

Warszawa, 08.11.2024 r.

**Prof. dr hab. Joanna
Gromadzka-Ostrowska
Katedra Dietetyki**

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Żuk
pt.: „Ocena wpływu fitoestrogenów sojowych na
regulację endogennej syntezy choline i gromadzenia
lipidów w wątrobie ”

dziedzina: nauki rolnicze

dyscyplina: technologia żywności i żywienia

promotor: prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Agata Chmurzyńska

**Szkoła Główna Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

**Instytut Nauk
o Żywieniu Człowieka**

ul. Nowoursynowska 159 C
02-776 Warszawa
+48 22 59 370 10
inzc@sggw.edu.pl
www.sggw.pl

Recenzję sporządzono na podstawie:

pisma Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, dr hab. Doroty Cais-Sokolińskiej, prof. UPP z dnia 7 października 2024 r. w sprawie wykonania recenzji rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Żuk pt.: „Ocena wpływu fitoestrogenów sojowych na regulację endogennej syntezy choline i gromadzenia lipidów w wątrobie”, wymagań określonych w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2020 r., poz. 85 z późniejszymi zmianami) oraz rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Żuk i osiągnięć naukowych Kandydatki przesłanych przez Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Podstawowe informacje o Kandydatce

Pani mgr Ewelina Żuk studia licencjackie (2016 r.) i magisterskie (2018 r.) ukończyła na kierunku „Dietetyka” na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Od 2018 r. do chwili obecnej jest uczestniczką Stacjonarnego Studium Doktoranckiego w dyscyplinie *technologia żywności i żywienia* prowadzonego w tej samej jednostce. Pracę doktorską Kandydatka wykonała w Katedrze Żywienia Człowieka i Dietetyki Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu UPP. Rozprawa została przygotowana w 2024 roku pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Agaty Chmurzyńskiej.

Od grudnia 2020 r. Kandydatka pracuje jako młodszy specjalista w Zwierzętarni Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Dorobek naukowy mgr Eweliny Żuk, wpisujący się w zakres dyscypliny *technologia żywności i żywienia*, to 5 artykułów, w których jest pierwszym (2 artykuły) lub kolejnym (3 artykuły) autorem, opublikowanych w języku angielskim w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Jeden artykuł został opublikowany w polskim czasopiśmie. Kandydatka prezentowała wyniki swoich badań na ośmiu konferencjach naukowych, w tym dwóch zagranicznych: w Dublinie (Irlandia) w 2019 r. i Timisoara (Rumunia) w 2021 r. Ponadto mgr E. Żuk uczestniczyła w realizacji dwóch projektów badawczych finansowanych przez NCN, a także była kierownikiem projektu finansowanego również przez NCN w ramach konkursu PRELUDIUM o tytule tożsamym z ocenianą rozprawą doktorską oraz dwóch projektów badawczych finansowanych w ramach konkursów wewnętrznych Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu UPP „Młoda Kadra 2019” i „Młoda Kadra 2020”.

Oceniając dotychczasowy dorobek naukowy Kandydatki należy stwierdzić, że jest on bardzo dobry, a merytorycznie wpisuje się w dziedzinę nauki rolniczej, dyscyplinę *technologia żywności i żywienia*.

Podstawowe informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest opracowaniem zwięzłym, przygotowanym w formie oprawionego maszynopisu liczącego 124 strony, o klasycznym układzie treści. Całość została podzielona na 10 rozdziałów, których kolejność i wzajemne proporcje są właściwe dla prac eksperymentalnych.

Rozprawa składa się z następujących rozdziałów głównych: 1. „Wstęp” (nieco ponad 2 strony), 2. „Część literaturowa” (32 strony, co stanowi około 34% całości), 3. „Cele i zakres pracy” (nieco ponad 2 strony), 4. „Materiał i metody badań” (prawie 13 stron – około 14% całości), 5. „Wyniki” (26 stron, – ponad 28% całości), 6. „Dyskusja” (nieco ponad 13 stron – około 14% całości), 7. „Wnioski” (1,5 strony), 8. „Piśmiennictwo” liczące 207 pozycji (nieco ponad 15 stron – około 16% całości), 9. „Spis tabel” (1/4 strony), 10. „Spis rycin” (nieco ponad 1 strona). Udział procentowy poszczególnych rozdziałów był liczony w stosunku do właściwego tekstu rozprawy, z pominięciem pierwszych 12 i ostatnich 17 stron, czyli za 100% przyjęto 94 strony tekstu. Rozdziały 2, 4 i 5 zostały podzielone na podrozdziały. W dyskusji również wyróżniono podrozdziały, co jednak nie zostało uwzględnione w spisie treści.

Rozprawa zawiera również dwustronicowe streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów ułożonych w porządku alfabetycznym oraz dodatkowe strony ze spisem treści i podziękowaniem dla Pani Promotor.

Materiał ilustracyjny zawarty w rozprawie to 29 rycin, z czego 25 ilustruje uzyskane wyniki, trzy znajdują się z rozdziale „Część literaturowa”, a jeden w rozdziale „Materiał i metody badań”. Ponadto w rozprawie umieszczono 6 tabel, w tym cztery w rozdziale „Materiał i metody” i dwie w rozdziale „Wyniki”.

Materiał ilustracyjny przygotowano starannie, natomiast o ile wzajemne proporcje poszczególnych rozdziałów rozprawy nie budzą większych zastrzeżeń, to pod względem opracowania edytorskiego stwierdzam wiele nieprawidłowości. Po pierwsze Doktorantka niepotrzebnie stosuje podwójną ilustrację (wykresy i tabela) dla przedstawienia spożycia karmy, a po drugie – rycina przedstawiająca zdjęcia mikroskopowe jest mało czytelna. Te uwagi dotyczą rozdziału nr 5 („Wyniki”). Na szczególną uwagę zasługuje cytowane piśmiennictwo. Na 207 pozycji wymienionych w spisie na końcu rozprawy aż 99 (czyli 48%) to prace opublikowane ponad 10 lat temu, co budzi obawy co do aktualnego stanu wiedzy będącego podstawą teoretyczną ocenianej rozprawy, a szczególnie dyskusji otrzymanych wyników. Znaczna część z tych artykułów (18, czyli prawie 10%) była opublikowana kilkadziesiąt lat temu, co w zakresie poruszanych w niniejszej rozprawie problemów naukowych stanowić może wiedzę nieaktualną. Do tego aspektu odniosę się bardziej szczegółowo w dalszej części recenzji.

Ocena celu badań i zastosowanych metod badawczych

Głównym celem ocenianej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu spożycia izoflawonów sojowych na endogenną syntezę jednej z form choline (fosfatydylocholine) i magazynowanie lipidów w hepatocytach w warunkach niedoboru choline w organizmie. Badania wykonano *in vivo* na modelu zwierzęcym (szczur wędrowny). Co istotne i godne pochwały hipotezy badawcze sformułowane przez Kandydatkę dotyczyły podłoża molekularnego estrogenozależnych szlaków metabolicznych związanych z przemianami lipidowymi w wątrobie, w tym zmian spowodowanych przez różne spożycie genisteiny i daidzeiny w ekspresji genów oraz kodowanych przez nie białek. Zweryfikowaniu hipotez badawczych służyły cztery cele szczegółowe, co do których trafności nie mam zastrzeżeń.

Materiał biologiczny, na którym wykonano wszystkie oznaczenia, pochodził z dwuetapowego doświadczenia (żywienie 4 i 8 tygodni) wykonanego na dorosłych samcach niekrewniaczego stada szczurów Wistar. W związku z tym doświadczeniem mam kilka pytań do Kandydatki.

Po pierwsze dlaczego zdecydowano się na szczury stada Wistar (to, że były to zwierzęta *outbred* to oczywiste!), a nie innego stada np. Sprague Dawley czy Fischer 344, znacznie częściej stosowanych w badaniach żywieniowych i po drugie, co jest bardzo istotne – dlaczego tylko na samcach, a nie zwierzętach obu płci? Przecież niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (NAFLD), czyli przewlekłe, wieloaspektowe i złożone schorzenie układowe, wykazuje wyraźne różnice w częstości występowania i nasileniu w zależności od płci (dymorfizm płciowy), a wiedza dotycząca różnic płciowych u osób dorosłych z NAFLD jest ograniczona. Różnice związane z płcią mają różne przyczyny, w tym genetyczne, ale w istotnym stopniu są spowodowane zmianami w stężeniu i wzajemnym stosunku między estrogenami a androgenami. Tym bardziej zasadne byłoby wykonanie badań, których wyniki stanowią podstawę ocenianej rozprawy, zarówno na samcach, jak i samicach. Szczególnie biorąc pod uwagę fakt, że eksperymentalny (żywieniowy) czynnik hipotetycznie mający ograniczać zmiany w metabolizmie i magazynowaniu lipidów w wątrobie sprzyjające rozwojowi NAFLD, to były związki pochodzenia roślinnego o bardzo silnym działaniu, analogicznym do działania estrogenów. A więc wykonanie tych badań również na samicach wydaje się niezbędne. Trzeba dodać, że kolejne ewentualne doświadczenie, które powinno być wykonane zarówno na samicach, jak i samcach, będzie wymagało zbędnego poświęcenia kilkudziesięciu dodatkowych zwierząt, a więc będzie sprzeczne z zapisami Ustawy i zasadą 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*).

Bardziej szczegółowo odniosę się do tych zagadnień w kolejnym podrozdziale recenzji polemizując również ze stwierdzeniami Doktorantki zamieszczonymi w dyskusji na stronie 92 rozprawy.

Z obowiązku recenzenta dodam, że w opisie doświadczenia zabrakło: (1) podania symbolu określającego szczury, na których wykonano badanie, (2) postaci, w jakiej była podawana zwierzętom karma, (3) opisanie, w jaki sposób prowadzono kontrolę spożycia karmy ponieważ opis na stronie 55 i 65 rozprawy niczego nie wyjaśnia, (4) podania czy przy pobieraniu materiału biologicznego respektowano rytmy biologiczne, (5) przedstawienia schematu doświadczenia w języku polskim, w którym jest napisana rozprawa. Ponadto na schemacie podano, że były to szczury szczepu Wistar, a w opisie doświadczenia, że były to szczury stada Wistar. Które określenie (a nie jest wszystko jedno, które się zastosuje) odpowiada rzeczywistości? Proszę o ustosunkowanie się do tych pytań, jak również o podanie, czym różni się w przypadku gryzoni laboratoryjnych szczep od stada.

Weryfikacji hipotez badawczych dokonano na podstawie wybranych parametrów analizowanych w surowicy krwi (stężenie glukozy, pełny lipidogram oraz transaminazy wątrobowe), wątrobie (analiza histologiczna, ekspresja wybranych genów i kodowanych przez nie białek) oraz w kale (zawartość tłuszczu), pochodzących od zwierząt doświadczalnych.

Oznaczane w materiale biologicznym parametry zostały dobrane trafnie, a zastosowane metody analityczne są prawidłowe. Za bardzo interesujące uważam przeżyciowe pomiary składu ciała szczurów.

Ocena wartości merytorycznej rozprawy

Przesłankę naukową podjęcia badań będących podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej były dwa zjawiska, dotyczące znacznej większości populacji globalnej, a mianowicie z jednej strony narastająca zachorowalność na niealkoholową stłuszczeniową chorobę wątroby (NAFLD) spowodowana między innymi deficytem pokarmowej podaży choliny, a z drugiej – wzrastającą popularność diet wegetariańskich czy wegańskich wybieranych jako prozdrowotne, a co za tym idzie wzrastające spożycie produktów sojowych bogatych w biologicznie czynne związki pochodzenia roślinnego. Doktorantka słusznie założyła, że warto sprawdzić eksperymentalnie, jak można wprowadzając modyfikacje żywieniowe zwiększyć endogenną syntezę fosfatydylocholiny, a tym samym zatrzymać bądź zmniejszyć nadmierne gromadzenie lipidów w postaci

triacylogliceroli w komórkach wątroby, prowadzące w konsekwencji do rozwoju NAFLD. Jako składnik odżywczy potencjalnie mogący wpłynąć na syntezę fosfatydylocholiny przez hepatocyty mgr Ewelina Żuk uznała wybrane izoflawony sojowe (genisteina, daidzeina, ekstrakt zawierający różne izoflawony), które ze względu na silne działanie estrogenopodobne mogą mieć zasadniczy wpływ na szlaki metaboliczne lipidów, w których cholina odgrywa zasadniczą rolę.

Ideę badania uważam za nowatorską, o znacznym potencjale utylitarnym. Mam jednak bardzo istotne zastrzeżenia merytoryczne do zawartych w rozprawie treści. Jest dostępnych w literaturze światowej wiele artykułów z ostatnich lat (2017 – 2023) zawierających wyniki zarówno badań klinicznych, jak eksperymentów na modelach zwierzęcych, w których przedstawiono znaczenie hormonów płciowych, szczególnie estrogenów, w etiologii stłuszczenia wątroby i molekularnych mechanizmów tego działania. Tymczasem wiele cytowanych przez Doktorantkę artykułów było opublikowanych kilkanaście, a nawet kilkadziesiąt lat temu. To budzi uzasadnione obawy co do aktualnego stanu wiedzy (*state of art*) przedstawionego w rozdziale rozprawy zatytułowanym „Część literaturowa”.

W tym rozdziale rozprawy Doktorantka opisuje szczegółowo właściwości chemiczne, źródła pokarmowe, funkcje biologiczne, metabolizm i endogenną syntezę choliny. Tu nie można mieć zastrzeżeń do cytowania nawet dość dawno opublikowanych artykułów, bo mgr Ewelina Żuk przyjęła konwencję rysu historycznego poczynając od połowy XIX wieku. Gorzej jest w kolejnych podrozdziałach przeglądu piśmiennictwa, poświęconych niealkoholowej stłuszczeniowej chorobie wątroby oraz charakterystyce fitoestrogenów. W części dotyczącej NAFLD, a szczególnie mechanizmów sygnalizacji komórkowej, cytowane są artykuły sprzed kilkunastu lat (str. 31, 34, 35). To budzi mój sprzeciw, bo przez te kilkanaście lat możliwości techniczne badań całkowicie zmieniły się, a tym samym wiedza dotycząca opisywanych zjawisk może być już inna. Tym bardziej, że sporo jest artykułów na ten temat opublikowanych stosunkowo niedawno. Podobnie jest w przypadku powoływania się na badania innych autorów, dotyczące metabolizmu i aktywności estrogenowej izoflawonów sojowych (str. 40,41,43).

Nie zgadzam się także ze stwierdzeniem kilkakrotnie podawanym przez Doktorantkę, że (cyt.): „izoflawony sojowe wykazują strukturalne podobieństwo do estrogenów, bowiem ich struktura chemiczna jest zbliżona do występującego w organizmie człowieka 17- β -estradiolu” (str. odpowiednio 49, 35). To jest stwierdzenie nieprawdziwe, bo izoflawony mają zupełnie inną

strukturę cząsteczki, między innymi dlatego określane są jako związki niesteroidowe. Prawdą jest natomiast to, że związki te mają działanie estrogenopodobne.

Podobne zastrzeżenia dotyczą dyskusji otrzymanych wyników. W tej części rozprawy Doktorantka ciekawie polemizując z własnymi wynikami posiłkując się jednak wielokrotnie artykułami opublikowanymi nie tylko kilkanaście, ale nawet kilkadziesiąt lat temu. I nie jest to w konwencji rysu historycznego, a dotyczy ekspresji genów w wątrobie będącej skutkiem różnej zawartości choliny w pokarmie i dodatku do niego różnych izoflawonów (str. 100, 102, 103).

Biorąc pod uwagę rozdział rozprawy „Dyskusja” chcę ponownie nawiązać do istotnej roli steroidów płciowych w etiologii NAFLD. Jest wiele opublikowanych w ostatnich latach dowodów naukowych, świadczących o istotnej roli tych hormonów w rozwoju stłuszczenia wątroby. Wzrost stężenia testosteronu w surowicy krwi u kobiet zwiększa ryzyko NAFLD, podobnie jak obniżenie stężenia tego hormonu u mężczyzn. Z kolei estrogeny, zmniejszając syntezę triacylogliceroli i zwiększając utlenianie wolnych kwasów tłuszczowych w wątrobie, mają działanie korzystne, redukując ryzyko pojawienia się patologicznych zmian morfologicznych w komórkach tego narządu. Faktem jest, że mężczyźni są bardziej podatni na NAFLD przy niskim spożyciu choliny, ponieważ ekspresja genu *PEMT* jest indukowana przez estrogeny, co skutkuje zwiększeniem syntezy fosfatydylocholiny zachodzącej za pośrednictwem białka metylotransferazy fosfatydyloetanolaminy (PEMT) w znacznie większym stopniu u kobiet niż u mężczyzn. Biorąc to pod uwagę tym bardziej należało wykonać eksperyment również na samicach szczurów, u których uzyskane wyniki mogłyby okazać się bardziej obiecujące.

Nie przekonuje mnie argument, dotyczący wyboru płci zwierząt eksperymentalnych zamieszczony w dyskusji (str. 92). Cytuję: „Doniesienia literaturowe mówią o tym, że samce są bardziej podatne na negatywne skutki diety deficytowej w cholinę niż samice”. Jako źródło literaturowe Pani Ewelina Żuk podaje artykuł przeglądowy opublikowany w 2024 r. autorstwa Obeid i współautorów. Otóż w tym artykule jedyna wzmianka dotycząca obserwacji, że samce są bardziej niż samice podatne na negatywne skutki diety ubogiej w cholinę pochodzi z artykułu autorstwa Griffith opublikowanego w *Journal of Nutrition* w 1940 roku!!!

Natomiast artykuł przeglądowy, o którym powyżej mowa (Obied et al., 2024) dotyczy wpływu spożycia choliny przez ciężarne kobiety lub samice zwierząt modelowych na funkcje wątroby u płodów i noworodków. Poza tą jedną publikacją z 1940 r. nie ma w tym artykule żadnej wzmianki o innej reakcji u samców.

Kolejny argument przytoczony w tym samym akapicie „Dyskusji”, a dotyczący wyboru samców szczurów jako modelu eksperymentalnego w aspekcie działania fitoestrogenów na receptory estrogenowe, również nie jest przekonujący. Wręcz przeciwnie – sugeruje wykonanie badań na obu płciach.

Jak wynika z lektury kolejnego rozdziału rozprawy „Wnioski”, uzyskane wyniki nie pozwoliły na pozytywne zweryfikowanie hipotez badawczych, co uważam za bardzo istotne i doceniam takie krytyczne podejście Doktorantki do własnych wyników. Moje zastrzeżenia budzi natomiast forma, w jakiej wnioski zostały napisane. Są to raczej obserwacje wynikające z przeprowadzonych badań niż sformułowane prawidłowo wnioski. W związku z tym ten rozdział rozprawy powinien być zatytułowany „Spostrzeżenia i wnioski”, a akapit podsumowujący (str. 106) powinien być moim zdaniem przeredagowany, a być może przedstawiony jako kolejny punkt. Szczególnie, że ostatnie zdanie tego akapitu dotyczące potencjalnych mechanizmów kompensacyjnych są prawdopodobnie zależne od płci.

Z obowiązku recenzenta muszę jeszcze wspomnieć kilka określeń powtarzających się wielokrotnie w rozprawie, które są stosowane nieprawidłowo:

- synteza (jakiegoś związku), a nie produkcja. Organizm to nie zakład przemysłowy;
- metabolizm wątroby a nie praca wątroby;
- nie pozytywny wpływ tylko korzystny wpływ;
- nie stężenie transaminaz wątrobowych tylko ich aktywność (w opisie wyników);
- nie tkanki tylko narządy, które są zbudowane z tkanek.

Ocena końcowa

Pomimo wielu niedociągnięć i błędów oceniana rozprawa doktorska mgr Eweliny Żuk ma istotne walory poznawcze, a szeroki zakres zastosowanych metod analitycznych oraz wykonanie dużego doświadczenia *in vivo* na zwierzętach modelowych (choć szkoda, że tylko na jednej płci) powodują, że opracowanie to stanowi oryginalny wkład do wiedzy w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie *technologia żywności i żywienia*. Istotnym walorem ocenianej rozprawy doktorskiej jest łączenie aspektów naukowych z praktycznymi.

Doktorantka wykazała się dobrą znajomością tematyki badanych zagadnień, opanowaniem różnych technik analitycznych i umiejętnością krytycznej oceny uzyskanych wyników. Udowodniła, że potrafi poprawnie formułować hipotezy badawcze i prawidłowo je weryfikować.

Konkluzja

Stwierdzam, że praca doktorska mgr Eweliny Żuk pt.: *„Ocena wpływu fitoestrogenów sojowych na regulację endogennej syntezy choliny i gromadzenia lipidów w wątrobie”* spełnia warunki rozprawy doktorskiej, określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2020 r., poz. 85 z późniejszymi zmianami), o czym świadczy oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Wobec powyższego stawiam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny *technologia żywności i żywienia* Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska