

prof. dr hab. dr n. med. Renata B. Kostogrys
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Wydział Technologii Żywności
Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki

Kraków, 6 listopada 2024 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Eweliny Żuk

pt. „Ocena wpływu fitoestrogenów sojowych na regulację endogennej syntezy choliny i gromadzenia lipidów w wątrobie”

wykonanej w Katedrze Żywienia Człowieka i Dietetyki Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Agaty Chmurzyńskiej

Liczne badania dowodzą, że nieprawidłowy sposób żywienia jest problemem powszechnym. Składnikiem obecnym w wielu produktach spożywczych zarówno pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego jest cholina. W ostatnich latach pojawiło się wiele dowodów naukowych potwierdzających biologicznie ważne efekty choliny. Cholina jest źródłem grup metylowych wykorzystywanych w wielu istotnych procesach metabolicznych zachodzących w organizmie. Jest ona potrzebna do syntezy dwóch głównych fosfolipidów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania błon komórkowych tj. fosfatydylocholiny i sfingomieliny. Bierze udział w produkcji ważnego neuroprzekaźnika tj. acetylocholiny. Cholina odgrywa także ważną rolę w modulowaniu ekspresji genów, transporcie i metabolizmie lipidów oraz wczesnym rozwoju mózgu. Uczestniczy w usuwaniu nadmiaru triacylogliceroli z wątroby oraz ma wpływ na prawidłowe funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego. Cholina może być syntetyzowana z seryny przy udziale kwasu foliowego, witaminy B₁₂ oraz metioniny. Czasami jednak synteza ta może być niewystarczająca, dlatego cholina uważana jest za niezbędny składnik diety. Jedyną wyznaczoną normę na cholinę jest wartość ustalona na poziomie wystarczającego spożycia. Z uwagi na brak danych dotyczących spożycia i stanu odżywienia choliną w populacji polskiej w aktualnym wydaniu norm żywienia dla populacji Polski pozostawiono wartości opracowane przez Instytut Żywności i Żywienia w poprzednich latach.

Z związku z istotnymi funkcjami biologicznymi pełnionymi w organizmie przez cholinę podejmuje się badania dotyczące jej interakcji z różnymi składnikami żywności. W literaturze znaleźć można nieliczne dane dotyczące tego zagadnienia. Dodatkowo często dane te są niejednoznaczne.

Mając powyższe na uwadze podjęcie przez mgr Ewelinę Żuk badań mających na celu ocenę wpływu izoflawonów sojowych spożywanych z dietą 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 należy uznać za jak najbardziej uzasadnione.

W ocenie przedłożonej pracy oceniam stronę formalną dysertacji, jak również zwracam uwagę na jej wartość merytoryczną tj. zasadność celu pracy oraz jego uzasadnienie, metodologię badań, umiejętność interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników, a także wnioskowania.

Ocena formalna pracy

Formalny układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich o charakterze doświadczalnym. Oceniana praca obejmuje 124 strony maszynopisu i składa się z 10 rozdziałów oraz streszczenia. Kolejność rozdziałów i podrozdziałów jest logiczna, a ich nazewnictwo właściwe. W pracy zamieszczono 6 tabel i 29 rycin.

Praca napisana jest ładną polszczyzną i jest prawie wolna od błędów stylistycznych oraz interpunkcyjnych, co świadczy o jej bardzo starannym przygotowaniu.

Ocena poprawności sformułowania tytułu, celu pracy oraz jego uzasadnienia

Tytuł pracy jest sformułowany poprawnie i realizowany w zaplanowanym eksperymencie.

Rozdział **Przegląd literatury** obejmuje 48 stron maszynopisu i składa się z 4 podrozdziałów. Autorka przejrzysto przedstawia w nim podstawy naukowe rozprawy. Doktorantka omawia charakterystykę choliny, w tym właściwości chemiczne, źródła pokarmowe i jej spożycie, czynniki wpływające na zapotrzebowanie choliny oraz funkcje biologiczne i metabolizm. Dalej przedstawia proces gromadzenia lipidów w wątrobie. Doktorantka znaczną uwagę poświęca charakterystyce fitoestrogenów opisując ich budowę, funkcję i źródła oraz metabolizm. Całość zamyka rozdział dotyczący soi oraz niealkoholowego stłuszczenia wątroby. Na podkreślenie zasługuje szczegółowy opis poszczególnych zagadnień. Wartościowym elementem przeglądu piśmiennictwa jest również opis mechanizmów działania. Piśmiennictwo wykorzystane w tym rozdziale jest starannie dobrane, z czego część prac pochodzi z ostatnich 5 lat.

W rozdziale **Cel pracy i zakres pracy** Doktorantka postawiła trzy hipotezy badawcze. Podaje również cel główny oraz cztery cele szczegółowe. Cel został sprecyzowany w sposób jasny i klarowny. Na uznanie zasługuje fakt, że Doktorantka szczegółowo zdefiniowała problemy badawcze, a nie tylko lakonicznie określiła cel pracy.

Ocena metodologii badań

W pierwszym podrozdziale tej części pracy Doktorantka przedstawiła opis doświadczenia żywieniowego (badania *in vivo*), ocenę spożycia diet oraz składu ciała. W badaniach wykorzystwała albinotyczne samice szczura szczepu Wistar. Następnie Autorka przedstawiła procedurę pobierania próbek krwi i tkanek oraz opisała ocenę histologiczną wątroby, analizę wybranych parametrów biochemicznych, oznaczenia zawartości tłuszczu w kale, analizę poziomu ekspresji genów, oznaczanie białek metodą Western Blot oraz metodą ELISA. Ze szczegółowego opisu wynika, że w pobranym materiale biologicznym wykonała za pomocą analizatora Konelab 20i następujące oznaczenia: profil lipidowy, tj. cholesterol całkowity, cholesterol frakcji HDL oraz LDL, triacyloglicerole (TG), glukozę, enzymy wątrobowe. W surowicy oznaczyła stężenie VLDL metodą ELISA. W pobranych próbkach wątroby metodą kolorymetryczną oznaczyła stężenie fosfatydylocholiny. Doktorantka oznaczyła zawartość tłuszczu w zebranych kale metodą Soxhleta (Soxtec Avanti 2055). W wątrobie wykonała również analizę poziomu ekspresji genów *Pemt*, *Ppar γ* , *Srebp-1c*, *Fasn*. Oznaczyła również białka *PEMT*, *PPAR γ* metodą Western Blot oraz *SREBP-1* i *FAS* metodą ELISA. W ostatnim podrozdziale Doktorantka przedstawia zastosowane metody statystycznej analizy wyników. Metodyka wykonanych analiz została bardzo szczegółowo opisana. W mojej opinii dobór metod był na ogół właściwy w stosunku do założonego celu, zarówno w zakresie analiz chemicznych, jak i badań *in vivo*.

W tej części pracy nasuwają się pewne wątpliwości/spostrzeżenia.

- Brakuje wyjaśnienia, jak dawki dobrane na podstawie literatury dla populacji azjatyckiej mają się do populacji europejskiej. Autorka jedynie wspomina o tym w przeglądzie literatury (str 39).
- Nie jest do końca zrozumiałe bilansowanie diety, a mianowicie dlaczego w grupie z deficytem choliny w diecie zwierzęta otrzymują większą ilość sacharozy (102.5g vs 100g) (str. 53).
- Brakuje w tym rozdziale wyjaśnienia, dlaczego w diecie podawano olej słonecznikowy? Częściowe wyjaśnienie dotyczące źródła tłuszczu pojawia się dopiero w dyskusji (str. 92). Nie jest jednak prawdą, że AIN-93M w oryginalnej wersji zawiera olej słonecznikowy. W oryginalnej pracy dotyczącej diety

(Revees i in. 1993) zarówno w diecie dla zwierząt rosnących (AIN-93G), jak i dorosłych (AIN-93M) źródłem tłuszczu jest olej sojowy.

- Zastanawiające jest zastosowanie diety AIN-93M w żywieniu 8-tygodniowych szczurów. Czy rosnące zwierzęta nie powinny otrzymywać AIN-93G?
- Nie jest jasne, dlaczego Doktorantka zastosowała odstawienie diety na 12h? Najczęściej stosuje się 4h okres głodzenia zwierząt przed zakończeniem doświadczenia.
- Czy stosując analizę statystyczną Doktorantka nie powinna opisać interakcji między grupami?
- Doktorantka powinna rozważyć wykonanie barwienia ORO w celu oceny stłuszczenia wątroby.

Ponieważ w przewodzie pokarmowym, w wyniku działania specyficznych enzymów drobnoustrojów na cholinę, fosfatydylocholinę oraz L-karnitynę powstaje trimetyloamina (TMA), która jest przekształcana w wątrobie do tlenku N-trimetyloaminy (TMAO) przez enzymy z rodziny FMO, spośród których najbardziej aktywna jest monooksygenaza flawinowa 3 (FMO3) pojawia się istotne pytanie czy nie warto byłoby w przyszłości zbadać np. poziom FMO3 bądź skład mikrobioty?

Ocena prezentacji, interpretacji i dyskusji wyników

Pani mgr Ewelina Żuk przedstawiła uzyskane wyniki w sposób przejrzysty i na ogół właściwie je zinterpretowała. Rezultaty badań zostały przedstawione w formie wykresów, w sposób czytelny i zrozumiały. Warto podkreślić, że cała analiza uzyskanych rezultatów została przeprowadzona bardzo wnikliwie i starannie.

Pierwsze podrozdziały tej części pracy przedstawiają wyniki parametrów ogólnozywieniowych i wzrostowych. W dalszej kolejności Doktorantka opisała wyniki dotyczące analizy składu ciała zwierząt, oceny zmian w wątrobie, analizy parametrów biochemicznych i oznaczenia zawartości tłuszczu w próbkach kału oraz analizy poziomu ekspresji genów. Oceniając rozdział „Wyniki” należy podkreślić szczegółowy opis uzyskanych rezultatów.

W tym rozdziale również nasuwają się następujące spostrzeżenia oraz uwagi.

- Nie jest zrozumiałe, dlaczego Doktorantka opisując wyniki I etapu doświadczenia porównuje wszystkie grupy z etapu II. Zgodnie ze schematem w I etapie eksperymentu zwierzęta żywiono przez 4 tygodnie tylko dwoma dietami, tj. CD i ChoIDD, a czynniki żywieniowe zgodnie z przedstawionym schematem wprowadzone były po 4 tygodniach żywienia (po I etapie).

- Przeprowadzając analizę histologiczną wątroby szczurów Autorka dokonała oceny makroskopowej, która to nie wykazała wyraźnych różnic. Nie podaje Ona jednak, jakie parametry brała pod uwagę. Pani mgr Ewelina Żuk nadmienia również, że przygotowane preparaty pozwoliły na „pogłębione analizy histologiczne”. Nie jest wyjaśnione co oznacza to stwierdzenie.

- Doktorantka w rozdziale „Wyniki” powtarza metodykę badań, co nie jest to konieczne. Wprowadza to tym samym niepotrzebne zamieszanie. Nie wiadomo bowiem, czy skrawki wątroby były krojone na 5 czy 6 μM (Autorka pisze 6 μM). Szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o wykonanie analizy profilu kwasów tłuszczowych w wątrobie czy barwienia ORO pozwalającego na ocenę stopnia stłuszczenia wątroby.

- Mając wyniki profilu lipidowego warto obliczyć wskaźnik aterogenności (wskaźnik miażdżycowy). Jest to termin stosowany w medycynie, który służy do określenia wzajemnych stosunków pomiędzy lipidami występującymi we krwi.

- Doktorantka na Ryc.21 pokazuje zawartość tłuszczu surowego w próbkach kału. Nie jest opisane których próbek to dotyczy. Doktorantka bowiem prowadziła zbiórkę kału przez okres 7 dni. Czy zbierane próbki były uśredniane? Czy zwierzęta były w klatkach metabolicznych?

Kolejny rozdział **Dyskusja** obejmuje 14 stron. Pani mgr Ewelina Żuk w rozdziale tym wykazała się znajomością problematyki i umiejętnością wykorzystania literatury naukowej. Zachowanie kolejności dyskusowania wyników zgodnie z sekwencją opisaną w rozdziale „Materiał i metody” oraz ich opisem w rozdziale Wyniki wpływa pozytywnie na przejrzystość tej części pracy. W omawianym rozdziale Doktorantka głównie porównuje uzyskane rezultaty z wynikami prac innych badaczy koncentrując się jednocześnie na ocenie przyczyn i mechanizmów stwierdzonych zależności. O dojrzałości naukowej Doktorantki świadczy również wskazanie w dyskusji brakujących zasadnych cennych analiz mogących poszerzyć możliwości wnioskowania i planów analiz w kolejnych doświadczeniach dotyczących poruszanej tematyki.

- Autorka w swoich badaniach wykazała brak istotnych różnic w stężeniu fostatydylcholine w wątrobie oraz białka SREBP-1 pomiędzy grupami CD-ISO a CHOLDD-ISO. Jaki może być tu mechanizm działania?

- Wydaje się, że lepszym stwierdzeniem byłoby grupa porównawcza niż tło porównawcze (str. 92);

- Wyjaśnienia dotyczące wyboru modelu zwierzęcego powinno się znaleźć w rozdziale materiały i metody.

Ocena wnioskowania

Na podstawie otrzymanych wyników sformułowano 3 wnioski. Przedstawiają one najważniejsze rezultaty badań w kontekście założonego celu. Stanowią więc raczej podsumowanie przeprowadzonych badań.

Ocena wykorzystanej bibliografii

W pracy skorzystano z 207 pozycji literatury. Większość z nich to oryginalne prace twórcze, a 44 cytowane prace (21%) opublikowano w ostatnich 5 latach. Na uwagę zasługuje więc zarówno trafny dobór źródeł oraz ich aktualność.

Rolą recenzenta jest wskazanie uchybień, których Doktorantka się nie ustrzegła w swojej pracy.

- Zarówno w streszczeniu (str. 9, 10), jak i w teksie rozprawy (str. 34, 35, 52, 63, 65, 66, 67, 91, 92, 93, 94, 98, 100 itd.) Autorka podaje, że zwierzęta spożywały karmę. W badaniach na zwierzętach stosuje się raczej określenia dieta, dlatego sugeruję ograniczanie sformułowań typu „karma”. Również należy stosować określenie „żywienie” a nie „karmienie” (str. 34, 39, 45, 71, 96, 100).

- Stwierdzenie „szlaki związane z układem immunologicznym” wymaga przeredagowania, ponieważ nie jest zrozumiałe.

- W pracy pojawiły się drobne błędy stylistyczne (np. z w dietą str. 19, oraz w zawartość str. 50, dostępność cholicy i acetylo-CoA wpływa acetylo-CoA na aktywność str 22; jest wydalana z żółcią, z którą poprzez krążenie wątrobowo-jelitowe i zostaje zawrócona do jelita str. 40, wśród poszczególnych populacjach str 41). Dodatkowo formatowanie nie zawsze jest prawidłowe (np. str. 63).

Jednocześnie stwierdzam, że uchybienia te są niewielkie i nie mają wpływu na wartość pracy.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi wartościowe opracowanie naukowe, świadczące o dobrym przygotowaniu merytorycznym i warsztatowym Pani mgr Eweliny Żuk. Autorka określiła problemy badawcze, sformułowała cel pracy, sprecyzowała metodologię badań. W efekcie uzyskała wiele wartościowych wyników oraz dokonała prawidłowej ich interpretacji.

Podsumowując moją ocenę przedstawionej pracy doktorskiej pragnę podkreślić, że zarówno dobór tematu pracy doktorskiej, jak i jej zakres, cele poznawcze oraz użyteczne są prawidłowe. Ogólnie zarysowana teza naukowa pracy jest nowatorska. Użyty w pracy doktorskiej metodyczny warsztat naukowy jest adekwatny i pozwala na prawidłową realizację postawionych celów badawczych. Szeroki wachlarz analiz zastosowanych w pracy (od biochemicznych, poprzez histologiczne a kończąc na molekularnych) jest zgodny z wykształceniem Doktorantki i pokazuje Jej bardzo dobre przygotowanie do dalszej pracy naukowej. Podkreślić należy również potencjalny aspekt aplikacyjny pracy. Podejmowanie badań mających na celu określenie mechanizmów molekularnych wzbogaca istniejący stan wiedzy. Tym samym daje również nadzieję na praktyczne wykorzystanie tej wiedzy. Dodatkowo poziom edytorski pracy należy ocenić jako wysoki. Nieliczne uwagi/spostrzeżenia zawarte w recenzji w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy.

Z pełnym przekonaniem i w świetle powyższych danych stwierdzam, że recenzowana praca mgr Pani mgr Eweliny Żuk spełnia warunki określone art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.).

Zatem mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Technologii Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wnioszek o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Żuk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie Technologii Żywności.

