antyoksydantów. Ponadto związki bioaktywne występujące w

żywności i/lub suplementach wpływają na ekspresję genów związanych, m.in. z metabolizmem lipidów, syntezą enzymów antyoksydacyjnych czy też cytokin prozapalnych, co dodatkowo wpływa na złożoność zachodzących procesów, zwłaszcza w organach żywych.

Stąd też, uważam że wybór problemu badawczego recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr Jarosława Oczkowicza, dotyczącego określenie wpływu resweratrolu, *cis-9,trans-11 CLA*, *trans10,cis-12 CLA* oraz różnych wariantów ich połączeń, na metabolizm kwasów tłuszczowych w komórkach adipocytów 3T3-L1, jak również uwzględnienie standardowych warunków hodowli oraz z indukowanym stresem oksydacyjnym jest celowy i bardzo aktualny, nie tylko ze względów poznawczych, ale również aplikacyjnych.

3. Ogólna charakterystyka i ocena formalna pracy

Układ rozprawy doktorskiej jest typowy dla prac o charakterze doświadczalnym. Dysertacja jest klasycznym opracowaniem przedstawionym w postaci maszynopisu, liczącym 262 strony łącznie ze bibliografią i aneksem. Składa się ona z 8 rozdziałów oraz wykazu stosowanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim. W pracy zamieszczono ogółem 24 tabele, w tym 21 tabel prezentujących wyniki badań własnych oraz 58 rycin, przy czym 21 rycin znajduje się w rozdziale dyskusja wyników i przedstawia m.in. proponowane mechanizm działania badanych substancji, oddzielnie oraz ich kombinacji, w adipocytach 3T3-L1 w warunkach standardowych oraz indukowanego stresu oksydacyjnego. Poszczególne rozdziały pracy są logicznie ułożone i stanowią kompletną całość. Pierwsza część pracy, teoretyczna zawierająca wstęp i przegląd literatury stanowi 13% całej pracy, natomiast część empiryczna, w tym część doświadczalna ze szczegółowo opisaną metodyką badań oraz opisem uzyskanych wyników stanowi 22% pracy. Obszerną część pracy zajmuje dyskusja wyników (109 str.), co w połączeniu z podsumowaniem i wnioskami stanowi ponad 40% całej pracy. Bibliografia recenzowanej rozprawy doktorskiej liczy 403 pozycje literaturowych (15% pracy). Proporcje poszczególnych części pracy są adekwatne do charakteru pracy, a uzyskane wyniki zinterpretowano i przedyskutowano prawidłowo, z zaproponowanymi mechanizmami działania poszczególnych związków zamieszczonych w dyskusji, co wpływa na jej objętość. Od strony formalnej praca nie budzi zastrzeżeń.

4. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Wybór problemu badawczego recenzowanej pracy doktorskiej mgr Jarosława Oczkowicza jest w pełni uzasadniony potrzebami społecznymi bowiem coraz częstsze występowanie otyłości oraz powiązanych z nią niezakaźnych chorób przewlekłych stanowi istotny problem zdrowia publicznego.

Tytuł pracy jest zgodny z celem, postawionymi hipotezami oraz przeprowadzonym eksperymentem badawczym.

Wstęp stanowi dobry asumpt do zaplanowanych badań, nakreślając w zarysie najważniejsze kwestie dotyczące tematyki pracy.

Przegląd literatury jest bardzo dobrym wprowadzeniem przedstawiając najważniejsze kwestie związane z zaprezentowanym problemem badawczym i postawionymi hipotezami. W rozdziale tym, Doktorant w sposób przejrzysty przedstawił tło naukowe podjętych badań, opisując w 11 podrozdziałach zagadnienia dotyczące ogólnej charakterystyki oraz gospodarki i przemian kwasów tłuszczowych w organizmie (3-podrozdziały); budowy, właściwości i występowania resweratrolu i sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA) oraz ich wpływu na biosyntezę, lipolizę, utlenianie oraz wpływ na masę ciała (7-podrozdziałów). Ostatni podrozdział w przeglądzie literatury dotyczy charakterystyki kluczowych genów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych, co stanowi dobry asumpt do dalszej części pracy i prowadzonych badań.

Podsumowując stwierdzam, iż Doktorant dokonując opisu dotychczasowego stanu wiedzy, dobrze uzasadnił założenia pracy oraz potrzebę podjęcia niniejszych badań, a drobne błędy stylistyczne i językowe (błędy w nazewnictwie) nie wpływają w istotny sposób na wartość pracy.

Sformułowanie problemu badawczego, hipotezy badawcze oraz cel pracy. Cel główny pracy oraz 2 cele cząstkowe został przedstawiony prawidłowo i łączą się w logiczną całość z wcześniejszym przeglądem literatury oraz pytaniami badawczymi, pozwalając na weryfikację postawionych hipotez.

Do zrealizowania celu głównego pracy sformułowano dwie hipotezy badawcze:
1. W standardowych warunkach hodowli adipocytów 3T3-L1, resweratrol w połączeniu z izomerami CLA *cis-9,trans-11* oraz/lub *trans-10,cis-12*, w sposób silniejszy niż w przypadku każdej z tych substancji zastosowanych osobno będą:

- hamowały ekspresję genów i białek zaangażowanych w biosyntezę kwasów tłuszczowych *de novo*;
- nasilały ekspresję genów i białek związanych z procesem β -oksydacji kwasów tłuszczowych
- nasilały transkrypcję genów zaangażowanych w proces lipolizy triacylogliceroli (TG).

2. Adipocyty 3T3-L1 hodowane w warunkach stresu oksydacyjnego oraz traktowane resweratrole w połączeniu z izomerami CLA *cis-9,trans-11* oraz/lub *trans-10,cis-12* będą wykazywały co najmniej taki sam efekt, jak w przypadku hodowli w warunkach standardowych, na ekspresję wybranych genów i białek związanych z procesami biosyntezy kwasów tłuszczowych *de novo*; β -oksydacji kwasów tłuszczowych oraz lipolizy TG (wyłącznie ekspresja genów).

Moją uwagę wzbudziły pytania badawcze, które moim zdaniem nie zostały poprawnie sformułowane i nie w pełni odzwierciedlają prowadzone badania:

„Czy połączenie resweratrolu z CLA spowoduje zwiększenie efektu wywoływanego przez te związki pojedynczo, tak jak ma to miejsce w przypadku połączenia resweratrolu z kwercetyną? „ - brak określenia o jaki efekt chodzi?

„Czy CLA, w połączeniu z resweratrolom będącym silnym przeciwutleniaczem, wykazuje wzmożone właściwości dotyczące metabolizmu kwasów tłuszczowych, a w szczególności ich biosyntezy i degradacji oraz czy właściwości te zostaną zachowane w warunkach stresu oksydacyjnego?” – nie jest niejasne o co chodzi, tym bardziej, że jeśli jest to w połączeniu to nie może być l. pojedynczej. Na czym mają polegać wzmożone właściwości?

„Na jakie szlaki metaboliczne związane z metabolizmem kwasów tłuszczowych wpływają mieszaniny tych związków i w jaki sposób różnią się one od efektu wywieranego przez każdy z nich oddzielnie?”

Szkoda tylko, że ani w streszczeniu ani w celu pracy oraz hipotezach badawczych nie podano, że badania były prowadzone na hodowlach komórkowych. Informacja ta pojawiła się dopiero w metodyce pracy. Można oczywiście to tłumaczyć, iż wynika to z samego sformułowania tematu, jednak moim zdaniem powinno to być dokładnie przedstawione na początku pracy, bowiem warunki prowadzonych badań i uzyskane wyniki są w dużej mierze efektem „medium” w jakim są one prowadzone.

Ponadto, biorąc pod uwagę złożoność pracy oraz zastosowane warianty analiz (różne kombinacje mieszanin badanych substancji), w celu lepszego zobrazowania prowadzonych badań zabrakło mi schematu badawczego uwzględniającego zarówno wybór dawek badanych związków, jak i ich kombinacji i warunków prowadzonych analiz.

Materiały i metody: Metodyka pracy została dobrze zaplanowana i szczegółowo opisana (10 stron maszynopisu), z dokładnym podaniem opisu prowadzonych badań, warunków hodowli komórkowych, różnicowania adipocytów, jak również badania cytotoksyczności oraz analiz ekspresji genów i białek, z podaniem warunków prowadzonych analiz (np. analiza RNA metodą Real Time-PCR), zastosowanych odczynników do analiz oraz użytego sprzętu, którym dysponuje katedra. Ostatnim podrozdziałem tej części pracy jest opis zastosowanych procedur statystycznych. Biorąc pod uwagę różne warianty prowadzonych badań, zarówno w kontekście stosowanych substancji bioaktywnych, warunków hodowli – standardowe oraz z wywołanym stresem oksydacyjnym, jak również czasu inkubacji nasuwa się pytanie dlaczego zastosowano tylko test t-Studenta pozwalający na porównanie wyników jedynie pomiędzy dwoma grupami?

Reasumując uważam, iż mimo drobnych uwag – o charakterze dyskusyjnym, zakres zaplanowanych i wykonanych analiz jest szeroki i dobrze przemyślany, co pozwoliło na zrealizowanie zarówno postawionego celu głównego oraz celów częściowych pracy, jak również zweryfikowania hipotez badawczych. Zastosowane procedury badawcze świadczą o bardzo dobrej znajomości warsztatu badawczego oraz dowodzą dobrego przygotowania do prowadzenia badań. Natomiast przedstawione uwagi, komentarze dotyczą bardziej części edytorskiej pracy i prezentacji wyników.

Biorąc natomiast pod uwagę, zakres przeprowadzonych badań mam pytanie czy praca była realizowana w ramach jakiegoś grantu/ projektu badawczego, a jeśli tak, to jaki był w nim udział Doktoranta?

Rozdział **Wyniki** składa się z dziewięciu podrozdziałów, przy czym ostatni – 9 podrozdział zawiera jedynie zestawienie fotografii z analizy Western Blot, bez ich szczegółowego omówienia. Co prawda Doktorant wskazał, że „zamieszczono fotografie membran wykorzystanych w obliczeniach densytometrycznych relatywnej zawartości białka (RQ), ich wyniki zostały przedstawione we wcześniejszych podrozdziałach” to jednak moim zdaniem jest to zbyt lakoniczna informacja. Podrozdziały tej części pracy dotyczącej wyników przeprowadzonych badań stanowią logiczny układ, a ich treści są konsekwencją zarówno celu pracy jak, postawionych hipotez badawczych oraz układu pracy przedstawionego w metodyce. Prezentację wyników rozpoczęto od wyboru optymalnego i nie wykazującego toksycznego działania stężenia badanych związków, tj. ustalenia dawek zarówno resweratrolu, jak i *cis-9,trans-11* CLA oraz *trans-10,cis-12* CLA, które następnie były uwzględniane w dalszych etapach eksperymentu. Następne 7 podrozdziałów dotyczą wyników analizy ekspresji genów i białek związanych z procesami biosyntezy kwasów tłuszczowych *de novo*, β -oksydacji kwasów tłuszczowych oraz lipolizy triacylogliceroli w adipocytach 3T3-L1 traktowanych oddzielnie resweratrolem; *cis-9,trans-11* CLA; *trans-10,cis-12* CLA, jak również poszczególnymi mieszaninami tych związków, co wynika z założonego celu pracy. Opis wyników na ogół koresponduje odpowiednio z danymi zamieszczonymi na rycinach (18 rycin) oraz w tabelach (20 tabel).

Z obowiązku recenzenta chciałabym jednak zwrócić uwagę na kilka kwestii dotyczących tej części pracy:

- 1) Opis uzyskanych wyników i ich prezentacja są czasami zbyt lakoniczne. Ponadto moja wątpliwość budzi zamieszczanie tabel bądź rycin przed ich omówieniem – kolejność prezentacji danych.
- 2) Ujednolicenia wymagają również podpisy pod rycinami i tabelami: małe – duże litery, np. SO– so; Sto -sto; błędne podpisy np. ryc. 25 (powinno być po 48 godz. jest po 24 godz. – taki sam podpis jak ryc. 24), czy też powołania na wyniki w tekście pracy, np. str. 59 powinno być ryc. 8 jest ryc. 3.
- 3) Biorąc pod uwagę wieloaspektowość/ złożoność warunków prowadzonych analiz, przy opracowaniu statystycznym uzyskanych wyników proponowałabym zastosowanie analiz/ testów statystycznych uwzględniających kilka czynników równocześnie, co jak pisałam wcześniej pozwoliłoby na wykazanie różnic nie tylko pomiędzy poszczególnymi dwoma parametrami ale również wybór warunków najbardziej optymalnego działania badanych związków oraz/lub ich mieszanin.

Przedstawiona przez Doktoranta **Dyskusja** jest obszerną częścią pracy (109 stron maszynopisu), która została podzielona na 7 podrozdziałów zgodnych z zaprezentowanymi wcześniej wynikami badań własnych. Biorąc pod uwagę, że dyskusja jako jeden z ważniejszych rozdziałów dysertacji, polega nie tylko na porównaniu wyników własnych z wynikami innych autorów, ale przede wszystkim na wskazaniu przyczyn stwierdzonych zależności i zaobserwowanych zjawisk uważam, że jest ona dobrze napisaną i wartościową częścią recenzowanej pracy. Dyskusja wyników nawiązuje do wyników opisanych w

rozdziale wcześniejszym ale również zawiera wyniki własne – zdjęcia (ryc. np. 31, 34, 37), co nie jest zjawiskiem powszechnie stosowanym, ale biorąc pod uwagę charakter pracy dobrze korespondują z prowadzoną dyskusją wyników własnych. Doktorant rzetelnie i umiejętnie konfrontuje własne osiągnięcia i obserwacje z wynikami prac innych autorów w odniesieniu do postawionych hipotez badawczych, starając się określić stopień ich weryfikacji. Należy podkreślić, że Doktorant wykazał się dobrą znajomością stanu wiedzy w zakresie rozwiązywanego problemu badawczego. Ma On jednak świadomość ograniczeń prowadzonych analiz wskazując na konieczność ich kontynuacji i potwierdzenia, co jest również cenne w pracy badawczej.

Dodatkowym atutem pracy i jednocześnie godnym podkreślenia faktem jest przedstawienie na podstawie literatury przedmiotu i uzyskanych w niniejszej pracy wyników, proponowanych mechanizmów działania badanych związków tj. resweratrolu, jak i *cis-9,trans-11* CLA oraz *trans-10,cis-12* CLA oddzielnie lub ich mieszanin w adipocytach 3T3-L1 w warunkach standardowych (STD) oraz w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego (SO). Wykorzystanie do tego celu oprogramowania BioRender.com sprawia, iż są one przejrzyste i czytelne, jednocześnie dobrze prezentując możliwości uzyskanych wyników badań również w kontekście przeciwdziałania insulinooporności związanej ze stresem oksydacyjnym.

Przygotowaną rozprawę doktorską kończy rozdział **Podsumowanie i wnioski**. W podsumowaniu Doktorant odniósł się do postawionych przez siebie hipotez badawczych. Stwierdził On, że uzyskane wyniki pozwalają na częściowe potwierdzenie hipotez, co zostało przedstawione w sześciu stwierdzeniach. Na podkreślenie zasługuje zbiorcza tabela nr 24 (str. 208) przedstawiająca zestawienie prawdopodobnego wpływu badanych substancji tj. resweratrolu oraz *cis-9,trans-11* CLA i *trans-10,cis-12* CLA oraz ich mieszanin na proces biosyntezy KT *de novo*, lipolizy TG i β -oksydacji w adipocytach w warunkach eksperymentalnych. Pokazuje to dobre zestawienie uzyskanych danych z kierunkami zmian (wpływu) badanych substancji i/lub ich mieszanin. Uwaga moja dotyczy jednak kolejności przedstawionych procesów – innej niż w całej pracy oraz braku objaśnień skrótów i kierunków zmian pod tabelą.

Podsumowanie kończy wniosek ogólny, w którym wykazano, że zastosowane mieszaniny resweratrolu z *trans-10,cis-12* CLA oraz resweratrolu z *cis-9,trans-11* CLA i z *trans-10,cis-12* CLA znacznie silniej niż poszczególne składniki tych mieszanin wpływały na zmiany ekspresji genów związanych z procesami biosyntezy, lipolizy i β -oksydacji kwasów tłuszczowych prawdopodobnie skutkujących przesunięciem równowagi metabolizmu kwasów tłuszczowych w adipocytach 3T3-L1 w kierunku lipolizy i β -oksydacji poprzez osłabienie procesu biosyntezy kwasów tłuszczowych.

Tak jak słusznie podkreśla Doktorant, istnieje konieczność kontynuacji tego typu badań głównie z powodu ich nowości i złożoności warunków wymagającej potwierdzenia w odniesieniu do zmian w ekspresji genów, również na poziomie białek i ich regulacji.

Stąd też, moje pytanie, jakie nowe warunki zaproponowałby Doktorant w przyszłych, ewentualnych badaniach i czy widzi Pan jakieś słabe strony badania własnego?

Bibliografia: w pracy wykorzystano, aż 403 pozycje literaturowe. Znakomitą większość tych publikacji stanowią artykuły w języku angielskim, których zakres czasowy nie przekracza ostatnich dwudziestu lat. W większości są to oryginalne prace twórcze. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant zacytował zarówno prace pochodzące sprzed wielu lat (1951 - poz. 171) oraz najnowsze (2022 r). Uważam, że dobór piśmiennictwa jest trafny i wskazuje na rozległą wiedzę Doktoranta w zakresie zagadnień poruszanych w rozprawie.

Jak wspomniałam wcześniej, oceniana dysertacja wykonana jest starannie i została na ogół poprawnie napisana pod względem językowym i merytorycznym, niemniej jednak z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kilka kwestii, które zauważyłam podczas czytania /studiowania pracy:

- konieczność ujednoczenia używanych skrótów (np. so – SO; sto – STO) oraz zwrócenie uwagi na odpowiedni opis tabel i rycin.
- nieliczne błędy literowe i stylistyczne (np. można spekulować...; kwasy tłuszczowe są związkami bogatymi w energię...).
- opis fotografii w ankiecie (identyczne podpisy – bez zwrócenia uwagi, że prawdopodobnie kolejne zdjęcia są w większym przybliżeniu – jakim?)
- drobne nieścisłości w spisie piśmiennictwa – nazwy czasopism (raz z małych liter raz z dużych, kursywa itp.), niepoprawne zapisy, np. poz. 56-58 Chen i wsp., 2012 - bez liter a, b, c, przy cytowaniu w tekście nie wiadomo o którą pracę chodzi.

Odnosząc się do przeprowadzonych przez Doktoranta badań i bardzo ciekawych wyników własnych, podczas publicznej obrony pracy doktorskiej prosiłabym o ustosunkowanie się do poniższych kwestii:

Co Doktorant uznaje za swoje nowatorskie osiągnięcie naukowe oraz czy i jak zamierza to wykorzystać w dalszej pracy?

Czy zaprezentowany układ badawczy można wykorzystać do opracowania zaleceń dietetycznych dla ludzi – również w kontekście stosowanych/dostępnych na rynku suplementów– diety?

5. Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowanie


Z powyższych danych oraz analizy przedłożonej dysertacji wynika, że mgr Jarosław Oczkowicz uzyskał efekty kształcenia przewidziane wg Polskich Ram Kwalifikacji dla ósmego (doktoranckiego) poziomu kształcenia, tj. posiada umiejętność opracowania koncepcji badań, zdolność do planowania i wykonywania eksperymentów badawczych, a także opracowywania wyników i konfrontowania ich z wynikami innych badaczy. Przedstawione

uwagi i sugestie mają charakter dyskusji, które mogą być w przyszłości wykorzystane przy przygotowywaniu publikacji naukowych lub planowania dalszych badań.

Wniosek końcowy

Reasumując uważam, iż przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Jarosława Oczkowicza pt. „Wpływ resweratrolu i sprzężonych dienów kwasu linolowego na ekspresję wybranych genów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych w adipocytach 3T3-L1” zrealizowanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. inż. Anety Kopeć oraz dr hab. inż. Anety Koronowicz, prof. URK, jako promotora pomocniczego spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r, o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 593 z późn. Zm.) oraz Przepisach wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dn. 3 lipca 2018 (Dz.U. z 2018, poz. 1669). Doktorant wykazał się dobrą znajomością warsztatu badawczego oraz umiejętnością prowadzenia badań i prezentacji wyników.

W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Wydziału Technologii Żywności, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr Jarosława Oczkowicza do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



/ Prof. dr hab. Jadwiga Hamulka /