



Wrocław 01. 09. 2019 r.

dr hab. inż. Monika Bronkowska, prof. nadzw. UP

Katedra Żywienia Człowieka

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

pracy doktorskiej

pt.: „Apoptoza komórek czerniaka indukowana przez kwasy tłuszczowe żółtka jaja biofortyfikowanego w sprzężone dniy kwasu linolowego (CLA)”

wykonanej przez mgr Dominika Domagałę

w Katedrze Żywienia Człowieka

Wydziału Technologii Żywności

Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kollątaja w Krakowie

pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Teresy Leszczyńskiej

oraz dr hab. Anety Koronowicz

Ocena wyboru tematu

Czerniak należy do najbardziej złośliwych nowotworów człowieka, charakteryzuje się systematycznie wzrastającym współczynnikiem zachorowalności i jest nadal wyzwaniem dla współczesnej onkologii. Pomimo postępów, jakie dokonały się w dziedzinie zarówno profilaktyki, diagnostyki, jak i biologii molekularnej, praktyczne wykorzystanie tej wiedzy wciąż jest niewielkie, a problem stanowią również ograniczone możliwości leczenia. Brak skutecznej metody leczenia wymaga poszukiwania różnych ścieżek terapeutycznych. Postępowanie powinno być indywidualne.



Sprężone kwasy linolowe (CLA, conjugated linoleic acids) obejmują grupę pozycyjnych i geometrycznych izomerów kwasu linolowego (oktadekadienowego), których cechą charakterystyczną jest obecność w cząsteczce układu wiązań podwójnych, "sprężonych" - zlokalizowanych blisko siebie, co odróżnia je między innymi od kwasu linolowego. Za pierwotne źródło CLA uważa się bakteryjne procesy biohydrogenacji kwasu linolowego w żwaczach zwierząt przeżuujących, w wyniku których wytwarzane są izomery, które wraz z krwią transportowane są do tkanki tłuszczowej i mleka. Wykazano istnienie wielu różnych izoform CLA. Przyjmuje się, że za ich aktywność biologiczną odpowiada przede wszystkim izomer cis-9, trans-11, stanowiący około 80% całkowitej puli CLA w mięsie wołowym oraz izomer trans-10, cis-12, będący główną izoformą syntetycznie otrzymanego CLA. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały także interakcję CLA z układem odpornościowym przejawiającą się wzrostem aktywności limfocytów oraz produkcji przeciwciał odpornościowych. Ponadto, wyniki licznych badań wskazują na potencjalne właściwości przeciwnowotworowe tej grupy związków. Jako jedyne ze wszystkich kwasów tłuszczowych zostały uznane w 1985 roku przez Amerykańską Akademię Nauk (National Academy of Sciences of USA) za związki o zdolności hamowania kancerogenezy u zwierząt. Od odkrycia właściwości antymutagennych CLA wykazano, że suplementacja izomerami tego związku przeciwdziała skutecznie procesom nowotworowym na różnych modelach zwierzęcych. Do potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za ten efekt należą: modulacja produkcji eikozanoidów, ingerencja w szlaki sygnalizacji komórkowej, hamowanie syntezy DNA oraz promowanie apoptozy. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że suplementacja CLA zmniejsza stężenie czynnika wzrostu śródbłonnka naczyń (VEGF, vascular endothelial growth factor) oraz podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF, basic fibroblast growth factor). Obniża ponadto stężenie cyklin D i A oraz stymuluje ekspresję białka p53. W kilku badaniach eksperymentalnych wykazano, że CLA hamuje rozwój chemicznie indukowanych nowotworów sutka, skóry, okrężnicy, żołądka, jelita grubego. Obserwowano zależność pomiędzy siłą hamowania onkogenezy a ilością podawanej mieszaniny izomerów.

Innym ważnym aspektem, który częściowo został także podjęty w ocenianej rozprawie doktorskiej jest znaczenie suplementów diety w sposobie żywienia i stylu życia Polaków. W



ostatnich latach rynek suplementów gwałtownie wzrósł. Szacuje się, że około 20% populacji w Polsce stosuje suplementy diety. Znaczenie suplementów diety dla zdrowia jest też ciągle badane i powoduje istotne różnice zdań wśród fizjologów, lekarzy, dietetyków i farmaceutów. Coraz częściej pojawia się też pytanie o bezpieczeństwo ich stosowania. W ostatnich latach obserwuje się stały, bardzo szybko narastający, wzrost zażywania suplementów diety. Dotyczy to zarówno osób zdrowych, jak i chorych. Bardzo często po suplementy diety sięgają osoby uprawiające sport, ludzie starsi oraz żyjący w szybkim tempie, niemający czasu na racjonalne żywienie. Niektóre suplementy stosowane są także jako uzupełnienie farmakoterapii bądź też z zamiarem poprawienia urody lub wyglądu skóry.

I ostatni aspekt to podjęcie tematyki i zagadnień związanych z charakterystyką i oceną wpływu na organizm żywności o cechach funkcjonalnych.

Z tego względu uważam, że podjęte przez Doktoranta badania, charakteryzowane w ocenianej dysertacji naukowej nad przeciwnowotworowymi działaniami CLA, wydają się istotnym faktem i zachęcają do poszerzania badań pozwalających określić mechanizmy oddziaływania izomerów CLA na organizm.

W ciągu roku na czerniaki skóry umiera w Polsce ponad tysiąc osób. Oprócz znacznej śmiertelności niepokój budzi także utrzymujący się wzrost zachorowalności, która ulega podwojeniu co 10 lat. Umieralność z powodu czerniaka jest największa w grupie chorych w wieku poniżej 30 lat, a mediana wieku zachorowania jest podobna dla obu płci i wynosi 51 lat. W tym względzie badania podjęte przez mgr Dominika Domagałę są w pełni aktualne i uzasadnione.

Celem przedstawionej do recenzji dysertacji doktorskiej było określenie, *in vitro*, nieprzebadanych dotychczas mechanizmów potencjalnie przeciwnowotworowego działania mieszaniny kwasów tłuszczowych, wyekstrahowanych z żółtek jaj kurzych wzbogaconych w sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA), w odniesieniu do ludzkich nowotworowych komórek czerniaka linii WM793 i 1205Lu oraz prawidłowych komórek fibroblastów linii BJ, stanowiących kontrolę. Cel badań, poprzedzony sformułowaniem logicznych celów szczegółowych i hipotez, został w jasny sposób sformułowany i w pełni zrealizowany.



Ocena bibliografii i znajomości tematu na tle piśmiennictwa

Bibliografia pracy obejmuje 218 publikacji naukowych starannie dobranych i wyselekcjonowanych ze zbiorów piśmiennictwa polskiego i światowego, należy zwrócić uwagę iż publikacje anglojęzyczne mają znaczny udział (ok. 80%). Cytowane piśmiennictwo obejmuje aktualne informacje dotyczące opracowywanego przez Doktoranta tematu. Dodatkowo w pracy wykorzystano i prawidłowo zacytowano materiał z 7 stron internetowych. Uwaga Recenzenta dotyczy potrójnego zacytowania poz. 154, 155 i 156 to ta sama pozycja literaturowa. Dodatkowo pozycje: 13, 26, 96, 167 nie zostały wykorzystane w tekście dysertacji.

W części teoretycznej pracy, w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo, Doktorant wyczerpująco omówił m.in. przyczyny powstawania, rozwoju oraz podział nowotworów, procesy apoptozy. Doktorant przedstawił także interesujące informacje dotyczące historii i znaczenie wzbogacania żywności. Zbyt pobieżnie, w opinii Recenzenta, opracowano ten rozdział. Zdaniem Recenzenta ten aspekt powinien być szczególnie podkreślony i rozwinięty, gdyż mocno nawiązuje do zasadniczego tematu przedstawionej do recenzji dysertacji.

Warto jednak podkreślić, że Doktorant w szczegółowy i bardzo interesujący, w oparciu o bardzo dobrze dobrane piśmiennictwo omówił i scharakteryzował prozdrowotne właściwości kwasów CLA. Ten rozdział został przygotowany w bardzo dojrzały sposób. Doktorant podkreślił to, co najważniejsze w mechanizmach fizjologicznych człowieka. Dodatkowo istotnym jest, że charakterystyka prozdrowotnych właściwości CLA zostało opisane w kilku podrozdziałach: właściwości przeciwnowotworowe, działanie przeciwcukrzycowe, modulacja metabolizmu w cukrzycy typu 2, działanie przeciwmiażdżycowe, wpływ CLA na układ odpornościowy, istotnym jest także wpływ kwasów CLA zmniejszenia poziomu tkanki tłuszczowej i metabolizmu lipidów, Podsumowując doktorant przedstawił skuteczne uboczne nadmiernego spożywania CLA.



Ocena strony formalnej pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera 146 stron tekstu wraz ze spisem piśmiennictwa, tabel, rysunków i aneksami. Dokumentacja wyników obejmuje 10 tabeli oraz 23 rycin. Tekst pracy został podzielony na 6 części z uwzględnieniem właściwych proporcji treści pomiędzy nimi. Obszerna dokumentacja wyników została częściowo przedstawiona w tekście pracy. Przy tak dużej liczbie informacji jest to dobre wyjście ułatwiające ich percepcję. Ciekawym atutem pracy jest próba oceny możliwości aplikacyjnych pracy.

Należy podkreślić, że przedstawiona do recenzji praca została przez Doktoranta napisana starannie, w sposób poprawny i zrozumiały. Doktorant samodzielnie opracował cały materiał biologiczny, który to bardzo dokładnie przygotował do prowadzenia działań badań zasadniczych. Warty podkreślenia jest wykorzystanie zaawansowanych metod analitycznych w realizacji dysertacji naukowej.

Ocena merytoryczna pracy

Celem przedstawionej do recenzji dysertacji doktorskiej było określenie, *in vitro*, nie przebadanych dotychczas mechanizmów potencjalnie przeciwnowotworowego działania mieszaniny kwasów tłuszczowych, wyekstrahowanych z żółtek jaj kurzych wzbogaconych w sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA), w odniesieniu do ludzkich nowotworowych komórek czerniaka linii WM793 i 1205Lu oraz prawidłowych komórek fibroblastów linii BJ, stanowiących kontrolę. Cel badań, poprzedzony sformułowaniem logicznych celów szczegółowych i hipotez, został w jasny sposób sformułowany i w pełni zrealizowany.

Doktorant bardzo dokładnie scharakteryzował sposoby analizy ekspresji genów, białek proliferacji. Dokonano oceny analizy statyczną i otrzymanych wyników. Warto podkreślić, że Doktorant bardzo dużo pracy poświęcił czasu na nabycie doświadczenia na wykonanie analizę ekspresji genów oraz ekspresji białek dwoma metodami : Metoda Western Blot i Metodą PathScan. Doktorant przeprowadził także dyskusję uzyskanych wyników. Napisana jest bardzo przejrzysto, z dobrym odniesieniem do innych autorów. Przedostatnią częścią pracy są



najważniejsze wnioski, które pokazują, że Doktorant umie konkretyzować obszerne i wielokierunkowe wyniki badań. Sformułowane przez Doktoranta wnioski podkreślają konieczność dalszych tego typów badań.

Uważam, że tak obszerne badania i uzyskane wyniki upoważniają w pełni Doktoranta do wykazania występowania istotnych lub nieistotnych zależności pomiędzy współoddziaływaniem różnych badanych czynników a znaczeniem kwasów CLA, jego suplementacji w aspekcie profilaktyki chociażby chorób nowotworowych o różnym podłożach.

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki stanowią obiecującą podstawę do badań, mających na celu poznanie wpływu nie tylko mieszaniny kwasów tłuszczowych wyekstrahowanych z żółtka jaja kurzego wzbogaconego CLA, ale również jej biotryfikowanych w CLA, jako produktu funkcjonalnego. Mającego potencjalny znaczenie w profilaktyce przeciwnowotworowej. Działanie poszczególnych kwasów CLA ich mieszanin na modele komórkowe jest coraz lepiej poznawane i opisane. Kolejne etapy badania powinny dotyczyć sprawdzenia właściwości przeciwnowotworowych *in vitro* na zwierzętach doświadczalnych, z równoczesnym poznawaniem ewentualnych właściwości niepożądanych.

Wyniki uzyskane w ocenie dysertacji naukowej dla mieszaniny kwasów tłuszczowych wyekstrahowanych z żółtka jaja niewzbogaconego w CLA, okazały się ciekawe i interesujące. Podobnie jak mieszanina kwasów tłuszczowych KT-CLA, jednak mieszanina K-T wykazuje jedynie tendencje propozycyjnych niektórych genów i białek.

Doktorant nie uniknął jednak kilku błędów gramatycznych, stylistycznych, interpunkcyjnych. Mimo tych nielicznych błędów praca jest bardzo estetyczna i dojrzałe przygotowana.

Posumowanie

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy ocenianej pracy, a więc przygotowanie badań i opracowanie teoretyczne tematu, przeprowadzenie oceny, wykonanie analizy: ekstrakcji kwasów tłuszczowych, analizy apoptozy, analizy ekspresji genów, białek. Warto docenić nakład pracy jaki został wykonany przez Doktoranta w ocenie wpływu mieszaniny kwasów tłuszczowych wzbogacenie w CLA. Metody badań wykorzystane w części doświadczalnej są



jednym z najnowocześniejszych tego rodzaju prac. Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością metod analitycznych, łatwością poruszania się w cystometriach i badaniach chromatograficznych. To zasługuje na duże uznanie.

Wykazane w recenzji uwagi i sugerowane zmiany mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają merytorycznego znaczenia wykonanych przez Doktoranta badań. Uważam, że praca ta wnosi nowe elementy poznawcze, rozszerza wiedzę z dziedziny żywienia człowieka o aspekt poznania, charakterystyki, znaczenia i istoty stosowania kwasów CLA w profilaktyce różnych schorzeń określanych jako niezakaźne choroby przewlekłe. Jednak należy pamiętać także, aby nie przekraczać norm w CLA w stosowaniu w postaci suplementów diety.

Praca doktorska mgr Dominika Domagały spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1. Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017r. poz.1789).

W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kollątaja w Krakowie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr Dominika Domagały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kollątaja w Krakowie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pt.: „Apoptoza komórek czerniaka indukowana przez kwasy tłuszczowe żółtka jaja biofortyfikowanego w sprzężone dni kwasu linolowego (CLA)” wykonanej przez mgr Dominika Domagałę.

Dr hab. inż. Monika Bronkowska, prof. nadzw.