

Prof. dr hab. inż. Joanna Wyka

Wrocław, dn. 26.04.2022r.

Katedra Żywienia Człowieka

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Piasna-Słupeckiej

pt. „Wpływ soku z młodych pędów buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris L.*) na mechanizmy apoptozy komórek nowotworowych gruczołu piersiowego” wykonanej pod kierunkiem promotora Pani prof. dr hab. inż. Teresy Leszczyńskiej oraz promotora pomocniczego Pani dr hab. Anety Koronowicz, prof. URK z Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Podstawa prawna: *pismo przewodniczącego Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie Pana dr hab. inż. Marcina Łukasiewicza (DTŻ 520-5-47/2022 z dnia 14.03.2022r.)*

Rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Piasna-Słupeckiej zatytułowana „Wpływ soku z młodych pędów buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris L.*) na mechanizmy apoptozy komórek nowotworowych gruczołu piersiowego”, została przedstawiona w postaci monografii, liczącej ogółem 190 stron tekstu, w tym 16 tabel oraz 25 rycin. W rozprawie wykorzystano prawidłowo

dobrane 276 pozycji piśmiennictwa, z których większość stanowiła publikacje anglojęzyczne wydrukowane w czasopismach o światowym znaczeniu.

Praca nie odbiega układem od opracowań o tym charakterze i składa się z części teoretycznej (wstęp, I rozdział z kilkunastoma podrozdziałami oraz celem głównym i szczegółowymi) oraz praktycznej (materiał i metody, analiza statystyczna, wyniki z ich omówieniem, dyskusja oraz wnioski). Struktura pracy jest komplementarna z treścią i stanowi logicznie połączenie zagadnień teoretycznych z metodologią oraz wykonywanymi analizami. Należy podkreślić bardzo szeroki zakres zaplanowanych i zrealizowanych w pracy doktorskiej badań, jednak nie wykraczający poza wymieniony wyżej tytuł.

Ocena wyboru tematu pracy

Wybór tematu rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Piasna-Słupeckiej należy uznać za trafny i oryginalny. Większość prac naukowych, których przedmiotem badań jest burak ćwikłowy, dotyczy przede wszystkim jego formy dojrzałej, wegetatywnej. Brakuje kompleksowych prac o właściwościach prozdrowotnych buraka na wczesnym etapie rozwoju, czyli młodych pędów. Pomimo dynamicznie rozwijających się gałęzi nauk medycznych wiedza nt. chemoprewencji i mechanizmów biologicznej aktywności buraka w tym pędów jest nadal niewystarczająca. Należy podkreślić, że pani Doktorantka otrzymała na zgłębienie tego zagadnienia grant NCN nr 2016/23/N/NZ9/01578.

Autorka w swojej dysertacji za główny cel uznała porównanie skuteczności w działaniu apoptotycznym na komórki nowotworowe gruczołu piersiowego nieprzebadanego do tej pory surowca, czyli młodych pędów buraka ćwikłowego w stosunku do jego formy wegetatywnej, korzenia. W pracy wyjaśniono mechanizmy na poziomie komórkowym i molekularnym z zastosowaniem wielu metod badawczych oraz szlaków biochemicznych związanych głównie z apoptozą komórki.

Doktorantka w części teoretycznej szczegółowo opisuje rys historyczny uprawy buraka ćwikłowego od starożytnej Grecji, Rzymu do współczesności w Niemczech oraz w Polsce. Ze szczególnym uwzględnieniem składu gatunkowego charakteryzuje zawartość licznych związków odżywczych oraz nieodżywczych i biologicznie czynnych w buraku ćwikłowym. Większość z nich ma charakter antyoksydacyjny i przeciwzapalny a przez to może chemicznie przeciwdziałać m.in.

starzeniu się organizmu. Jednak jak słusznie zauważa Autorka nie do końca poznany mechanizm przyswajania i metabolizowania związków o aktywności przeciwutleniającej sprawia, że przeniesienie wyników uzyskanych w modelach *in vitro* na model *in vivo* zobowiązuje do dużej ostrożności. W kolejnych częściach dysertacji doktorskiej Pani mgr Piasna-Słupecka szczegółowo opisuje powstanie nowotworu, z 3 etapami kancerogenezy (inicjacja, promocja, progresja) oraz czynnikami warunkującymi rozrost guza: stres oksydacyjny, stan zapalny, zaburzenia ekspresji genów. Bardzo ciekawie scharakteryzowano czynniki ryzyka raka piersi oraz mechanizmy apoptozy komórki warunkowane starzeniem się organizmu, infekcją, mutacją czy uszkodzeniem mechanicznym. Autorka zwraca uwagę na dwie kategorie możliwości zastosowania chemoprewencji na wielu etapach nowotworzenia zarówno jako czynników blokujących, jak i supresorowych. Podkreśla, że profilaktyka żywieniowa nowotworu powinna obejmować spożycie bogatych w biologicznie aktywne substancje produktów takich jak: czosnek, imbir, kurkuma, rośliny krzyżowe, zielona herbata oraz burak ćwikłowy. Natomiast w żadnym stopniu chemoprewencja jako kierunek w profilaktyce nowotworów nie może wiązać się z wyleczeniem zaawansowanych stadiów raka w tym guzów, rozsianych form nowotworu czy metastaz.

Cel pracy

Przyjęty cel główny badań, wynikający logicznie z przeglądu piśmiennictwa i odzwierciedlający temat rozprawy doktorskiej dotyczył porównania skuteczności przeciwnowotworowej młodych pędów buraka ćwikłowego vs. jego dojrzałej formy tzn. korzenia. Badania prowadzono na komórkach ludzkich nowotworu piersiowego hormonozależnej linii MCF-7 oraz hormononiezależnej MDA-MB-231 wraz kontrolą – linie komórek prawidłowych MCF-12A. Postawiono szereg hipotez badawczych i zweryfikowano zarówno cel główny, jaki cele szczegółowe, które m.in. dotyczyły składu pod względem zawartości związków polifenolowych młodych pędów buraka ćwikłowego oraz korzenia a także wyprodukowanych z nich soków – natywnego oraz strawionego w warunkach sztucznego układu pokarmowego. Oceniono wpływ wymienionych produktów na proliferację komórek nowotworowych oraz ich aktywność cytotoksyczną, żywotność. Ponadto dokonano weryfikacji hipotezy, że sok z pędów buraka ćwikłowego natywny i/lub strawiony istotnie wpływa na zwiększenie ekspresji genów i białek związanych z mitochondrialnym/receptorowym szlakiem apoptozy niż odpowiednio (natywny, strawiony) sok z korzenia buraka ćwikłowego. Sprawdzone również czy dwa warianty soku (pęd, korzeń buraka

ćwikłowego; natywny /strawiony) z podobnym nasileniem oddziałuje na linie komórek nowotworu gruczołu piersiowego (MCF-7 vs. MDA – MB- 231).

Material i metodyka

W analizie doświadczenia biologicznego wykorzystano szereg standardowych procedur i substancji chemicznych mających zastosowanie w uprawie buraka ćwikłowego, produkcji soku oraz hodowli tkanek ludzkich. Tak szeroki zakres badań wymaga szczegółowej wiedzy zarówno z rolnictwa, technologii żywności, jak i biologii oraz genetyki. Należy podkreślić wieloaspektowy warsztat badawczy Doktorantki, który świadczy o Jej dużym zaangażowaniu i umiejętnościach naukowych.

W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej zastosowano zróżnicowaną metodykę, min. dotyczącą analizy związków polifenolowych za pomocą chromatografu HPLC oraz trawienia i wchłaniania w sztucznym modelu układu pokarmowego oraz hodowli komórek ludzkich w odpowiedniej inkubacji. Na podkreślenie zasługuje znajomość metodyki związanej z oceną genetyczną badanego materiału (m.in. PCR w czasie rzeczywistym, BCA ilości białka, immunodetekcji).

Do opracowania wyników zastosowano bardzo złożoną procedurę statystyczną, która uwzględniała charakter danych, jak rozkłady cech zgodny z rozkładem normalnym i odpowiednio testy parametryczne, nieparametryczne.

Ocena bibliografii i znajomości problematyki na tle piśmiennictwa

Bibliografia przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej Pani mgr Eweliny Piasna-Słupeckiej zatytułowana „Wpływ soku z młodych pędów buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris L.*) na mechanizmy apoptozy komórek nowotworowych gruczołu piersiowego” obejmuje 276 prac naukowych. W świetle zebranej literatury Autorka pokrótce opisuje poszczególne rozdziały i podrozdziały, które zajmują kilka stron, a całość części teoretycznej zawarta została na 58 stronach. Informacje te zostały opisane krótko, zwięźle a czytelnik może rozszerzyć swoją wiedzę odnosząc się do spisu piśmiennictwa. Dysertację doktorską podzielono na 8 głównych części (numeracja arabska), w obrębie których opisano poszczególne podrozdziały. W tym bardzo szczegółowo analizę wyników (str. 85-142) i dyskusję (str. 142-153).

Ocena merytoryczna pracy

W pracy przedstawiono bardzo wszechstronne badania umożliwiające weryfikację hipotezy jak substancje biologicznie czynne z pędów buraka ćwikłowego wpływają na rozwój i ewentualne leczenie nowotworu piersi. Zadanie to wymagało kilku etapów wstępnych np. uprawa buraka (pędy, korzeń) a także próba stworzenia warunków przypominających układ pokarmowy, w którym sok z pędów czy korzenia zostaje trawiony i wchłonięty. Autorka określiła zawartość biologicznie aktywnych substancji (związków polifenolowych) w badanych próbach i starała się ocenić ich wpływ na rozwój, chemioprewencję oraz zmiany w ekspresji genów komórek nowotworowych gruczołu piersiowego. Doktorantka dokonała obszernej analizy wpływu soków z buraka na apoptozę komórek rakowych w układzie eksperymentu biologicznego, najpierw inkubując komórki, oceniając ich proliferację, cytotoksyczność, oznaczając ilościowo kwasy nukleinowe metodą spektrofotometryczną, syntetyzując cDNA i otrzymując lizaty komórkowe, aż w końcu analizując ekspresję białek za pomocą metody Western Blot. Całość eksperymentu przeprowadzono w bardzo logiczny sposób, uwzględniając wymagane powtórzenia i próby kontrolne. Wszystkie działania miały na celu zweryfikowanie hipotez czy wybrane warzywo a ściślej związki biologicznie aktywne o działaniu przeciwutleniającym, przeciwzapalnym, przeciwnowotworowym w nim zawarte, mogą stanowić chemoprewencję raka piersi. Autorka sama wskazuje jednak na trudności w takiej ocenie. Limitacje dotyczą zastosowania różnych odmian gatunkowych buraka (Rywal/inne), fizjologii układu pokarmowego jak strawiony/ niestrawiony sok, a także zastosowanie dwóch linii komórek raka hormonozależnej i hormononiezależnej. Doktorantka podkreśla, że należy mieć świadomość możliwego odmiennego działania pojedynczych związków w stosunku do oddziaływania kompilacyjnego wielu składników zawartych w badanym produkcie (soku). Wybór produktu jakim są młode pędy z buraka ćwikłowego uważam za wysoce trafny, również z uwagi na jego popularność i zastosowanie w polskiej kuchni, ale także w dietach wegetariańskich. Ponadto Polska jest czołowym producentem buraka ćwikłowego, aż 85% produkcji w skali Unii Europejskiej znajduje się w Polsce. Wartość odżywcza tego surowca jest wysoka, dotyczy to szczególnie związków polifenolowych w pędach i korzeniu. Badania pani Doktorantki wskazały ich statystycznie większe zawartości w pędach. W młodych pędach buraka ćwikłowego dominującym związkiem był kwas synapinowy z grupy kwasów hydroksycynamonowych w porównaniu do korzenia. Sok z młodych pędów i z korzenia buraka ćwikłowego w wersji natywnej i strawionej hamował proliferację komórek nowotworowych gruczołu piersiowego linii MCF-7 oraz MDA-MB—231 nie wywierając wpływu na zdrowe komórki

kontrolne. Wynik ten uważam za szczególnie istotny w podjęciu dalszych badań np. na zwierzętach doświadczalnych z nowotworem. Ponadto sok z pędów buraka ćwikłowego charakteryzował się wyższą cytotoksycznością wobec komórek nowotworowych dla obu nowotworowych linii gruczołu piersiowego a także zwiększał działanie apoptotyczne szczególnie w przypadku linii MDA-MB-231. Zacytowane tylko niektóre wyniki z pracy doktorskiej Pani mgr Eweliny Piasna- Słupeckiej uznaje za bardzo cenne i ważne w dziedzinie zdrowia publicznego. Szczególnie wobec faktu, że nowotwór piersi znajduje się na niechlubnym pierwszym miejscu przyczyn śmierci kobiet w Polsce. Co roku umiera na nowotwory złośliwe 22,5% kobiet. Z danych Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) wynika, że średnio 41,8 na 100 tys. Polek zmarło w 2020 r. na raka piersi. W 2015 r. ta liczba wynosiła 31,1, a w 2000 r. - 30,2. Mamy więc do czynienia ze stałym wzrostem zachorowania na ten nowotwór, pomimo dodatkowych nakładów finansowych, rozwoju medycyny, a także, przynajmniej w teorii, zwiększenia społecznej świadomości w zakresie profilaktyki (bezpłatna mammografia dla kobiet 50-69 lat).

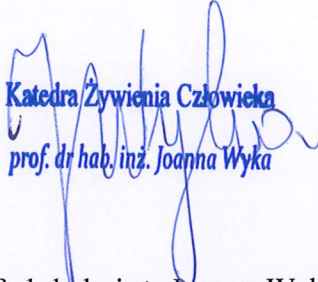
Z obowiązku recenzenta bardzo proszę o ustosunkowanie się pani mgr Eweliny Piasna – Słupeckiej do poniższych pytań wynikających bezpośrednio z analizy dysertacji doktorskiej podczas publicznej obrony. W opinii Pani Doktorantki czy zmienność gatunkowa buraka ćwikłowego (analizowano odmianę Rywał) a co za tym idzie różna zawartości badanych składników może mieć istotne znaczenie w rekomendacji działania chemoprewencyjnego tego produktu? Kolejne pytanie związane jest z wykorzystaniem wyników uzyskanych w pracy doktorskiej w profilaktyce nowotworu gruczołu piersiowego. Jakie widzi Pani możliwości aplikacyjne związane z uznaniem soku z pędów buraka ćwikłowego za naturalny produkt o właściwościach antynowotworowych. I dalej jakie powinny być następne kroki i działania w popularyzacji tym zakresie badanego w pracy doktorskiej produktu.

Podsumowanie

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy pracy, a więc przygotowanie badań i wykonanie analiz statystycznych, opracowanie teoretyczne tematu, interpretacje uzyskanych wyników uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Eweliny Piasna-Słupeckiej zatytułowana „Wpływ soku z młodych pędów buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris L.*) na mechanizmy apoptozy komórek nowotworowych gruczołu piersiowego” wnosi nowe elementy poznawcze, rozszerza wiedzę z dziedziny nauk rolniczych, ale także medycznych.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. Z 2017r., poz.1789).

Wnoszę zatem do wysokiej Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Piasna-Słupeckiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora oraz o wyróżnienie pracy doktorskiej.


Katedra Żywnienia Człowieka
prof. dr hab. inż. Joanna Wyka

Wrocław, dn. 26.04.2022r.

prof. dr hab. inż. Joanna Wyka