

Warszawa, dn. 11.05.2022

Prof. dr hab. Agata Wawrzyniak
Katedra Żywienia Człowieka
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka, SGGW w Warszawie
agata_wawrzyniak@sggw.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Marioli Drozdowskiej

pt. „Badania *in vitro* przeciwnowotworowych właściwości młodych pędów kapusty głowiastej czerwonej (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) na ludzkich liniach komórkowych gruczołu krokowego”

wykonanej pod kierunkiem naukowym

prof. dr hab. inż. Teresy Leszczyńskiej (promotor)

i dr hab. inż. Anety Koronowicz, prof. URK (promotora pomocniczego)

w Katedrze Żywienia Człowieka i Dietetyki

Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Podstawa wykonania recenzji i przedmiot recenzji

Recenzja została wykonana w oparciu o Uchwałę nr 22/2022 z dn. 6 kwietnia 2022 r. Rady naukowej dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, w związku z postępowaniem o nadanie stopnia naukowego doktora Pani mgr Marioli Drozdowskiej. Decyzja została przekazana pismem z dn. 21 kwietnia 2022 i podpisana przez przewodniczącego rady dyscypliny dr hab. inż. Marcina Łukasiewicza, prof. URK.

Ocena strony formalnej przedłożonej do recenzji rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Marioli Drozdowskiej pt. „*Badania in vitro* przeciwnowotworowych właściwości młodych pędów kapusty głowiastej czerwonej (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) na ludzkich liniach komórkowych gruczołu krokowego” stanowi sekwencję 3 oryginalnych prac badawczych, zgodnych tematycznie, opublikowanych w języku angielskim w latach 2020-2021, w czasopismach z listy JCR, po uprzedniej pozytywnej ocenie recenzentów międzynarodowych. Tytuł pracy odpowiada wykonanym badaniom, choć nie zawarto w tytule elementu oceny składu chemicznego badanego surowca.

Na rozprawę doktorską składają się następujące publikacje o łącznym wskaźniku IF wynoszącym 9,038 i punktach MNiSW o łącznej wartości 270:

1. Drozdowska M., Leszczyńska T., Koronowicz A., Piasna-Słupecka E., Domagała D., Kusznierevicz B.: *Young shoots of red cabbage are a better source of selected*

nutrients and glucosinolates in comparison to the vegetable at full maturity. European Food Research and Technology, 2020, 246, 2505-2515, doi:10.1007/s00217-020-03593-x (IF 2,998; MNiSW 70 pkt.),

2. **Drozdowska M.**, Leszczyńska T., Koronowicz A., Piasna-Słupecka E., Dziadek K.: *Comparative study of young shoots and the mature red headed cabbage as antioxidant food resources with antiproliferative effect on prostate cancer cells*. RSC Advances, 2020, 10, 43021-43034, doi:10.1039/d0ra07861a (IF 3,361; MNiSW 100 pkt.),
3. **Drozdowska M.**, Leszczyńska T., Piasna-Słupecka E., Domagała D., Koronowicz A.: *Young shoots and mature red cabbage inhibit proliferation and induce apoptosis of prostate cancer cell lines*. Applied Sciences, 2021, 11, 11507. doi:10.3390/app112311507 (IF 2,679; MNiSW 100 pkt.),

co należy uznać za wskaźniki wystarczające przy ubieganiu się o stopień naukowy doktora.

Przedstawiona do recenzji dysertacja ma typowy układ rozprawy doktorskiej powstałej na bazie spójnego tematycznie zbioru publikacji naukowych, a przytoczony cykl publikacji jest ważny dla nauki o żywności i żywieniu i ma na celu ustalenie, po raz pierwszy w ujęciu kompleksowym, czy młode pędy kapusty czerwonogłowej są lepszym źródłem wybranych składników odżywczych i glukozyzolanów w diecie człowieka w porównaniu z warzywami o pełnej dojrzałości, w tym związków o działaniu przeciwutleniającym i udowodnionym przeciwnowotworowym, tj. polifenoli, karotenoidów, witaminy C, antocyjanów, również przy porównaniu aktywności przeciwutleniającej badanego surowca. Oznaczono także zawartość witaminy C i polifenoli w sokach uzyskanych z młodych pędów i dojrzałego warzywa. Drugim celem badania było potwierdzenie hipotezy, że sok z młodych pędów skuteczniej w porównaniu z sokiem z dojrzałego warzywa redukuje komórki nowotworowe gruczołu krokowego linii androgenoniezależnej DU145 i androgenozależnej LNCaP *in vitro*. Podjęto również próby zidentyfikowania potencjalnych mechanizmów molekularnych, dzięki którym materiał roślinny wywołuje swój biologiczny wpływ na linie komórkowe raka prostaty.

Ponadto przedłożona dysertacja obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim, indeks skrótów, wykaz publikacji, wprowadzenie (co przybliży zagadnienia stanowiące przedmiot badań), cel pracy i hipotezy badawcze, materiał i metody badawcze, omówienie i dyskusję wyników, podsumowanie, wniosek końcowy, literaturę (spis piśmiennictwa - 105 pozycji) oraz załącznik 1 (zbiór publikacji) i załącznik 2 (oświadczenia współautorów). Przedstawione do oceny publikacje są czytelne (w tym tabele i ryciny). Forma edytorska nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka poprawnie posługuje się specjalistycznym językiem

angielskim w opublikowanych pracach, przy czym publikacja prac w czasopismach ogólnościatowych angielskojęzycznych zwiększa ich poczytność, jak też możliwość cytacji.

Jednocześnie w pracy zamieszczono oświadczenia współautorów, iż wyrażają zgodę na wykorzystanie danych zawartych w powyżej wymienionych publikacjach na potrzeby przewodu doktorskiego mgr Marioli Drozdowskiej, a udział Doktorantki w powstaniu prac w roli pierwszego autora w każdej z nich i autora korespondencyjnego należy uznać jako wiodący. Doktorantka oceniła swój wkład w realizację pierwszej i trzeciej publikacji na 55%, a w przygotowaniu drugiej publikacji na 60%.

Doktorantka brała udział w opracowaniu koncepcji i planu badań, pozyskiwała materiał roślinny do badań, brała udział w prowadzeniu analiz składu chemicznego podstawowego oraz zawartości składników mineralnych, glukozydów i składników bioaktywnych (ogólnej zawartości polifenoli, antocyjanów, karotenoidów, witaminy C) w młodych pędach kapusty głowiastej czerwonej oraz w warzywie w fazie pełnej dojrzałości, oznaczała potencjał antyoksydacyjny, prowadziła doświadczenia w warunkach *in vitro* sprawdzających wpływ świeżego soku z młodych pędów i warzywa dojrzałego na proliferację ludzkich komórek nowotworowych gruczołu krokowego linii DU145 i LNCaP oraz komórek prawidłowych linii PNT-2. Brała udział w prowadzeniu procesu trawienia oraz wchłaniania ww. soków z kapusty w modelowym przewodzie pokarmowym *in vitro* i analizie wpływu tych produktów na ekspresję wybranych genów i białek zaangażowanych w przeżycie oraz proces apoptozy komórek. Brała udział w analizie i interpretacji wyników (w tym w analizie statystycznej), pisała publikacje, była autorem korespondencyjnym, pozyskiwała finansowanie w postaci przyznanego Jej grantu.

Badania finansowano ze środków NCN przyznanych na realizację projektu badawczego (numer projektu 2016/23/N/NZ9/01571).

Reasumując przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne przy ubieganiu się o stopień naukowy doktora.

Ocena merytoryczna pracy

14 kwietnia 2003 roku, w wyniku realizacji *Projektu poznania ludzkiego genomu*, opublikowano dokument stwierdzający zakończenie sekwencjonowania 99% genomu ludzkiego z trafnością 99,99%. To pozwoliło naukowcom, w dalszym rozwoju nauki z tego zakresu, na identyfikację genów kodujących wybrane białka oraz wykorzystanie tej wiedzy w medycynie, jak też nauce o żywieniu człowieka w badaniach mechanizmów regulacji genów przez składniki pokarmowe, w tym w ochronie przed chorobami dietozależnymi i w

prewencji przed nowotworami. Obecnie najczęściej wśród substancji przeciwnowotworowych bada się takie związki bioaktywne jak związki polifenolowe, karotenoidy, inne tzw. przeciwutleniające obecne w produktach żywnościowych – w ocenie ich przydatności w ochronie przed procesami nowotworzenia, w tym w różnych mechanizmach (ligandów dla receptorów jądrowych, wpływie na szlaki sygnałowe, jako przeciwutleniaczy chroniących przed wolnymi rodnikami). Jednakże należy nadmienić, iż badania te nie są proste, gdyż mechanizmy regulujące procesy nowotworowe mogą przebiegać w różny sposób, jak też być kodowane wielogenowo, a substancje żywieniowe uczestniczące w tych mechanizmach mogą podlegać interakcjom, o czym pisze również w swojej dysertacji Doktorantka, badając ekspresję różnych genów i białek mogących zmniejszać natężenie procesów nowotworowych pod wpływem składników bioaktywnych obecnych w soku z kapusty czerwonej (pędów lub warzywa dojrzałego). Należy jednakże docenić wykonane przez Doktorantkę badania, jak też poszukiwanie produktów żywieniowych, które mogłyby wpływać przeciwnowotworowo na ludzkie komórki gruczołu krokowego, przy udowodnieniu ich działania i znaczenia w żywieniu człowieka, z wykorzystaniem obecnych możliwości nauki, w tym dostępnej i zaawansowanej aparatury, gdyż obecnie szacuje się, że najczęstszym nowotworem u mężczyzn jest nowotwór gruczołu krokowego z udziałem niemal 21% w strukturze zachorowań i z udziałem nieco ponad 10% w strukturze zgonów (drugi wynik po nowotworze płuc). Nowotwór ten charakteryzuje się największą w latach dynamiką wzrostu zachorowalności, przy wzrostowej również dynamice umieralności. Motywacją do podjęcia tematu był też brak kompleksowych badań związanych z wczesnym stadium rośliny – młodymi pędami, które, jak słusznie założyła Doktorantka mogły być bardziej bogate w związki prozdrowotne, zapobiegające proliferacji komórek nowotworowych. Tak więc podjęcie tematu wydaje się być uzasadnione i w pełni słuszne.

Celem głównym badań w przedstawionej do recenzji dysertacji była weryfikacja hipotez badawczych, iż: (1) młode pędy kapusty głowiastej czerwonej są korzystniejszym nośnikiem składników odżywczych i innych bioaktywnych o działaniu chemoprewencyjnym, w stosunku do warzywa w pełnej fazie dojrzałości; (2) sok z młodych pędów kapusty głowiastej czerwonej (świeży, jak i poddany wcześniejszemu trawieniu i wchłanianiu) skutkuje silniejszym obniżaniem proliferacji komórek nowotworowych gruczołu krokowego linii DU145 oraz LNCaP, niż z warzyw o pełnej dojrzałości, a oba rodzaje soku nie wpływają na proliferację komórek prawidłowych PTN-2; (3) zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych pod wpływem obu rodzajów soku związane jest z procesami apoptozy. Cel pracy został przedstawiony precyzyjnie i łączy się w logiczną całość.

W realizacji celów szczegółowych wykonano: (1) w kapuście o różnych fazach dojrzałości oznaczenia zawartości składników podstawowych, tj. suchej masy, popiołu, białka, tłuszczu (przy rozdziale kwasów tłuszczowych), błonnika pokarmowego oraz obliczono zawartość węglowodanów przyswajalnych, oznaczono zawartość wapnia, magnezu, potasu, sodu, żelaza, cynku, manganu, miedzi oraz glukozynolanów, jak też witaminy C, karotenoidów ogółem, polifenoli ogółem, jak też z rozdziałem, antocyjanów ogółem, potencjału antyoksydacyjnego, a zawartość witaminy C i polifenoli oznaczono w sokach uzyskanych z młodych pędów i dojrzałego warzywa; (2) porównano zdolności proliferacyjne komórek prawidłowych i nowotworowych pod wpływem działania soku z warzyw o różnej fazie dojrzałości zarówno świeżego, jak i poddanego procesowi trawienia i wchłaniania w modelowym przewodzie pokarmowym *in vitro*; (3) starano się wyjaśnić mechanizmy zahamowania procesów proliferacji badając wpływ soku z kapusty na ekspresję wybranych genów i białek zaangażowanych w przeżycie oraz proces apoptozy komórek nowotworowych gruczołu krokowego obu linii.

Biorąc pod uwagę, iż praca doktorska składa się z już opublikowanych, a uprzednio weryfikowanych przez recenzentów artykułów (do prestiżowych czasopism), dobór metod badawczych, jak też opisy wyników badań, w tym ich przedstawienie, jak też dyskusja wyników - nie budzą większych zastrzeżeń. Praca doktorska jest dobrze zaplanowanym, przeprowadzonym i opisanym zbiorem tematycznie spójnych prac badawczych, wykonanym z wykorzystaniem współczesnych procedur i metod badawczych o szerokim spektrum i zakresie oznaczeń, często analitycznie i badawczo złożonych, w tym z przeprowadzeniem analizy zmian w proliferacji i w aktywności cytotoksycznej, przeprowadzeniem analizy apoptozy komórek, i z przeprowadzeniem analizy ekspresji wybranych genów i białek pod wpływem badanego surowca. Doktorantka prawidłowo przeanalizowała, zinterpretowała i przedyskutowała wyniki. Dobór piśmiennictwa do prac należy uznać za prawidłowy i nie budzący zastrzeżeń.

Zapytania budzi:

- jakie jest spożycie kapusty czerwonej wśród Polaków, ew. badanych soków, jak też jakie jest spożycie badanych składników bioaktywnych z tymi produktami, w tym porównaniu do norm lub zwyczajowego spożycia,
- na jakiej podstawie przyjęto dodatki soku do badanego medium, aby stężenie finalne soku dla oceny proliferacji wynosiło do 5%; jakie ilości musiałyby być dziennie spożywane przez ludzi, aby osiągnąć podobny efekt prozdrowotny jak w badaniach Doktorantki.

Elementami, które mógłby ew. uzupełnić badania/dysertację w są:

- analiza karotenoidów poprzez rozdział,
- szersze omówienie roli karotenoidów, które również chronią przed nowotworami m.in. w mechanizmie regulacji genu supresorowego TN53 – strażnika genomu, którego produkt białko p53 bierze udział w mechanizmie naprawy uszkodzeń w czasie podziałów komórkowych lub indukuje apoptozę; spowalniają tempo podziału komórek nowotworowych poprzez tłumienie działania czynników wzrostu (m.in. IGF-1), obniżają czynniki zapalne w komórkach prostaty zmienionych nowotworowo, wpływają na metabolizm steroidów anabolicznych; wpływają na ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę białek budujących połączenia typu neksus, co pozwala zachować komunikację pomiędzy komórkami zmienionymi nowotworowo i zdrowymi, powodują wzrost aktywności immunologicznej organizmu poprzez wpływ na aktywność limfocytów T oraz limfocytów T cytotoksycznych, itp. – choć należy mieć świadomość, iż karotenoidy są przede wszystkim związkami tłuszczorozpuszczalnymi, których w sokach mogą być nieduże ilości,
- szersza analiza statystyczna wyników, np. poprzez wykonanie analizy więcej niż jednoczynnikowej lub analizy regresji np. w celu oceny jak zawartość poszczególnych składników bioaktywnych wpływa na potencjał antyoksydacyjny (w artykule nr 2 zawarto wskaźniki korelacji).

Przygotowaną rozprawę doktorską kończy podsumowanie (9 punktów) weryfikujące poprawnie postawione hipotezy badawcze oraz uzasadniony wniosek końcowy, co stanowi syntetyczne podsumowanie całości badań.

Za szczególnie ważną w przeprowadzonych badaniach uważam próbę weryfikacji mechanizmu apoptotycznego zachodzącego w komórkach, jak też niezwykle szerokie umiejętności badawcze Doktorantki przy realizacji tak wielokierunkowej pracy, z wykorzystaniem tak licznych i różnorodnych technik badawczych, w tym przy umiejętności pozyskania środków na badania. Świadczy to o samodzielności badawczej Doktorantki i jej dojrzałości naukowej już na początku drogi ubiegania się o pierwszy stopień naukowy.

Wniosek końcowy

Na podstawie dokonanej oceny stwierdzam, iż rozprawa autorstwa mgr Marioli Drozdowskiej pt. *„Badania in vitro przeciwnowotworowych właściwości młodych pędów kapusty głowiastej czerwonej (Brassica oleracea var. capitata f. rubra) na ludzkich liniach komórkowych gruczołu krokowego”* spełnia wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora, ma istotne walory poznawcze i jest na bardzo wysokim poziomie naukowym, a podjęty temat badawczy ma znaczenie w wymiarze poznawczym i aplikacyjnym dla nauki zajmującej się badaniem zagadnień związanych z żywnością, żywieniem i zdrowiem. Przedłożona do oceny rozprawa jest opracowaniem oryginalnym, prawidłowo przygotowanym, spełniającym wymogi określone w art. 13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity w Dz.U. z 2014 r., poz. 1852, z późn. zm.). Biorąc powyższe pod uwagę stawiam wniosek do Rady dyscypliny technologii żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Marioli Drozdowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem nadania stopnia naukowego doktora. Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie przez Wysoką Radę przedłożonej mi do recenzji rozprawy.



