

Katowice 2023-08-31

**KATEDRA I KLINIKA ENDOKRYNOLOGII GINEKOLOGICZNEJ ŚLĄSKIEGO
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W KATOWICACH**

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Natalii Wawrzyniak

zatytułowanej

**Badanie wpływu wybranych czynników żywieniowych
i farmakologicznych na gospodarkę mineralną i metabolizm tkanki kostnej
w zwierzęcym modelu osteoporozy pomenopauzalnej**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk rolniczych
w dyscyplinie technologia żywności i żywienia

Osteoporoza to najbardziej rozpowszechniona choroba kości u osób w podeszłym wieku. Choroba ta charakteryzuje się zmniejszeniem masy kostnej i pogorszeniem mikroarchitektury tkanki kostnej, przy zachowanym stosunku składników mineralnych macierzy co prowadzi do osłabienia struktury kości i zwiększenia ryzyka złamań, nawet po niewielkim urazie lub bez urazu. Choroba ta ma charakter epidemiczny. Szacuje się, że osteoporoza dotyka ok. 200 milionów kobiet na całym świecie. Choruje na nią czterokrotnie więcej kobiet niż mężczyzn. Dlatego osteoporoza mieści się w głównym nurcie zainteresowań endokrynologii ginekologicznej. Notowany wzrost częstości złamań osteoporotycznych w krajach rozwiniętych zależy jedynie w części od powiększającej się populacji osób w podeszłym wieku. Wzrost ten może mieć też pewien związek z faktem słabnącej aktywności fizycznej kobiet i stale zmniejszającej się liczby porodów. Innymi znanymi przyczynami tego stanu rzeczy są: zmniejszenie ilości wapnia pokarmowego i nikotynizm. Jak wiadomo, kośćce składa się z dwóch typów kości: kości korowej budującej szkielet obwodowy i z kości beleczkowej - gąbczastej budującej szkielet osiowy tj. kręgosłup, miednicę i proksymalny odcinek kości udowej. Po menopauzie masa kości beleczkowej zmniejsza się o około 50%, a korowej o 30%. Spadek poziomu estrogenów nasila proces przebudowy kości, zaczyna dominować aktywność osteoklastów co prowadzi do resorpcji kości. Ponadto estrogeny mają istotny wpływ na metabolizm witaminy D oraz na wchłanianie jelitowe wapnia i jego eliminację przez nerki. Utrata masy kostnej rozpoczyna się u kobiet już podczas okresu perimenopauzalnego i na początku okresu pomenopauzalnego, gdy gwałtownie wzrasta poziom FSH i spada poziom estrogenów. Ta wczesna utrata masy kostnej szkieletu osiowego każe przypuszczać, że pomenopauzalny stan niedoboru estrogenów nie jest jedynym powodem osteoporozy. Innym bardzo istotnym czynnikiem może być zmniejszenie spożycia wapnia już w okresie premenopauzy. Wapń jest głównym składnikiem mineralnym kości, dlatego odpowiednia jego podaż jest ważnym czynnikiem w prewencji i terapii osteoporozy. Podaż wapnia u kobiet po menopauzie powinna wynosić 1200 mg dziennie. Wchłanianie wapnia spada z wiekiem i ma bezpośredni związek i obniżającym się poziomem aktywnej biologicznie witaminy D syntetyzowanej w skórze i nerkach. Uzupełnianie wapnia zmniejsza utratę masy kostnej i tym samym częstość złamań niskoenergetycznych. Estrogeny zwiększając poziom 1,25 dihydroksywitaminy D umożliwiają skuteczniejsze wykorzystanie wapnia. Niedobór wapnia w diecie stanowi problem na całym świecie. Opinie, czy suplementowanie wapnia może chronić przed osteoporozą pomanopauzalną są mocno zróżnicowane, co wynika prawdopodobnie z faktu, że wiele badań było przeprowadzanych w bardzo wczesnej fazie okresu pomenopauzalnego – gdzie jak wiadomo głównym



mechanizmem lawinowej utraty wapnia jest nagły hipoestrogenizm – hipergonadotropowy. Efekt ten dominował nad spodziewaną odpowiedzią na podaż wapnia. Ponad wszelką wątpliwość uzupełnianie wapnia w późniejszym okresie życia kobiety jest z wszech miar sensowne i wskazane. Skutecznym i łatwym sposobem na zwiększenie ilości wapnia w diecie jest zastosowanie żywności wzbogaconej w wapń. Jednym z takich innowacyjnych produktów jak wykazała Doktorantka jest dynia wzbogacona w wapń poprzez odwodnienie osmotyczne przy użyciu inulin. Ponadto dynia zawiera szereg związków bioaktywnych, które sprzyjają zwiększeniu gęstości mineralnej kości. Jednym z nich jest luteina- ksantofil występująca w tkankach roślin, która ma wpływ na masę mineralną kości, jednocześnie hamując ich resorpcję poprzez hamowanie tworzenia osteoklastów oraz zmniejszenie stanu zapalnego. Dynia zawiera też β -kryptoksantynę, która działa osteogennie poprzez wpływ na ekspresję genów białek biorących udział w tworzeniu kości. Oprócz wpływu na metabolizm kości, dynia wykazuje działanie hipoglikemiczne i kardioprotekcyjne, dlatego jej spożywanie jest zalecane osobom z nadciśnieniem, otyłością i cukrzycą. Zastosowanie z kolei inuliny przez Doktorantkę jako substancji osmotycznie czynnej w procesie wzbogacania dyni w wapń również może poprawiać zdrowie kości w wyniku zwiększenia wchłaniania wapnia i hamowania ekspresji czynników prozapalnych. Metabolizm wapnia jak wiadomo jest powiązany z gospodarką innych składników mineralnych, takich jak magnez i żelazo. Magnez jest zaangażowany w hydroksylację witaminy D do jej aktywnej formy ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$), przez co wpływa jak wiadomo na absorpcję wapnia, natomiast witamina D stymuluje wchłanianie magnezu. Magnez wpływa na metabolizm wapnia, zatem suplementacja tych dwóch składników mineralnych jest dodatnio skorelowana z BMD u kobiet po menopauzie. Jednocześnie wapń może też hamować wchłanianie żelaza, dlatego badając wpływ żywności wzbogaconej w wapń na organizm należy kontrolować również gospodarkę magnezu i żelaza.

Celem pracy Doktorantki było określenie wpływu wybranych czynników żywieniowych i farmakologicznych na gospodarkę mineralną i metabolizm tkanki kostnej w zwierzęcym modelu osteoporozy pomenopauzalnej. Model zwierzęcy Doktorantki stanowiło sto 12-miesięcznych szczurów (Szczur Wędrowny, *Rattus norvegicus*, stado niekrewniacze, Wistar). Badanie uzyskało zgodę Lokalnej Komisji Etycznej (nr 34/2019). Zwierzęta podzielono losowo na dziesięć grup po 10 szczurów. Na początku eksperymentu całkowita masa ciała szczurów nie różniła się między grupami. 90 szczurom usunięto jajniki (OVX), aby stworzyć szczurzy model osteoporozy pomenopauzalnej. Po 7 dniach rekonwalescencji rozpoczęto interwencję żywieniową trwającą 12 tygodni. Grupa kontrolna (C) i jedna z grup z

wyciętymi jajnikami (OVX_C) otrzymywały standardową dietę (bez modyfikacji), grupa DEF otrzymywała dietę z deficytem wapnia, grupa CaC_B otrzymywała dietę standardową z dodatkiem alendronianu (lek z grupy bifosfonianów), grupa P_CaC dostawała dietę z dynią wzbogaconą w węglan wapnia, grupa P_CaC_B otrzymywała dietę z alendronianem i dynią wzbogaconą w węglan wapnia, grupa CaL była karmiona standardową dietą z mleczanem wapnia, grupa P_CaL była karmiona dynią wzbogaconą w mleczan wapnia, grupie CaL_B podawano alendronian i mleczan wapnia, a grupie P_CaL_B - alendronian i dynię wzbogaconą mleczanem wapnia. Wszystkie diety (z wyjątkiem DEF) zapewniały taką samą ilość wapnia jak w diecie standardowej (0,5%). W dietach z bifosfonianami ilość alendronianu korygowano co tydzień, aby utrzymać dawkę 3 mg na kilogram masy ciała. Zwierzętom pozwolono jeść i pić wodę dejonizowaną ad libitum przez cały czas trwania doświadczenia. Szczury w każdej grupie ważono co tydzień i codziennie rejestrowano spożycie pokarmu. Po zakończeniu doświadczenia przeprowadzono analizę składu ciała wszystkich zwierząt na analizatorze składu ciała Bruker LF90II. Następnie szczurom po dekapitacji w każdej grupie pobierano krew i tkanki do dalszych badań. W surowicy oznaczono stężenie N-końcowego propeptydu prokolagenu typu I i osteokalcyny (OC) za pomocą testu immunoenzymatycznego Elisa. Przeprowadzono analizę morfologiczną krwi pełnej. Stężenie wapnia w surowicy oraz zawartość wapnia, magnezu i żelaza w tkankach zostały określone metodą spektrofotometrii atomowo-absorpcyjnej po uprzedniej mineralizacji.

Temat badawczy przedstawiony przez Doktorantkę jest sumą ważnych badań poszerzających naszą wiedzę na ten temat leczenia osteoporozy i gospodarki wapniowej który jest powiązany z gospodarką innych składników mineralnych, takich jak magnez i żelazo. Cenna jest każda inicjatywa badawcza jak ta, którą podjęła Doktorantka, bowiem poszerza naszą wiedzę na temat tak czynników żywieniowych, jak i farmakologicznych na gospodarkę mineralną i metabolizm tkanki kostnej. Ponadto Doktorantka wyznaczyła sobie cele szczegółowe: gdzie oceniała wpływu dyni wzbogaconej w węglan i mleczan wapnia na gospodarkę wapnia i metabolizm tkanki kostnej u szczurów po owariektomii, badała działania dyni wzbogaconej w wapń oraz soli wapnia w połączeniu z alendronianem na gospodarkę wapnia i zdrowie kości, u szczurów z usuniętymi jajnikami i określiła wpływu dyni wzbogaconej w wapń na stężenie magnezu i żelaza w organizmie szczurów po owariektomii. Bardzo interesujący jest wykaz publikacji włączonych do cyklu prac autorki. Warto zauważyć, że prace te zostały wcześniej ocenione przez zespoły redakcyjne i niezależnych recenzentów. W pracy **“Nutritional and health factors affecting the bioavailability of**

calcium: a narrative review” Doktorantka dokonała przeglądu aktualnych doniesień naukowych dotyczących wpływu czynników żywieniowych i zdrowotnych na biodostępność wapnia. Praca ta stanowi szczegółowy przegląd piśmiennictwa i jest odzwierciedleniem aktualnego stanu wiedzy związanego z powyższym zagadnieniem. Artykuł podkreśla istotność unikania czynników ograniczających biodostępność wapnia jak i zwiększania czynników, które sprzyjają wchłanianiu tego składnika mineralnego. Wniosek ten stał się zapewne podstawą do przeprowadzenia dalszych badań składających się na niniejszą rozprawę doktorską.

W pracy **“Effects of calcium lactate-enriched pumpkin on calcium status in ovariectomized rats”** Doktorantka oceniała wpływ soli organicznej (mleczanu wapnia) na metabolizm wapnia w zwierzęcym modelu osteoporozy pomenopauzalnej, gdzie zastosowała dietę standardową z dodatkiem mleczanu wapnia, dynię wzbogaconą mleczanem wapnia oraz kombinację wzbogaconej dyni z alendronianem i mleczanu wapnia z alendronianem. W pracy określiła wpływ diet modyfikowanych na zawartość wapnia w surowicy i tkankach oraz stężenie PTH, PINP, OC i ES w surowicy u szczurów po owariektomii.

Celem kolejnej pracy doktorantki zatytułowanej **„Calcium carbonate enriched pumpkin affects calcium status in ovariectomized rats”** było zbadanie wpływu soli nieorganicznej wapnia (węglanu wapnia) na metabolizm wapnia w zwierzęcym modelu osteoporozy pomenopauzalnej. Podobnie jak w poprzedniej pracy, w karmieniu szczurów zastosowano wzbogaconą dynię, dietę standardową z alendronianem oraz połączenie wzbogaconej dyni z lekiem, z tym, że mleczan wapnia został zastąpiony węglanem wapnia. Węglan wapnia jest solą nieorganiczną najczęściej stosowaną w suplementach dla kobiet po menopauzie. W badaniu określono stężenie wapnia w surowicy i tkankach oraz oznaczono parametry metabolizmu wapnia, dokonano również analizy histopatologicznej kości udowych, gdzie określono liczbę komórek kości, stopień stłuszczenia szpiku oraz procentową zawartość kości. Dodatkowo w tkankach szczurów po owariektomii oznaczono również zawartość magnezu i żelaza.

Celem kolejnej pracy Doktorantki **„Effects of ovariectomy and calcium enriched pumpkin on magnesium status in rats”** było określenie wpływu dyni wzbogaconej w mleczan wapnia na zawartość magnezu w tkankach, natomiast w artykule **„Effect of pumpkin enriched with calcium lactate on iron status in an animal model of postmenopausal osteoporosis”** Doktorantka oceniała działanie dyni wzbogaconej w mleczan wapnia na stężenie żelaza w tkankach u szczurów po owariektomii.

W swojej pracy doktorskiej Autorka zdecydowała się na zaprezentowanie prac związanych z działaniem tylko jednej soli - mleczanu wapnia na gospodarkę magnezu i żelaza, gdyż wyniki wskazują na podobny wpływ obu soli (organicznej i nieorganicznej). Co jest słusznym założeniem i świadczy o dużej wiedzy i wyczuciu badawczym Doktorantki.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska liczy łącznie 34 strony i posiada układ typowy dla pracy doktorskiej złożonej z cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Do rozprawy dołączonych zostało pięć publikacji oraz oświadczenia współautorów z określeniem ich roli i udziału w publikacjach, z których dowiadujemy się o wiodącej roli Doktorantki zarówno w opracowaniu koncepcji badania, wykonania i interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptu prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Praca została podzielona na wykaz wspomnianych publikacji wraz z ich omówieniem, wykaz użytych skrótów, dalej została przedstawiona aktywność naukowa Doktorantki.

Autorka w omówieniu przedstawiła cele z podziałem na cel główny badań i cele szczegółowe pracy, które są jednoznacznie sformułowane, interesujące z praktycznego i naukowego punktu widzenia.

W rozdziale materiał i metody Doktorantka przedstawia metodologię wzbogacania tkanki dyni solą wapnia w procesie odwadniania osmotycznego przy pomocy inuliny oraz metodykę badań na zwierzętach.

Ważnym elementem tej pracy jest nowatorskość, która wynika przede wszystkim z zastosowania innowacyjnego produktu spożywczego jakim jest dynia wzbogacona w wapń. Po raz pierwszy zastosowano dynię wzbogaconą w mleczan, jak i węglan wapnia w eksperymencie z udziałem szczurów po owariektomii. Taki rodzaj żywności funkcjonalnej nie był dotychczas zastosowany w żadnym badaniu dotyczącym osteoporozy i metabolizmu wapnia, magnezu i żelaza. Ponadto, w celu oceny zdrowia kości zastosowano szczegółowe badania histopatologiczne oraz biochemiczne. Porównano również działanie wzbogaconej dyni z lekiem powszechnie stosowanym u kobiet z osteoporozą pomenopauzalną – alendronianem. Ponadto w niniejszej pracy działanie dyni wzbogaconej w wapń porównano też z działaniem soli wapnia stosowanymi oddzielnie. Badano interakcje wapnia z innymi pierwiastkami, co daje szerokie spojrzenie na korzystne i ewentualnie niekorzystne skutki działania wzbogaconej dyni, a to stanowi dobrą podstawę do rozpoczęcia ewentualnych badań klinicznych.

Dodatkowo w artykułach nienależących do cyklu pracy doktorskiej Doktorantka wykazała redukcyjny wpływ dyni wzbogaconej w mleczan wapnia na masę ciała szczurów po owariektomii, a także znacznie niższe stężenie leptyny w surowicy. Dalej wykazano, że dynia wzbogacona w mleczan wapnia sprzyja też obniżeniu stężenia aminotransferazy alaninowej i triacylogliceroli we krwi. Natomiast dodatek mleczanu wapnia do diety wykazuje działanie obniżające stężenie cyklooksyzgenazy pierwszej w surowicy u szczurów po owariektomii.

Na podkreślenie zasługuje fragment pracy o ograniczeniach w przeprowadzonych badaniach, co świadczy o dojrzałości Doktorantki jako badacza.

W liczącym kilka stron omówieniu cyklu publikacji Doktorantka analizuje wyniki swoich badań i konfrontuje je z danymi z piśmiennictwa. Dyskusja jest dojrzała, a Autorka korzysta w niej w sposób właściwy z danych z piśmiennictwa. Umiejętnie posługuje się w niej argumentami przemawiającymi za wagą swoich obserwacji. Krytycznie przedstawia ograniczenia własnej pracy. Powinna także w tym miejscu wyraźniej zaznaczyć nowatorskie aspekty swoich badań. Sposób omówienia wyników świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnej pracy naukowej.

Piśmiennictwo obejmujące 57 pozycji, głównie anglojęzycznych z ostatnich lat. Zostało ono poprawnie dobrane i umiejętnie wykorzystane w tekstach cyklu prac.

Doktorantka przedstawiła wnioski, które znakomicie odpowiadają założonym celom pracy i są one następujące: badanie na szczurach wykazało, że dynia wzbogacona w mleczan lub węglan wapnia zwiększa stężenie wapnia w kości udowej oraz poprawia metabolizm kości u szczurów po owariektomii, powoduje akumulację wapnia w nerkach szczurów. Dowodzi nadto, że alendronian w połączeniu ze wzbogaconą dynią sprzyja akumulacji wapnia i magnezu w nerkach szczurów po owariektomii i dalej dowiodła, iż taka dieta wpływa na stężenie magnezu i żelaza w kościach oraz tkankach szczurów po owariektomii, a sama owariektomia u szczurów powoduje zmniejszenie zawartości wapnia, magnezu i żelaza w ich tkankach.

Bardzo wysoko oceniam merytoryczną wartość tej rozprawy, szczególnie w zakresie zastosowania w terapii. Sformułowany wniosek praktyczny: który stanowi, że zastosowanie dyni wzbogaconej w wapń może działać korzystnie na gospodarkę wapnia i zdrowie kości u kobiet po menopauzie, choć efektem ubocznym tego innowacyjnego produktu, szczególnie w połączeniu z alendronianem może być gromadzenie się wapnia w nerkach jest bardzo innowacyjny, ale z całą pewnością mechanizm tego szkodliwego działania należy wyjaśnić w dalszych badaniach.

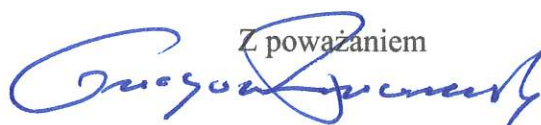
Nie zgłaszam żadnych zastrzeżeń merytorycznych ani formalnych do tekstu rozprawy, praca jest przejrzysta, napisana poprawnie stylistycznie.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja stanowi samodzielny fragment badań naukowych i stanowi cenny, nowatorski wkład w badanie wpływu wybranych czynników żywieniowych i farmakologicznych na gospodarkę mineralną i metabolizm tkanki kostnej na zwierzęcym modelu osteoporozy pomenopauzalnej.

Cykl prac składających się na dysertację jest precyzyjnie zaplanowany i bezbłędnie przeprowadzony, a dojrzałe dyskusje w poszczególnych publikacjach, potwierdzają nie tylko dużą wiedzę Doktorantki w tym zakresie, ale przede wszystkim Jej dojrzałość jako badacza.

Stwierdzam, że rozprawa na stopień naukowy doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia spełnia wymogi stosownej ustawy – art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (teksty jednolity Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Pracę oceniam pozytywnie.

W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr. Natalii Wawrzyniak ze Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Z poważaniem


Dr hab. n. med. i n. o zdr. Prof. SUM Grzegorz Franik