

Olsztyn, dnia 27 lipca 2023

Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Katedra Biochemii Żywności
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Pl. Cieszyński 1
10-726 Olsztyn
e-mail: ami@uwm.edu.pl
tel./fax.: 89 523 37 22

Recenzja pracy doktorskiej

pt.: *„Wpływ resweratrolu i sprzężonych dienów kwasu linolowego na ekspresję wybranych genów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych w adipocytach 3T3-L1”* wykonanej przez mgr. inż. Jarosława Oczkowicza w Katedrze Żywienia Człowieka, Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Anety Kopec (promotora) oraz dr hab. inż. Anety Koronowicz, prof. URK (promotora pomocniczego)

Podstawa prawna: pismo dr. hab. inż. Marcina Łukasiewicza, prof. URK (DTŻ 520.33.235.2023) z dnia 05 czerwca 2023 roku - Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, w związku z uchwałą Nr 66/2023 ww. Rady w sprawie wyznaczenia mnie na recenzenta przedłożonej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie podjęcia badań

Otyłość jest zaliczana do tzw. przewlekłych chorób niezakaźnych (kod e662 w Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych), której konsekwencjami są m. in. powikłania w postaci występowania cukrzycy typu 2, nadciśnienia tętniczego, chorób układu krążenia i wątroby, bezdechu sennego oraz niektórych nowotworów. Według danych opublikowanych na stronie Narodowego Funduszu Zdrowia (maj 2022) trzech na pięciu Polaków ma nadwagę, co czwarty jest otyły, a za sześć lat otyły będzie co trzeci Polak. Z kolei World Obesity Federation szacuje, że w ciągu kolejnych 12 lat na nadwagę lub otyłość będzie cierpieć ponad 51 % populacji ludzkiej.

Przyczynami otyłości mogą być uwarunkowania genetyczne, psychologiczne, czy środowiskowe. Dwa ostatnie związane są z tzw. trybem życia, na który składa się brak aktywności ruchowej, siedzący tryb życia, czy nieprawidłowo zbilansowane posiłki. Zatem odpowiednia dieta, bogata w związki biologicznie aktywne żywności, może wpływać na metaboliczne procesy organizmu, regulując mechanizmy redukcji tkanki tłuszczowej.

Mgr inż. Jarosław Oczkiewicz poszukuje odpowiedzi na postawiony problem badawczy, tj.: czy połączone działanie związków bioaktywnych o znanych właściwościach (sprężone dieny kwasu linolowego oraz resweratrolu) będzie miało pozytywny wpływ na procesy blokowania biosyntezy tłuszczów lub zwiększenie efektywności spalania (β -oksydacji) kwasów tłuszczowych, co może wspomagać obniżenie masy ciała. W osiągnięciu tego celu ma być pomocna analiza ekspresji genów fibroblastów 3T3-L1 zróżnicowanych w dojrzałe adipocyty.

Takie ujęcie zagadnienia stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, a sama tematyka pracy jest niezwykle aktualna. Problem otyłości nasila się w skali globalnej, zatem podjęte badania stanowią przyczynek do poszerzenia wiedzy na temat roli wymienionych składników diety na metabolizm tłuszczów.

Ocena formalna

Praca doktorska mgr. inż. Jarosława Oczkowicza to 262 strony komputeropisu. Jest starannie ilustrowana: zawiera 57 rycin, 22 fotografie oraz 24 tabele. Autor cytuje 403 pozycje piśmiennictwa tematycznie odpowiadające omawianej problematyce. Blisko 85% cytowanych prac to publikacje anglojęzyczne, z czego 35 % to opracowania z ostatnich 10 lat. Dysertację poprzedza streszczenie, które w przejrzysty sposób wprowadza czytelnika w temat. W pracy zamieszczono wykaz skrótów i oznaczeń, co ma ułatwić jej czytanie. Nie mogę tego w pełni potwierdzić. Wykaz ten zawiera wybrane skróty. Dodatkowo w poszczególnych rozdziałach pracy Doktorant w zasadzie stosuje same skróty. Przy ich dużej liczbie – poza powszechnie znanymi (typu CoA, MUFA, TG etc.) - lepiej byłoby co jakiś czas powtórzyć (przypomnieć czytelnikowi) pełną nazwę np. enzymu, związku chemicznego, odczynnika itd.

W pracy znalazłam kilka anglicyzmów oraz drobnych błędów stylistycznych, niemniej uważam, że jest ona napisana niezwykle starannie z dbałością o szatę graficzną.

Ocena merytoryczna

Praca ma typowy układ dla opracowań mających formę monografii. Jest poprzedzona wstępem przybliżającym wprowadzenie w wątki będące przedmiotem dysertacji. Obejmuje

on m. in. charakterystykę tkanki tłuszczowej, metabolizm tłuszczów, opis działania sprzężonego kwasu linolowego oraz resweratrolu oraz charakterystykę genów związanych z metabolizmem tłuszczów. W przypadku składania do druku pracy przeglądowej, sugerowałabym przemyślane stosowanie pojęć metabolizm czy katabolizm. Pojawiają się one już w tytule rozdziału nr 2.3 tj.: „Metabolizm i katabolizm kwasów tłuszczowych”. Katabolizm to także proces metaboliczny. Metabolizm jest definicją szerszą, na którą składają się procesy anaboliczne, kataboliczne oraz amfiboliczne. W tym miejscu proszę również Autora pracy o wyjaśnienie, dlaczego niektóre z genów zaangażowanych w metabolizm tłuszczowców wymagały szerszego opisu względem pokrótce scharakteryzowanych w Tabeli nr 1. Ponieważ procesy metaboliczne związane są z działaniem enzymów, zwrócę w tym miejscu uwagę, by w opracowaniach naukowych do nazwy systematycznej wymienianego enzymu dodawać jego numer EC nadany przez Komisję Enzymową. Jak wiadomo, potoczną nazwę enzymu tworzymy dodając do członu głównego przyrostek „-aza”. Istnieją związki jak flipazy odpowiedzialne za transport lipidów między błonami biologicznymi. Nie są to jednak enzymy. Nazwa enzymu wynika z prowadzonej przez niego reakcji (np. hydroliza), a nie fizycznego procesu (np. transport). Stąd podanie numeru EC enzymu jednoznacznie będzie wskazywać, o jakich enzymach (i związanych z nimi reakcjach) mowa.

W rozdziale „Sformułowanie problemu badawczego” mgr inż. Jarosław Oczkowicz stawia trzy pytania, mianowicie: 1) jaki wpływ na zahamowanie adipogenezy będzie miało połączone działanie dienów sprzężonego kwasu linolowego z resweratolem w porównaniu do ich pojedynczego działania; 2) jakie będzie działanie ww. związków bioaktywnych w warunkach stresu oksydacyjnego oraz 3) na jakie szlaki metabolizmu kwasów tłuszczowych działają te związki (w mieszaninie oraz pojedynczo). Prowadzą one do dwóch hipotez badawczych (w uproszczeniu):

1. mieszanina dwóch ww. związków ma silniejszy wpływ niż każdy z nich oddzielnie na: hamowanie ekspresji genów związanych z biosyntezą tkanki tłuszczowej, nasilenie ekspresji genów odpowiedzialnych za β -oksydację kwasów tłuszczowych oraz nasilenia transkrypcji genów zaangażowanych w proces lipolizy kwasów tłuszczowych
2. adipocyty w warunkach stresu oksydacyjnego traktowane mieszaniną dienów sprzężonego kwasu linolowego z resweratolem, będą wykazywać co najmniej taki sam efekt jak w przypadku hodowli w warunkach standardowych.

Z tak sformułowanego problemu badawczego wynikają dwa cele cząstkowe, które de facto stanowią powtórzenie hipotezy badawczej.

Rozdział „Materiały i metody”, a zwłaszcza podrozdział „Opis prowadzonych badań” wprowadza w zakres zaplanowanego doświadczenia – mógłby z powodzeniem zostać zastąpiony schematem postępowania. Niemniej przedstawienie wymienionego rozdziału w formie opisowej nie jest żadnym uchybieniem. Przy opracowaniu publikacji na temat podjęty w pracy doktorskiej i opisywaniu części metodycznej, zwracam uwagę na podawanie prawidłowych nazw stosowanych odczynników. Np. AAPH to nie jest 2,2'-azobis (strona 45. pracy), lecz dichlorowodorek 2,2'-azobis (2-metylopropionamidyny) lub 2,2'-azobis(2-metylopropionamidine) dihydrochloride (w języku angielskim). Przedstawione opisy metod są szczegółowe, pozwalające na odtworzenie eksperymentu przez innych naukowców. Niemniej, czytając ich treść odniosłam wrażenie, że opisywane metody są autorskie – nie znalazłam odnośników literaturowych, na które Autor się powołałby się wykonując określony eksperyment (wyjątek: „zawartość białka metodą Smitha” - strona 52, ale bez zacytowania adekwatnej publikacji: Smith i in., 1987. Anal. Biochem., 150, 76-85). Dlatego proszę, by podczas prezentacji autoreferatu, Doktorant zacytował artykuły, z których korzystał, przygotowując eksperymenty (tam, gdzie jest to uzasadnione). Proszę również o uszczegółowienie, jaki jon Doktorant nazywa miedziowym (archaizm).

Zastosowana metoda statystyczna jest adekwatna, jak również oprogramowanie (GraphPad Prism), służące do prostych, jak i bardziej zaawansowanych obliczeń statystycznych.

Rozdział „Wyniki” jest opisany syntetycznie (w relacji do dużej liczby danych), co ułatwia śledzenie obserwacji dokonanych przez Autora pracy. Wprawdzie nie istnieją rekomendacje odnośnie sposobu omawiania wyników w odniesieniu do rezultatów uzyskanych przez innych autorów, to zaletą monografii mgr. inż. Jarosława Oczkowicza jest oddzielenie rozdziału „Wyniki” od „Dyskusji otrzymanych wyników”. Jest to rezultat dużej liczby zgromadzonych danych, różnych „ścieżek eksperymentu” (wpływ dienów kwasu linolowego oraz resweratrolu razem i osobno; ekspresja genów w procesach biosyntezy i rozpadu; warunki standardowe oraz wywołanie stresu oksydacyjnego). Na podstawie dyskusji wyników stwierdzam, że Doktorant posiada umiejętność krytycznego myślenia, poszukuje rozwiązań, widzi konsekwencje prowadzonych badań (umiejętność wnioskowania).

Pracę doktorską podsumowują stwierdzenia częściowo potwierdzające postawione hipotezy oraz wniosek, że mieszaniny: resweratrol - kwas trans10-cis12 CLA oraz resweratrol

– kwas cis9-trans11 CLA oraz trans10-cis12 CLA działają silniej (niż wymienione składniki osobno) na zmiany ekspresji genów związanych z anabolizmem i katabolizmem kwasów tłuszczowych, co skutkuje przesunięciem równowagi metabolicznej w adipocytach 3T3-L1 w kierunku lipolizy oraz β -oksydacji kosztem osłabienia biosyntezy kwasów tłuszczowych.

Stwierdzam, że cel pracy został osiągnięty. Przedstawiona do oceny praca pogłębia wiedzę na temat wpływu składników diety, jakim są resweratrol i dieny sprzężonego kwasu linolowego na mechanizmy ekspresji genów związane z metabolizmem kwasów tłuszczowych. Za dodatkowy sukces Autora, osiągnięty dzięki „układowi doświadczenia”, uważam zbadanie wpływu cis-9-trans-11 CLA na ekspresję genów i zawartość białek związane z metabolizmem tłuszczowców, z wykorzystaniem adipocytów 3T3-L1. Jak sam Autor zauważył (s. 115), poza jedną publikacją, nie ma innych prac na ten temat. Te, które zostały opublikowane dotyczyły wpływu ww. związku na metabolizm węglowodanów. Dlatego odczuwam pewien niedosyt w kwestii wskazania tych rezultatów, które zdaniem Doktoranta są nowatorskie lub poszerzają aktualny stan wiedzy na temat synergistycznego/osobnego działania wymienionych związków bioaktywnych w regulacji metabolizmu tłuszczowców. Proszę Autora o opinię na ten temat.

Podsumowując, rozprawa mgr. inż. Jarosława Oczkowicza stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a Kandydat ubiegający się o stopień doktora nauk rolniczych wykazuje wiedzę w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Moje uwagi nie umniejszają wartości naukowej pracy doktorskiej, wskazują na aspekty, na które należałoby zwrócić uwagę, przygotowując artykuły do opublikowania.

Na koniec chciałabym, by podczas publicznej obrony, Doktorant odpowiedział na pytanie: *jakie metody bioinformatyczne (i w jakim celu) mógłby Pan zaproponować w swoich badaniach?* Jak wiadomo, w badaniach naukowcy coraz częściej stosują metody *in silico*. Dotyczy to również zagadnień związanych m. in. z ekspresją genów czy przewidywaniem właściwości związków biologicznie czynnych.

Ocena kwalifikacyjna i wniosek końcowy

Na podstawie dysertacji wyrażam pogląd, że Doktorant jest osobą przygotowaną do prowadzenia badań, dysponuje wieloaspektową wiedzą w obszarze przedstawianego zagadnienia oraz umie prezentować wyniki swoich obserwacji i formułować wnioski. Ponadto Autor wykazał się umiejętnością krytycznej analizy swoich wyników w odniesieniu do prac innych autorów.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. inż. Jarosława Oczkowicza pt.: „*Wpływ resweratrolu i sprzężonych dienów kwasu linolowego na ekspresję wybranych genów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych w adipocytach 3T3-L1*” spełnia wymogi stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora zawarte w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. 2017 r., poz. 1789). W związku z art. 179 ust. 1 oraz ust. 3 pkt 1 oraz pkt 2 lit. b ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku *Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669) zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie z wnioskiem o **dopuszczenie Pana mgr. inż. Jarosława Oczkowicza do dalszych etapów postępowania.**

A. Iwaniak