

Dr hab. Adam Jurgoński, prof. IRZiBŻ PAN

Olsztyn, dnia 4.11.2024

Zespół Biologicznych Funkcji Żywności

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności

Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

a.jurgonski@pan.olsztyn.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Eweliny Żuk

pt. „Ocena wpływu fitoestrogenów sojowych na regulację endogennej syntezy choline i gromadzenia lipidów w wątrobie” wykonanej w Katedrze Żywienia Człowieka i Dietetyki Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Agaty Chmurzyńskiej

Niniejszą recenzję wykonano w odpowiedzi na Uchwałę Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 3 października 2024 r. oraz na podstawie przepisów Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, zwanej dalej Ustawą (Dz.U. z 2020 r., poz. 85 z późn. zm.). Recenzję sporządzono w oparciu o otrzymaną około 15.10.2024 r. rozprawę doktorską niniejszej kandydatki do stopnia doktora zwanej dalej Kandydatką.

Podstawowe informacje o Kandydatce

Kandydatka do stopnia doktora w 2018 roku uzyskała tytuł magistra dietetyki na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, po czym bezpośrednio zakwalifikowała się na studia doktoranckie na tym samym wydziale. Z załączonej do rozprawy dokumentacji wynika, że nie ubiegała się, jak dotąd, o nadanie stopnia doktora. Uwzględniając nieco ponad roczną przerwę jest także od 2017 roku zaangażowana w realizację projektów badawczych na swoim macierzystym wydziale, w pierwszej jako pracownik techniczny (lata 2017–2018), a następnie jako kierownik własnego projektu badawczego (rok 2019–obecnie). Projekt, którym do chwili obecnej kieruje, jest ściśle związany z tematyką niniejszej rozprawy doktorskiej i został przyznany w

ramach konkursu PRELUDIUM. Od końca 2020 roku Kandydatka pracuje ponadto na stanowisku młodszego specjalisty/lidera strefy doświadczalnej w Zwierzętarń Wielkopolskiego Centrum Zaawansowanych Technologii, a z początkiem 2022 roku została zatrudniona na stanowisku technicznym w kolejnym grantie badawczym NCN (jednostka realizująca: Instytut Chemii Bioorganicznej PAN). Kandydatka, jak na relatywnie wczesny etap swojej kariery, posiada istotny dorobek naukowy, w tym 5 publikacji w recenzowanych czasopismach, w większości o zasięgu międzynarodowym (4 pozycje), oraz w sumie 9 komunikatów na krajowych i międzynarodowych konferencjach. W dwóch recenzowanych publikacjach jest pierwszym autorem.

Wybór i znaczenie tematu

Nadmierne gromadzenie lipidów w wątrobie może prowadzić do rozwoju tzw. stłuszczeniowej choroby wątroby, a następnie także do rozwoju marskości i raka tego narządu. Stłuszczenie wątroby jest najczęściej konsekwencją nieprawidłowego sposobu żywienia lub nadużywania alkoholu będącego dodatkowo wyszczególnioną przyczyną tej choroby. Szacuje się, że wśród dorosłych z nadwagą i otyłością stłuszczeniowa choroba wątroby dotyczy około połowy wszystkich przypadków występując czasami również u osób szczupłych, u których diagnozowane są inne składowe zespoły metabolicznego (m.in. dyslipidemia, nietolerancja glukozy, nadciśnienie). Jedyną dostępną metodą leczenia stłuszczeniowej choroby wątroby jest zmiana stylu życia związana z dietą i utratą masy ciała, którą w najcięższych sytuacjach łączy się z operacjami bariatrycznymi. Trwają także intensywne badania nad potencjalnymi lekami, głównie ligandami różnego rodzaju receptorów jądrowych (PPARs, FXR lub THR- β), które mogą skutecznie zwalczać tę chorobę.

Jednym ze specyficznych czynników żywieniowych mogących prowadzić do stłuszczenia wątroby jest niedobór choline (kationu (2-hydroksyetylo)trimetyloamoniowego), która w postaci fosfatydylocholine warunkuje wątrobowe formowanie lipoprotein o bardzo małej gęstości i w ten sposób uwalnianie lipidów do krwi. Niewielkie ilości choline mogą być syntetyzowane w wątrobie ludzi i innych ssaków z udziałem metioniny w szlaku metabolicznym zawierającym odpowiednią do tego celu metylotransferazę (fosfatydyloetanolaminy) kodowaną przez gen *PEN1*, którego ekspresja jest stymulowana przez estrogeny. Ilości endogennie syntetyzowanej choline są jednak niewystarczające i muszą być uzupełniane poprzez jej spożycie wraz z dietą, co nie zawsze jest możliwe, szczególnie u osób preferujących żywność pochodzenia roślinnego. Na tym tle podjęte przez mgr Ewelinę Żuk oryginalne badania dotyczące oceny wpływu fitoestrogenów sojowych, mogących naśladować działanie estrogenów w organizmie, na regulację endogennej syntezy choline i gromadzenie lipidów w wątrobie są bardzo interesujące i w pełni uzasadnione.

Formalna ocena rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa to licząca 124 strony monografia naukowa zawierająca wszystkie niezbędne w tego typu opracowaniach rozdziały, we właściwej kolejności i proporcjach, w tym dwustronicowe streszczenia w języku polskim i angielskim (zgodnie z art. 13, ust. 6 Ustawy). Tytuł rozprawy jest zwięzły i zgodny z treścią, a jej układ ma charakter logiczny, przejrzysty i zwyczajowo przyjęty dla tego typu opracowań naukowych, zawierający dodatkowo spisy w sumie 6 tabel i 29 rycin oraz wykaz skrótów. W 21-stronicowym piśmiennictwie zamieszczono 207 pozycji, głównie anglojęzycznych, spośród których nieco powyżej 60% zostało opublikowanych na przestrzeni ostatnich 14 lat. Rozprawa napisana jest w zdecydowanej większości starannie oraz poprawnie pod względem językowym, dostrzegalny jest przy tym swego rodzaju talent do pisania opracowań naukowych. Drobne uwagi redakcyjne zamieszczam do wiadomości w nawiasach (str. 19: literówka w zdaniu „Stosunkowo wysokie pobranie choliny w z dietą stwierdzono u zdrowych mężczyzn w Polsce...”; str. 20: zbędne powtórzenie w zdaniu „Poza wyżej wymienionymi wyżej czynnikami wykazano, że...”; str. 22: zbędne powtórzenie w zdaniu „Blusztajn i Wurtman już w 1983 roku spisali, że dostępność choliny i acetylo-CoA wpływa acetylo-CoA na aktywność acetylotransferazy cholinowej...”; str. 23: zbędny przecinek w zdaniu „Szlak PEMT, rozpatruje się również w kontekście endogennej syntezy choliny...”; str. 40: literówka w zdaniu „Dużą rolę w całym procesie odgrywa mikrobiota jelitowa...”; str. 101: literówka w zdaniu „...a także w niższej zdolności do wiązania z receptorami estrogenowymi niż estrogeny endogenne”; ryc. 4: powinno być „stado niekrewniacze...” zamiast „szczury szczepu...”; nazwa rozdziału 4.3: powinno być „Procedura pobrania próbek krwi i narządów”, a nie „Procedura pobrania próbek krwi i tkanek”, ponieważ termin tkanka jest niemającym odzwierciedlenia w merytoryce żargonem laboratoryjnym; nazwa rozdziału 4.5: wskazana nazwa to „Analiza biochemiczna krwi”, a nie „Analiza stężenia wybranych parametrów biochemicznych”, ponieważ w tym kontekście analizuje się materiał biologiczny, a stężenie się oznacza).

Merytoryczna ocena rozprawy

Kandydatka do stopnia doktora rozpoczyna rozprawę krótkim wstępem, w którym jasno i jednoznacznie uzasadnia potrzebę podjęcia badań własnych, przy czym początkowo nieco zaskakujący jest brak jakichkolwiek odnośników do literatury w tym rozdziale. Niemniej jednak wszystkie niezbędne informacje należyte przedstawia i rozwija w rozdziale drugim dotyczącym przeglądu dotychczasowego stanu wiedzy, w którym m.in. charakteryzuje pod względem chemicznym i żywieniowym cholinę. Zaczyna przy tym od krótkiego, aczkolwiek interesującego i dobrze wprowadzającego w tematykę rysu historycznego dotyczącego procesu odkrycia choliny, co nie jest często spotykanym zwyczajem w obecnie przygotowywanych monografiach naukowych. W sposób przejrzysty i schematyczny przedstawia także główne szlaki metabolizmu choliny. Następnie przybliża procesy związane z gromadzeniem lipidów w wątrobie, definiuje przy tym stłuszczeniową

chorobę wątroby i przedstawia patogenezę tego schorzenia. Podając definicję choroby decyduje się jednak na wychodzącą z użycia nazwę „niealkoholowe stłuszczenie wątroby” (z ang. NAFLD), która niedawno zastąpiona została terminem „stłuszczeniowa choroba wątroby związana z zaburzeniami metabolicznymi” (z ang. MAFLD lub MASLD), co ma wynikać z konieczności podkreślenia jej zasadniczej przyczyny. Przedstawia ponadto kluczowy dla badań własnych mechanizm stłuszczenia wątroby z niedoboru choliny, opisując także fitoestrogeny z punktu widzenia ich budowy chemicznej, znaczenia żywieniowego i aktywności biologicznej, w tym szczególnie ważnej w kontekście badań własnych aktywności estrogenowej tych związków. Wskazuje dalej na pozytywny związek pomiędzy spożyciem soi i preparatów z niej pozyskiwanych, a funkcjonowaniem wątroby i hamowaniem jej stłuszczenia. Przegląd stanu wiedzy jest napisany w sposób klarowny, na podstawie odpowiednio dobranej literatury i opatrzonej kilkoma rycinami, co ułatwia rozeznanie się w tematyce badań. W kontekście istotnych dla badań składników pokarmowych jedyne, co mogłoby dodatkowo zostać zamieszczone to ich wzory strukturalne.

W rozdziale trzecim podsumowano krótko najważniejsze informacje z wcześniejszych rozdziałów i przedstawiono główny cel badań, który brzmi następująco: „...ocena wpływu izoflawonów sojowych na proces endogennej syntezy fosfatydylocholiny poprzez wpływ na ekspresję genu *Pemt*, jak również określenie zależności między podażą izoflawonów sojowych a wybranymi procesami związanymi z gromadzeniem lipidów w wątrobie szczurów, zarówno w stanie niedoboru choliny w diecie, jak i prawidłowej jej podaży”. Kandydatka wymienia także 4 cele szczegółowe, które bezpośrednio nawiązują do celu głównego i odnoszą się do izoflawonów poddanych badaniom, genu *Pemt* i innych genów warunkujących metabolizm lipidów (*Pparg*, *Srebf1*, *Fasn*) oraz markerów metabolizmu lipidów i funkcjonowania wątroby. Stawia ponadto 3 hipotezy badawcze, które są logicznym następstwem dokonanego przeglądu literatury, bezpośrednio nawiązują do postawionego celu badań i zakładają zmiany w ekspresji badanych genów i metabolizmie lipidów pod wpływem czynników żywieniowych (choliny i izoflawonów).

Aby zrealizować postawione cele i zweryfikować hipotezy badawcze Kandydatka przeprowadziła eksperyment żywieniowy na samcach szczurów Wistar (stado niekrewniacze), stosując półocyszczoną dietę zalecaną dla tego typu doświadczeń przez Amerykański Instytut Żywności (dieta AIN-93M). Eksperyment polegał na w sumie 12-tygodniowym żywieniu zwierząt, w pierwszej dietą z rekomendowaną zawartością choliny lub całkowicie pozbawioną tego składnika (pierwszy czterotygodniowy etap), a następnie obydwoma wariantami tej diety uzupełnionymi najważniejszymi izoflawonami sojowymi (genisteiną lub daidzeiną) lub ekstraktem izoflawonów sojowych w ilościach odpowiednio 0,5 lub 2 g/kg diety (drugi ośmiotygodniowy etap). Brak choliny lub też obecność izoflawonów była regulowana zawartością sacharozy w diecie. Szczegółowo

opisana metodyka eksperymentu i analizy materiału biologicznego nie budzi wątpliwości, poza drobnymi wyjątkami. Kandydatka zamieszcza m.in. zadeklarowany przez producenta skład ekstraktu izoflawonów sojowych, nie precyzuje jednak czystości chemicznej zastosowanych izoflawonów, które również były pochodzenia handlowego. Przy ustalaniu ilości izoflawonów w diecie informuje ponadto, że zostały one określone na podstawie przeglądu literatury w taki sposób, aby ich codzienne pobranie przez szczury odpowiadało analogicznemu i przeciętnemu spożyciu przez ludzi. Nie podaje jednak konkretnych danych liczbowych na temat tego spożycia, ani przykładowego sposobu ich przeliczania na model zwierzęcy, dlatego proszę o bardziej szczegółowe omówienie tej kwestii podczas publicznej obrony. W ramach niniejszej rozprawy zastosowano odpowiednio zaawansowane metody analizy materiału biologicznego, m.in. z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, techniki *western blot* i testów immunoenzymatycznych. Dokonana dzięki tym metodom analiza ekspresji genów związanych z metabolizmem lipidów (*Pemt*, *Pparg*, *Srebfl*, *Fasn*) zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji jest warta wyróżnienia i wskazuje na wysokie standardy dochowywane przez Kandydatkę i jednostkę naukową, w której prowadzono badania.

Uzyskane wyniki przedstawiono z reguły w sposób czytelny i opatrzony niezbędnymi przypisami na wykresach (słupkowych lub typu ramka-wąsy), a sporadycznie także w tabelach. Zdecydowano się przy tym na zastosowanie statystyki uwzględniającej głównie jednoczynnikową analizę wariancji i jej nieparametryczną alternatywę (test Kruskala-Wallisa), a także odpowiednie testy *post hoc* wskazujące na istotne różnice pomiędzy poszczególnymi grupami eksperymentalnymi. Patrząc jednak zgrubnie na średnie i odchylenia w poszczególnych grupach odnoszę wrażenie, że korzystniejszym rozwiązaniem w zaproponowanym układzie eksperymentalnym mogłoby być zastosowanie dwuczynnikowej analizy wariancji z obecnością choline w diecie, jako pierwszym czynnikiem, i rodzajem preparatów izoflawonów, jako drugim czynnikiem. Takie podejście znacznie zwiększyłoby próbę analizowaną w ramach poszczególnych czynników i w ten sposób możliwe, że uwidoczniłoby większą liczbę istotnych różnic, a także ewentualne interakcje pomiędzy proponowanymi czynnikami. Poza tym, dezorientujące są wyniki dot. spożycia diety w pierwszym etapie eksperymentu, które przedstawiono na rycinie 5 niezgodnie ze schematem zamieszczonym i opisanym w metodyce badań uwzględniającym jedynie dwie zbiorcze grupy badawcze, żywione dietą zawierającą lub pozbawioną choline (ryc. 4). Na przytaczanej rycinie wziętych jest jednak pod uwagę aż 8 grup eksperymentalnych analogicznie do drugiego etapu badań z uwzględnieniem izoflawonów. W dalszej części rozprawy Kandydatka dodatkowo sugeruje, że izoflawony sojowe mogły być obecne w diecie już na pierwszym etapie eksperymentu (str. 92), dlatego proszę o ustosunkowanie się do tych nieścisłości podczas publicznej obrony.

W 14-stronicowym rozdziale „Dyskusja” Kandydatka wykorzystuje swoją rozległą wiedzę z zakresu nauki o żywieniu wskazując na oryginalny charakter przeprowadzonych badań oraz dokonując ich dojrzałej i interesującej interpretacji na tle dostępnej literatury. Naukowa dojrzałość Kandydatki jest warta podkreślenia z uwagi na fakt, że większość postawionych hipotez została zweryfikowana w rozprawie negatywnie, co z pewnością przysporzyło dodatkowych trudności. W związku z tym Kandydatka analizuje możliwe przyczyny takiego stanu rzeczy wykazując się należyтым brakiem stronniczości, chociaż mam wrażenie, że w niektórych przypadkach nieco większa doza optymizmu w ocenie uzyskanych wyników by nie zaszkodziła. Np. na stronie 94 podaje, że cyt. „Szczury z grup CD charakteryzowały się prawidłową morfologią hepatocytów, natomiast zmiany zaobserwowane u zwierząt z grup CholDD miały charakter łagodny”, czego nie potwierdzają zdjęcia histologiczne, na których widoczne jest jednak znaczne nagromadzenie się lipidów w hepatocytach. Kandydatka dalej tłumaczy, że cyt. „...ze względu na rodzaj powstających zmian, tj. najczęściej mikropęcherzykowe zmiany tłuszczowe, nie dochodzi do uszkodzenia integralności struktury komórkowej” (str. 97). Tak czy owak samo nagromadzenie się tłuszczu interpretowałbym jako istotne zaburzenie w kontekście niniejszej tematyki badań, szczególnie jeśli zostałoby poparte zwiększoną zawartością tłuszczu w wątrobie. Ilościowego oznaczenia tłuszczu w wątrobie jednak nie wykonano, dlatego wskazuję ten element analityczny jako ważny do uzupełnienia na wypadek kontynuacji badań. Warto w tym kontekście podkreślić, że Kandydatka wyciąga szereg ważnych wniosków na przyszłość, np. sugeruje konieczność wyboru zwierząt genetycznie bardziej ujednoliconych (z chowu wsobnego) oraz wykonanie dodatkowych analiz na obecność estrogenów i metabolitów izoflawonów. Podczas publicznej obrony proszę natomiast o zaproponowanie bardziej skonkretyzowanych rozwiązań prowadzących do uzyskania modelu stłuszczenia wątroby o większej wyrazistości (jaki szczep wsobny? Zmiana czasu trwania eksperymentu? Może jakieś dodatkowe zmiany w diecie pozbawionej choliny?).

Na zakończenie rozprawy Kandydatka w sposób syntetyczny podsumowuje najważniejsze spostrzeżenia z badań własnych i właściwie formułuje 3 wnioski nawiązujące bezpośrednio do postawionego celu i hipotez badawczych, wykluczając przy tym wpływ izoflawonów sojowych na proces endogennej syntezy choliny. Wskazuje jednocześnie na potrzebę dalszych badań dotyczących roli izoflawonów sojowych w regulacji metabolizmu lipidów za pośrednictwem wybranych genów.

Podsumowanie

Reasumując stwierdzam, że mgr Ewelina Żuk w sposób z mechanistycznego punktu widzenia oryginalny i ciekawy dokonała oceny wpływu fitoestrogenów sojowych na regulację endogennej syntezy choliny i gromadzenia lipidów w wątrobie. Wykazała się przy tym ogólną wiedzą teoretyczną

w zakresie nauk o żywności i żywieniu, znacznym zaawansowaniem metodycznym i dużą dojrzałością naukową. Lektura rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Żuk jednoznacznie wskazuje, że potrafi ona prawidłowo postawić hipotezy badawcze, odpowiednio zaplanować i przeprowadzić eksperymenty żywieniowe na zwierzętach laboratoryjnych, a następnie zinterpretować uzyskane wyniki i wyciągnąć adekwatne wnioski. Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom (zgodnie z art. 187, ust. 1-2 Ustawy) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Wniosek o wyróżnienie

Zgłaszam wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy, która w sposób oryginalny i interesujący porusza niezwykle ważną ze zdrowotnego punktu widzenia kwestię roli czynników żywieniowych w zapobieganiu stłuszczeniu wątroby. Wniosek motywuję także faktem, że badania, pomimo negatywnej weryfikacji większości hipotez, zostały bardzo dobrze zaplanowane i uzasadnione oraz poparte kompleksową analizą ekspresji wybranych genów, warunkujących metabolizm lipidów w organizmie człowieka. Badania zostały ponadto zrealizowane w ramach pozyskanego przez Kandydatkę i jej opiekuna grantu badawczego, sfinansowanego przez NCN, co jest dodatkową przesłanką do wyróżnienia rozprawy.

Adam Jungowski