

Warszawa, dn. 15.11.2024r.

Prof. dr hab. Agata Wawrzyniak
Katedra Żywienia Człowieka
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka, SGGW w Warszawie
agata_wawrzyniak@sggw.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Joanny Marii Pieczyńskiej-Zajac

pt. „*Wpływ diety wysokotłuszczowej/wysokofruktozowej na rozwój Zespołu policystycznych jajników oraz próba identyfikacji narzędzia dietetycznego sprzyjającego jego terapii*”

wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. UPP dr hab. Joanny Bajerskiej,
(promotora),

na stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych
w dyscyplinie technologia żywności i żywienia
przedłożonej Radzie Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Podstawa wykonania recenzji i przedmiot recenzji

Recenzja została wykonana w oparciu o Uchwałę Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dn. 04 października 2024 r. w związku z postępowaniem o nadanie stopnia naukowego doktora Pani mgr Joannie Marii Pieczyńskiej-Zajac. Decyzja została przekazana pismem z dn. 07 października 2024r. i podpisana przez Przewodniczącą Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia prof. UPP dr hab. Dorotę Cais-Sokolińską. Recenzja uwzględnia wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003r. (opublikowanej w Dz.U. nr 65. poz. 595, z późn. zm.).

Ocena strony formalnej przedłożonej do recenzji rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Joanny Marii Pieczyńskiej-Zajac pt. „*Wpływ diety wysokotłuszczowej/wysokofruktozowej na rozwój Zespołu policystycznych jajników oraz próba identyfikacji narzędzia dietetycznego sprzyjającego jego terapii*” stanowi sekwencję trzech prac, w tym dwóch prac badawczych z wykorzystaniem modelu zwierzęcego i jednej pracy przeglądowej z rozstrzygnięciem hipotezy badawczej, artykułów powiązanych tematycznie, opublikowanych w języku angielskim w trzech kolejnych latach 2022-2024, w

uznanych, wysoko punktowanych i międzynarodowych angielskojęzycznych czasopismach z listy JCR, tj. *Nutrition*, *Nutrients*, *Nutrition Reviews*, po uprzedniej pozytywnej ocenie recenzentów. Na rozprawę doktorską złożyły się publikacje o łącznym wskaźniku IF wynoszącym 15,0 (IF wg. danych z lat publikacji) i 420 punktów MNiSW:

1. **Pieczyńska-Zajac JM**, Malinowska AM, Pruszyńska-Oszmałek E, Kołodziejski PA, Drzymała-Czyż S, Bajerska J. *Effect of a high-fat high-fructose diet on the composition of the intestinal microbiota and its association with metabolic and anthropometric parameters in a letrozole-induced mouse model of polycystic ovary syndrome*. *Nutrition*. 2024 Aug;124:112450. doi: 10.1016/j.nut.2024.112450 (Wyd. Elsevier - IF = 3,2, MNiSW = 140)
2. **Pieczyńska JM**, Pruszyńska-Oszmałek E, Kołodziejski PA, Łukomska A, Bajerska J. *The Role of a High-Fat, High-Fructose Diet on Letrozole-Induced Polycystic Ovarian Syndrome in Prepubertal Mice*. *Nutrients*. 2022 Jun 15;14(12):2478. doi: 10.3390/nu14122478 (Wyd. MDPI - IF = 5,9, MNiSW = 140)
3. **Pieczyńska-Zajac JM**, Malinowska A, Łagowska K, Leciejewska N, Bajerska J. *The effects of time-restricted eating and Ramadan fasting on gut microbiota composition: a systematic review of human and animal studies*. *Nutr Rev*. 2023 May 10;82(6):777-793. doi: 10.1093/nutrit/nuad093 (Wyd. Oxford Academic - IF = 5,9, MNiSW = 140)

co należy uznać za wskaźniki odpowiednie przy ubieganiu się o stopień naukowy doktora. Opublikowane artykuły na dzień 15.11.2024r. zostały zacytowane 10-krotnie, wg. bazy WoS.

Tytuł dysertacji jest zasadniczo zgodny z obszarem badawczym i tematami prac, jednakże w opinii recenzenta nie uwzględnia najważniejszego elementu badania, tj. zmian mikrobioty jelitowej w patogenezie lub profilaktyce Zespołu policystycznych jajników (PCOS), co stanowiło główny nurt badań Doktorantki. W przedstawionej do recenzji dysertacji nie wyodrębniono także rozdziału, w którym Doktorantka dokonałaby w pogłębionej analizie identyfikacji i omówienia narzędzia dietetycznego sprzyjającego terapii PCOS, a zagadnieniu temu poświęciła skrótowo ostatni z akapitów w rozdziale *Podsumowanie*.

Jednakże powyższy cykl publikacji należy uznać za ważny i nowatorski dla dyscypliny technologii żywności i żywienia, a w szczególności obszaru żywienia człowieka. Przeprowadzone badania na modelu zwierzęcym oceny wpływu diety wysokotłuszczowej/wysokofruktozowej na rozwój Zespołu policystycznych jajników przy ocenie mikrobioty jelitowej oraz jej metabolitów i rozstrzygnięcie kwestii wpływu ograniczonego czasowo jedzenia i postu ramadanowego na skład ww. mikrobioty są

niewątpliwie ważne przy opracowaniu terapii dla schorzenia i wnoszą nowe elementy wiedzy do nauki.

Przedłożona dysertacja obejmuje 34 ponumerowane strony tekstu w języku polski (w tym angielskojęzyczne streszczenie), zawierające: stronę tytułową, wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład zbioru (1 strona), spis treści (1 strona), wykaz skrótów stosowanych w autoreferacie (1 strona), streszczenie w języku polskim i w języku angielskim z podaniem słów kluczowych (2 strony), rozdział *Wstępu* teoretycznego bez wydzielenia podrozdziałów wraz z zapisem celu/celów pracy i hipotez badawczych (6 stron) - co pozwoliło rozpoznać zagadnienia stanowiące przedmiot badań, a odnoszące się do opisu jednostki chorobowej PCOS, rozdział *Materiał i metody badań* (3 strony), rozdział *Wyniki badań i ich interpretacja* - z podziałem treści w odniesieniu do 2 hipotez badawczych (6 stron), *Podsumowanie* (2 strony), *Bibliografię*, bez numeracji pozycji (10 stron). Ponadto manuskrypt zawiera załącznik nr 1 - na który składają się pełne teksty 3 artykułów będących podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora oraz załącznik nr 2 - oświadczenia współautorów o udziale w badaniach. Załącznik nr 3 to kopia zgody na przeprowadzenie badania na zwierzętach.

Strona edytorska przedstawionej do oceny dysertacji nie budzi większych zastrzeżeń i jest językowo poprawna, a przygotowanie wyników do publikacji w formie tabel, wykresów i zdjęć jest czytelne. Niemniej rolą recenzenta jest ocena spójności opublikowanych prac w odniesieniu do całości tematu zawartego w tytule dysertacji, co utrudnia brak schematu dla całości badań, jak też pogłębionego łącznika metodycznego w przedstawionej do recenzji dysertacji.

Jednocześnie należy podkreślić, iż udział Doktorantki w powstaniu każdej z prac należy uznać za wiodący jako pierwszego autora. W przypadku pierwszej i drugiej z publikacji wkład pracy Doktorantki polegał na przygotowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodologii, przygotowaniu i analizie danych oraz przygotowaniu manuskryptu. W trzeciej z publikacji wkład mgr Joanny Marii Pieczyńskiej-Zajac to: przygotowanie koncepcji badań i opracowanie protokołu systematycznego przeglądu literaturowego, przeprowadzenie wyszukiwania literatury, selekcja, ekstrakcja, analiza i interpretacja danych oraz przygotowanie manuskryptu. Doktorantka nie pełniła roli autora korespondencyjnego.

Ponieważ autorzy nie podali procentowego wkładu pracy w przeprowadzonych badaniach, a niektóre z czynności były powielane w wyszczególnieniach przez innych współautorów uprzejmie proszę o oszacowanie podczas obrony procentowego wkładu Doktorantki w badania stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Ponadto niektóre podstawowe czynności związane z doświadczeniem wydaje się, że nie zostały uwzględnione w wyszczególnieniach, jak np. przeprowadzenie doświadczenia na zwierzętach, czy wykonanie analiz chemicznych.

Doświadczenie uzyskało zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Poznaniu (Uchwała Nr 51/2021 z dn. 03.09.2021r., Uchwała Nr 23/2022 z dn. 25.02.2022r.).

W manuskrypcie nie wyszczególniono źródła finansowania prac, np. finansowania z grantu.

Reasumując przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne przy ubieganiu się o stopień naukowy doktora.

Ocena merytoryczna pracy

Zespół policystycznych jajników (wielotorbielowatość jajników, PCOS), jest jednym z najczęściej występujących zaburzeń endokrynologicznych, a ze skutkami tego schorzenia, w tym niepłodnością, może zmagać się nawet do 20% kobiet w wieku rozrodczym. Schorzenie to opisywane jest również jako androgenizm jajnikowy, gdyż objawy tej choroby wywołane są zbyt wysokim stężeniem męskich hormonów płciowych w organizmie kobiety lub zmianą wrażliwości tkanek docelowych na hormony steroidowe. Niezwykle ważny jest również fakt, iż w zespole PCOS występują obok zaburzeń hormonalnych, także i zaburzenia metaboliczne manifestujące się jako insulinooporność, hiperinsulinizm, zaburzenia gospodarki węglowodanowej oraz lipidowej, mogące prowadzić do powstania zespołu metabolicznego, a cukrzyca i otyłość uznawane są za czynniki ryzyka wystąpienia lub potęgowania PCOS, co Doktorantka dość wyczerpująco opisała we *Wstępie* teoretycznym. Niemniej patomechanizm schorzenia PCOS nie został dotychczas w pełni wyjaśniony, stąd temat podjętej pracy nad wpływem diety wysokotłuszczowej/wysokofruktozowej na rozwój zespołu policystycznych jajników oraz próba identyfikacji narzędzia dietetycznego sprzyjającego jego terapii, przy identyfikacji zmian mikrobioty jelitowej i jej produktów, jako elementu nowatorskiego i przy określeniu związku z parametrami metabolicznymi/endokrynologicznymi w PCOS. Temat ten należy uznać za niezwykle ważny, aktualny i uzasadniony dla nauki o żywieniu człowieka i technologii żywności, gdyż propozycją dla pacjentki po zgłoszeniu do poradni z symptomami choroby powinna być przede wszystkim weryfikacja diety na bazie zaleceń wspomagających leczenie lub zaleceń pomagających niwelować skutki choroby czy wręcz mogących służyć profilaktyce, w tym utrzymaniu prawidłowej masy ciała, a nowe dane naukowe uzyskane w badaniach mgr Joanny Marii Pieczyńskiej-Zajac są niezwykle cenne, szczególnie opisu zmian

mikrobioty jelitowej pod wpływem żywienia w PCOS lub żywienia ograniczonego czasowo i postu ramadanowego. Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę niewątpliwie poszerzają wiedzę nt. możliwości dieto-terapeutycznych ww. jednostce chorobowej, w tym zapobieganiu rozwojowi stanów zapalnych w jelicie, skutkujących naruszeniem integralności bariery jelitowej, co sprzyja postępowi choroby.

Tak więc, pierwszym i głównym celem badania przeprowadzonego przez mgr Joannę Marię Pieczyńską-Zajac na stopień doktora była ocena wpływu diety wysokotłuszczowej/wysokofruktozowej (HF/HFr) na skład mikrobioty jelitowej oraz na zaburzenia metaboliczne i endokrynologiczne z wykorzystaniem mysiego modelu PCOS, jak też poszukiwanie terapii dietetycznej umożliwiającej łagodzenie zaburzeń. W badaniu 5-tygodniowym przyżyciowo u myszy oceniano spożycie diety, masę i skład ciała zwierząt. W zebranych kale zwierząt oznaczono krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (KKT) (masłowy, propionowy, octowy - metodą chromatografii gazowej). W badaniu po terminacji zwierząt oceniano w badaniu histopatologicznym jajniki do potwierdzenia indukcji PCOS, wątrobę w celu oceny jej stłuszczenia. W surowicy krwi oznaczono stężenie glukozy, trójglicerydów, cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji lipoprotein HDL i LDL, białka C-reaktywnego i całkowitą pojemność antyoksydacyjną, stężenie niezastryfikowanych kwasów tłuszczowych, LSP (główny składnik ścian komórkowych bakterii Gram (-), stężenie insuliny i testosteronu. W wątrobie oznaczono cholesterol i trójglicerydy. Do oznaczeń powyższych przyjęto właściwe do tych celów metody, tj. testy enzymatyczne, kolorymetryczne, immunoenzymatyczne. Ponadto z jelita ślepego pobrano treść jelitową z której wyizolowano DNA bakteryjne do badań, a zabezpieczony materiał został przekazany do analizy firmie Genomed (Warszawa, Polska). W pytaniach do etapu I uprzejmie prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie poziomu fruktozy w diecie zwierząt w ilości blisko 37,5% (37,5g/100g diety, w grupie wysokotłuszczowej/wysokofruktozowej).

Drugim celem badań była analiza na podstawie zebranej literatury wpływu żywienia ograniczonego czasowo i postu ramadanowego na skład mikroflory jelitowej w badaniach na zwierzętach, jak i z udziałem ludzi oraz ustalenie zależności pomiędzy obfitością wybranych bakterii a parametrami antropometrycznymi i metabolicznymi/endokrynologicznymi. Systematyczny przegląd literaturowy został przeprowadzony zgodnie z zasadami PRISMA (*Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses*) i zarejestrowany w Międzynarodowym Prospektywnym Rejestrze Przeglądów Systematycznych PROSPERO (CRD42021278918). Przeprowadzoną procedurę należy uznać za poprawną.

Powyższe cele poparto prawidłowo sformułowanymi hipotezami badawczymi:

- Jeżeli letrozol podawany w wieku przedpokwitaniowym powoduje niekorzystne zmiany w składzie mikrobioty jelitowej i objawy charakterystyczne dla PCOS, to dieta wysokofruktozowa/wysokotłuszczowa zaburzenia te może dodatkowo zaostrzyć.
- Żywienie ograniczone czasowo korzystnie modeluje skład i różnorodność mikrobioty jelitowej i tym samym sprzyja poprawie parametrów antropometrycznych oraz metabolicznych zarówno w modelu zwierzęcym jak i u ludzi.

Cele i hipotezy badania został poparte wcześniejszą analizą bieżącego piśmiennictwa zawartą w rozdziale *Wstępu* teoretycznego uzasadniającą wybór tematu i konieczność dalszych badań z tego zakresu w wyniku niejednoznacznych wyników badań dotychczas przeprowadzonych, przy nowatorskim określeniu zmian mikrobioty jelitowej pod wpływem żywienia i wpływie tych zmian na parametry metaboliczne/endokrynologiczne organizmu w PCOS. Badania te wykonano z wykorzystaniem różnorodnych technik badawczych i omówiono wieloaspektowo. Tak zaplanowane badania należy uznać za etapowe i wieloaspektowe, podkreślające wnikliwość badacza w poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie główne i pytania/hipotezy szczegółowe, pomimo, iż nie zaplanowano badań z udziałem ludzi w głównym badaniu. Doktorantka prawidłowo przeanalizowała, zinterpretowała i przedyskutowała wyniki badań.

Ponadto nadmienić należy, iż przedłożona do recenzji praca doktorska mgr Joanny Marii Pieczyńskiej-Zajac składa się z już opublikowanych artykułów, uprzednio weryfikowanych przez recenzentów do prestiżowych światowych czasopism, co dodatkowo potwierdza poprawność doboru metod badawczych, poprawność opisu wyników badań, w tym ich interpretacji i dyskusji. W pracy wykorzystano poprawnie dobrane metody statystyczne w ocenie wyników.

Dobór piśmiennictwa do prac należy uznać za właściwy i bardzo aktualny, na podstawie anglojęzycznego piśmiennictwa światowego.

Przygotowaną rozprawę doktorską kończy podsumowanie, co stanowi oryginalny wkład Doktorantki do nauki. **Mgr Joanna Maria Pieczyńska-Zajac wykazała w oparciu o wyniki przeprowadzonych badań, iż:**

- karmienie dietą wysokotłuszczową/wysokofruktozową podawaną w okresie dojrzewania może bezpośrednio stymulować objawy rozrodcze i metaboliczne, nie tylko u myszy z indukowanym PCOS, ale także u myszy otrzymujących placebo. Odkrycia te wskazują, że dieta wysoko przetworzona, bogata w cukry proste

(szczególnie fruktozę) i bogata w tłuszcze nasycone może, jeśli jest spożywana codziennie, mieć duży wpływ na postęp PCOS u młodych kobiet. Produkty spożywcze bogate w te składniki powinny być zatem wyeliminowane z diety kobiet z PCOS, zwłaszcza młodszych kobiet. Połączenie diety wysokotłuszczowej/wysokofruktozowej z letrozolem u myszy powodowało ponadto widoczne zaburzenia metaboliczne, porównywalne z tymi występującymi u kobiet z PCOS, przy stłuszczeniu wątroby,

- dieta wysokotłuszczowa/wysokofruktozowa podawana zwierzętom doświadczalnym miała znacznie silniejszy wpływ na skład mikrobioty jelitowej myszy przedpokwitaniowych niż sam letrozol wywołujący PCOS powodując m.in. istotnie niższą obfitość bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz wyższą obfitość bakterii z rodzaju *Muribaculum* czy *Rikenella*, a także na zdolność do produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Skład mikrobioty jelitowej miał istotny wpływ na parametry związane z PCOS, a w szczególności na korelację między rodzajami *Turicibacter* (dodatnia) i *Lactobacillus* (ujemna) a profilem lipidowym u zwierząt, rodzajem *Prevotellaceae_NK3B31_group* a stężeniem testosteronu (ujemna), pomiędzy rodzajem *Bilophila* a przyrostem masy ciała (dodatnia),
- reżim żywienia czasowego, jak i post ramadanowy w badaniach na ludziach prowadzą do korzystnego zwiększenia bioróżnorodności alfa mikrobiomu jelitowego. W badaniach na zwierzętach post nie był związany z poprawą różnorodności alfa, ale obserwowano zwiększenie fluktuacji mikrobiologicznej w porównaniu z grupami stosującymi dietę wysokotłuszczową *ad libitum*, co może wpływać na poprawę parametrów metabolicznych i masę ciała.

Niniejsze badania w opinii recenzenta znacząco poszerzają obecną wiedzę, jednakże powyższe wnioski w przyszłości wymagają potwierdzenia szczegółowego u ludzi z sugestią zaprojektowania preparatu probiotycznego łagodzącego objawy PCOS. We wnioskach końcowych poproszę Panią mgr Joannę Marię Pieczyńską-Zajac o podsumowującą próbę identyfikacji narzędzia dietetycznego sprzyjającego terapii PCOS na podstawie powyższych badań.

Wniosek końcowy

Na podstawie dokonanej oceny stwierdzam, iż rozprawa autorstwa mgr Joanny Marii Pieczyńskiej-Zajac pt. *„Wpływ diety wysokotłuszczowej/wysokofruktozowej na rozwój Zespołu policystycznych jajników oraz próba identyfikacji narzędzia dietetycznego sprzyjającego jego terapii”* ma istotne walory poznawcze i jest na wysokim poziomie naukowym, a podjęty temat badawczy ma znaczenie i w wymiarze poznawczym, jak też aplikacyjnym dla nauki zajmującej się badaniem zagadnień z obszaru żywienia człowieka i technologii żywności. Praca doktorska jest oryginalnym i nowatorskim rozwiązaniem problemu naukowego, a Doktorantka wykazała się wiedzą oraz umiejętnościami prowadzenia badań naukowych w ramach jego realizacji. Przedłożona do oceny rozprawa spełnia wymogi ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20.07.2018 (opublikowanej w Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Biorąc powyższe pod uwagę stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Joanny Marii Pieczyńskiej-Zajac do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem nadania stopnia naukowego doktora.