



Warszawa, 21.04.2022r.

Dr hab. Ewa Lange, prof. SGGW

Katedra Dietetyki

Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka,

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Piasna-Słupeckiej

pt. „Wpływ soku z młodych pędów buraka ćwikłowego (*Beta Vulgaris L.*) na mechanizmy apoptozy komórek nowotworowych gruczołu piersiowego”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Leszczyńskiej  
oraz promotora pomocniczego dr hab. Anety Koronowicz, prof. UR

Choroby nowotworowe są diagnozowane u ponad 23 milionów osób rocznie, będąc przyczyną ponad 10 milionów zgonów. Jednym z największych problemów onkologicznych w krajach rozwiniętych są nowotwory piersi. Odpowiedzialne są one za 23% nowo rozpoznawanych przypadków nowotworów u kobiet i stanowią przyczynę 14% zgonów z ich powodu. Z punktu widzenia dietoprofilaktyki i wsparcia leczenia chorób nowotworowych, szczególnie nowotworów piersi, istotne jest zwiększenie spożycia warzyw i owoców, będących źródłem związków o właściwościach chemoprewencyjnych. Warzywa są bogatym źródłem różnych fitozwiązków m.in. polifenoli (flawonoidów, flawonoli, flawanoli, proantocyanidyn, procyjanidyn), glukozynolanów, betalain, saponin, terpenów, alkaloidów i kumaryn. Działanie chemoprewencyjne związków biologicznie czynnych opiera się na hamowaniu procesów leżących u podstawy kancerogenezy poprzez wpływ na mechanizmy molekularne, w tym szlaki przekazywania sygnałów, cykl komórkowy czy różne rodzaje śmierci komórki, m.in. apoptozę. W komórkach nowotworowych zaburzona jest wewnątrzkomórkowa sieć sygnałowa składająca się z receptorów, kinaz białkowych, czynników transkrypcyjnych i genów docelowych. Wiele naturalnych związków chemoprewencyjnych, wśród nich polifenole, działają na poszczególne elementy szlaków sygnałowych wpływając na różnicowanie, proliferację oraz programowaną śmierć komórki. Wiele czynników chemoprewencyjnych pochodzenia roślinnego, wykazuje też silne właściwości hamujące szlaki sygnałowe receptorów czynników wzrostowych, co może wpływać na procesy proapoptotyczne w komórkach nowotworowych oraz hamowanie ich

inwazyjności. Takie właściwości chemoprewencyjne mogą być wykorzystane nie tylko w zapobieganiu, ale i we wspomaganiu terapii nowotworów piersi.

Burak ćwikłowy jest jednym z popularniejszych warzyw uprawianych w Polsce, bogatym w związki o właściwościach chemoprewencyjnych, m.in.: witaminę C, foliany, polifenole (kwasy fenolowe, flawonoidy), betalainy i saponiny. Dlatego słusznym wydaje się podjęcie badań mających na celu ocenę przeciwnowotworowego działania soku z młodych pędów buraka ćwikłowego, w odniesieniu do działania soku z korzenia tej rośliny w fazie pełnej dojrzałości, na ludzkie komórki nowotworowe gruczołu piersiowego, zarówno hormonozależne, jak i hormononiezależne.

Układ przedstawionej do recenzji pracy Pani mgr inż. Eweliny Piasna-Słupeckiej jest typowy dla monograficznych dysertacji doktorskich i składa się ze: Wstępu, Celu pracy, Materiału i metodyki pracy, Wyników, Podsumowania i Wniosku ogólnego, Bibliografii oraz wykazu stosowanych skrótów i streszczeń w języku polskim i angielskim.

Wstęp pracy stanowi wprowadzenie obejmujące przegląd literatury dotyczący charakterystyki buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris L.*), w tym zawartości i działania przeciwnowotworowego jego składników takich jak: związki polifenolowe i betalainy oraz etiologii procesu nowotworzenia i mechanizmów programowanej śmierci komórkowej, stanowiąc uzasadnienie postawionego w pracy celu i hipotez badawczych. Cel jest odzwierciedleniem tematu pracy i obejmuje 5. celów szczegółowych, na których oparto zakres zaplanowanych badań. Na tej podstawie Pani mgr inż. Ewelina Piasna-Słupecka sformułowała 6. hipotez badawczych dotyczących porównania udziału wybranych związków bioaktywnych, w tym głównie związków polifenolowych, w młodych pędach buraka ćwikłowego i w jego korzeniu w fazie dojrzałości oraz oceny i porównania wpływu soku z tych części buraka ćwikłowego na proliferację, cytotoksyczność, nasilenie apoptozy i jej mechanizmy w komórkach nowotworu gruczołu piersiowego (hormonozależnych – linia komórkowa MCF-7 i hormononiezależnych – linia komórkowa MDA-MB-231).

Obszerny przegląd literatury obejmuje 6. części, w tym dwie poświęcone zastosowanemu w pracy burakowi ćwikłowemu i cztery odnoszące się do zagadnień związanych z procesem nowotworzenia i chemoprewencją nowotworową. W dwóch pierwszych rozdziałach wstępu literaturowego zwrócono szczególną uwagę na zawartość w buraku ćwikłowym związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, w tym związków polifenolowych oraz charakterystycznych dla tego gatunku betalain. W tej części pracy odniesiono się także do innych właściwości prozdrowotnych składników bioaktywnych pochodzących z buraka ćwikłowego, jak również różnic w ich zawartości w różnych częściach tej rośliny. Ciekawym uzupełnieniem tej części przeglądu literatury jest charakterystyka i uzasadnienie zastosowania w żywieniu człowieka młodych pędów warzyw, tłumaczące wybór materiału badawczego zastosowanego w niniejszej dysertacji. Następne części wprowadzają w tematykę związaną z procesem nowotworzenia, w tym głównie

związaną z mechanizmami apoptozy, jako jednych z istotniejszych szlaków programowanej śmierci komórkowej. Zagadnienia związane z różnymi szlakami apoptotycznymi i ich związkiem z procesem nowotworzenia zostały przedstawione w sposób dokładny, jednocześnie jednak syntetycznie i czytelnie wskazując na umiejętność wnikliwej analizy wykorzystywanej literatury. Ta część pracy stanowi dobre, choć dość obszerne, wprowadzenie do dalszych części pracy, uzasadniając wybór zastosowanej procedury badawczej.

W rozdziale Materiał i metodyka pracy, Pani mgr inż. Ewelina Piasna-Słupecka w sposób szczegółowy odniosła się do zastosowanego materiału badawczego, w tym wykorzystywanego materiału roślinnego oraz modelowych linii komórkowych, wykorzystanych zarówno w eksperymencie badawczym (linia prawidłowych ludzkich komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego, linie komórek nabłonkowych gruczolakoraka piersi hormonozależne oraz hormononiezależne), jak i linii komórek gruczolakoraka jelita grubego, która posłużyła do przygotowania modelu *in vitro* wchłaniania zastosowanego soku z młodych pędów i korzenia buraka ćwikłowego. W tej części pracy opisano też procedurę przeprowadzenia *in vitro* procesu trawienia i wchłaniania uzyskanego z młodych pędów i korzenia buraka ćwikłowego soków. Pewne wątpliwości budzi jednak zastosowanie, podobnie jak w dalszej części pracy, sformułowania „sztuczny model przewodu pokarmowego”. Określenie to stosuje się do kontrolowanych zewnętrznie, dynamicznych systemów, składających się z zespołu odpowiednio połączonych bioreaktorów, symulujących procesy (trawienia, wchłaniania, fermentacji bakteryjnej) zachodzące we wszystkich odcinkach przewodu pokarmowego. Systemy takie stanowią odrębne urządzenia sterowane przez zewnętrzne systemy kontrolujące, pozwalające na symulowanie w warunkach *in vitro* większości procesów zachodzących we wszystkich odcinkach przewodu pokarmowego. Zastosowana w niniejszej pracy metodyka jest raczej statycznym modelem przeprowadzonego w warunkach *in vitro* procesu trawienia i wchłaniania. W tej części metodyki zabrakło też trochę dalszego opisu procedury pozyskiwania materiału po przeprowadzeniu wykonanego *in vitro* procesu wchłaniania strawionego soku z młodych pędów i korzenia buraka ćwikłowego, który wykorzystano w dalszej części badań.

Na uwagę zasługuje zamieszczenie w tej części pracy wyjaśnień dotyczących zastosowanych metod oceny proliferacji, cytotoksyczności, nasilenia apoptozy, ekspresji genów i wybranych białek związanych z programowaną śmiercią komórki, co systematyzuje i ułatwia dalszą interpretację uzyskanych wyników. W opisie analizy statystycznej znalazło się stwierdzenie sugerujące porównanie wyników uzyskanych na „komórkach grupy kontrolnej” jedynie z wynikami obserwowanymi na komórkach poddanych działaniu jedynie soku z młodych pędów buraka ćwikłowego, jednak przedstawiane w następnej części pracy wyniki wskazują na porównanie także z liniami komórkowymi poddawanymi działaniu soku z korzenia buraka.

Następną część dysertacji stanowi rozdział Wyniki, w którym Pani mgr inż. Ewelina Piasna-Słupecka zawarła szczegółowe omówienie uzyskanych wyników. Rozdział ten zaczyna się od przedstawienia zawartości wybranych związków polifenolowych w młodych pędach i korzeniu buraka ćwikłowego, wskazując na znacząco większy udział tych związków we wczesnej fazie dojrzałości rośliny. Czy jednak procedura przygotowania zastosowanych później, w badaniach na liniach komórkowych, soków, związana z wyciskaniem oraz przechowywaniem, w tym zamrażaniem i odmrażaniem, mogła wpłynąć na zawartość związków bioaktywnych, a w rezultacie na uzyskane wyniki? Autorka nie podaje też, co mogłoby mieć znaczenie w ocenie zmian proliferacji i aktywności cytotoksycznej w badanych liniach komórkowych, w jakiej proporcji do medium hodowlanego dodawany był strawiony i poddany wchłanianiu *in vitro* sok z młodych pędów oraz korzenia buraka.

W pracy zamieszczono 25. rycin i 16. tabel, w tym 18. rycin i 10. tabel przedstawia wyniki pracy. Warto zaznaczyć, że mimo dużego zakresu przeprowadzonych badań i znaczącej liczby uzyskanych wyników zostały one opisane oraz zaprezentowane w sposób przejrzysty i czytelny, stanowiąc logicznie powiązane ze sobą części. Zapoznanie się z przedstawianymi wynikami ułatwia, zamieszczone po każdej z części podsumowanie, będące syntezą najważniejszych obserwacji min. porównaniem wpływu działania soku z młodych pędów oraz korzenia buraka ćwikłowego na wykorzystywane w modelu doświadczalnym linie komórkowe gruczolakoraka komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego hormonowrażliwego i hormononiezależnego.

Bardzo ciekawymi wynikami przedstawionymi w następnej części tego rozdziału jest porównanie wpływu, natywnego oraz poddanego w warunkach *in vitro* trawieniu i absorpcji, soku z młodych pędów oraz korzenia buraka ćwikłowego na proces apoptozy komórek nowotworu piersi. Uzyskane w tej części pracy wyniki, takie jak ocena aktywacji kapsaz, szlaku kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK) i kinazy faszatydylo-3-inozytoli (PI3K) oraz ekspresji wybranych genów oraz białek zaangażowanych w programowaną śmierć komórki, pozwalają na poznanie potencjalnych mechanizmów tłumaczących wpływ badanego materiału roślinnego na cykl komórkowy i apoptozę komórek nowotworu piersi. Takie przedstawienie wyników stanowi logiczne przejście do następnego rozdziału, w którym Autorka odnosi swoje wyniki do spostrzeżeń innych autorów i podejmuje próbę wyjaśnienia mechanizmów działania przeciwnowotworowego zastosowanych w eksperymentach soków z młodych pędów oraz dojrzałego korzenia buraka ćwikłowego.

W następnej części dysertacji pani mgr inż. Ewelina Piasna-Słupecka podjęła dyskusję uzyskanych wyników, zwracając uwagę na małą liczbę badań dotyczących wpływu młodych pędów buraka, zarówno w formie natywnej, jak i po procesie trawienia oraz wchłania, na proliferację i procesy apoptozy komórek nowotworowych. Podstawą tej części pracy jest próba wyjaśnienia mechanizmów zaobserwowanego potencjalnego działania przeciwnowotworowego soku z buraków ćwikłowych, zarówno z młodych pędów, jak i korzenia w formie pełnej dojrzałości. Autorka w sposób logiczny i

systematyczny starała się wyjaśnić obserwowane w swoim badaniu zależności, zaczynając od oceny i porównania z obserwacjami innych autorów charakterystyki związków polifenolowych zawartych w badanym materiale roślinnym, wskazując jednocześnie na ich możliwy wpływ na proliferację, cytotoksyczność i programowaną śmierć komórek nowotworowych. Ciekawym jest porównanie mechanizmów działania soków z młodych pędów oraz korzenia buraka na proliferację, cytotoksyczność i apoptozę komórek nowotworowych gruczołu piersiowego linii zależnej oraz niezależnej od receptorów estrogenowych i progesteronowych. W nieco mniejszym stopniu, co byłoby bardzo ciekawe, Autorka wyjaśniła różnice wpływu na proliferację, nasilenie apoptozy oraz aktywację związanych z nią białek, natywnego soku z młodych pędów i korzenia buraka ćwikłowego oraz tego samego materiału roślinnego poddanego modelowemu trawieniu i wchłanianiu w warunkach *in vitro*. Zaobserwowano większy wpływ na proliferację oraz aktywację apoptozy strawionego i wchłoniętego w modelu *in vitro* soku, szczególnie z młodych pędów buraka, choć nie obserwowano istotnego zmniejszenia aktywacji szlaku kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK) i kinazy fosfatydylo-3-inozytolu (PI3K) czy zmniejszenia aktywacji genu *Fas* w komórkach nowotworu piersi w wyniku działania strawionego/wchłoniętego soku z młodych pędów buraka. Podobnie sok z młodych pędów buraka, zarówno w formie natywnej, jak i poddany procesowi trawienia i wchłaniania, w istotny sposób zmniejszał aktywację białka BCL-2 w komórkach nowotworu piersi, ale jedynie w komórkach linii MCF-7 poddanych działaniu strawionego i wchłoniętego w warunkach *in vitro* soku z młodych pędów buraka obserwowano ekspresję genu BCL2. Obserwowano też odmienny (zwiększanie / zmniejszanie ekspresji białek) wpływ natywnego oraz strawionego / wchłoniętego soku z młodych pędów buraka na ekspresję niektórych białek zaangażowanych w programowaną śmierć komórki m.in. kapsazy 8 czy poddanej proteolizie formy polimerazy poli(ADP) rybozy. Czy możliwe jest by podczas procesu trawienia i wchłaniania w modelu *in vitro* zmieniał się skład zastosowanego w badaniach surowca roślinnego? Możliwe, że oznaczenie związków bioaktywnych w sokach z młodych pędów oraz dojrzałego korzenia buraka poddanych modelowemu trawieniu i absorpcji *in vitro* mogłoby pomóc w wyjaśnieniu tych obserwacji. Mała absorbcja z przewodu pokarmowego związków polifenolowych może być czynnikiem limitującym możliwości ich biologicznego działania na organizm. Tempo i zasięg absorpcji jelitowej związków polifenolowych determinuje ich struktura chemiczna, w tym m.in. masa cząsteczkowa, glikozylacja i estryfikacja. Duża masa cząsteczkowa, w tym większy stopień polimeryzacji, prawdopodobnie zmniejsza ich wchłanianie w przewodzie pokarmowym. Z drugiej strony polifenole, które nie ulegają absorpcji w swojej naturalnej formie, zanim zostaną wchłonięte w dalszej części przewodu pokarmowego, muszą być zhydrolizowane przez enzymy rąbka szczoteczkowego lub enzymy bakteryjne mikroflory okrężnicy, co jednak trudno było zaplanować w wykorzystanym w niniejszym badaniu modelu *in vitro* trawienia i wchłaniania.

Pani mgr inż. Ewelina Piasna-Słupecka sprawnie wykorzystała w dyskusji wyników zarówno prace o podobnym zakresie eksperymentów badawczych, jak i takie, w których oceniano działanie pojedynczych fitozwiązków lub produktów z młodych pędów innych roślin na komórki nowotworowe, w tym też inne niż komórki nowotworu piersi. Mimo to prowadzona analiza, wskazująca na możliwe mechanizmy działania stosowanego w niniejszej pracy materiału roślinnego, jest spójna i prowadzi do syntetycznego podsumowania. Podsumowanie stanowi zebrane w punktach najważniejsze spostrzeżenia, oparte o wyniki niniejszej pracy. Przedstawione w Podsumowaniu spostrzeżenia odniesione zostały do założonych hipotez badawczych, potwierdzając też realizację szerokiego zakresu pracy. Autorka niniejszej dysertacji zwróciła uwagę zarówno na potencjalne działanie przeciwnowotworowe soku zarówno z korzenia, jak i z młodych pędów buraka ćwikłowego, w tym szczególnie soku poddanego w modelu *in vitro* trawieniu i wchłanianiu. Odniosła się także do potencjalnych mechanizmów działania zastosowanego materiału roślinnego, wskazując na zwiększenie ekspresji genów i aktywację białek związanych głównie z mitochondrialnym szlakiem apoptozy oraz aktywacją genu AKT1 (serynowo-treoninowo specyficznych kinaz białkowych) oraz większe nasilenie apoptozy i mniejsze obniżenie proliferacji w przypadku linii hormononiezależnych komórek nowotworu piersi. W następnym rozdziale Pani mgr inż. Ewelina Piasna-Słupecka zamieściła Wnioski ogólne, będące bardziej syntetycznym powtórzeniem sformułowanych w Podsumowaniu spostrzeżeń – te dwa rozdziały można by było połączyć w jeden np. pt. Spostrzeżenia i wnioski.

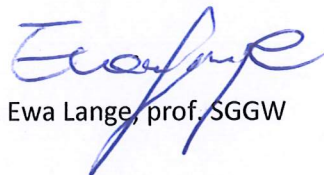
Zakres przedstawionej do oceny pracy wskazuje na umiejętność planowania eksperymentu naukowego i doboru przez Doktorantkę właściwych metod badawczych. Dodatkowo Pani mgr inż. Ewelina Piasna-Słupecka wykazała się sprawną analizą uzyskanych wyników, wskazując na możliwe ich powiązania i zależności. Na uwagę zasługują też przedstawione w sposób czytelny i syntetyczny spostrzeżenia mające niewątpliwy walor poznawczy, ale także aplikacyjny. Zwrócenie uwagi na możliwość wykorzystania, nie tylko w dietoprofilaktyce, ale i w dietoterapii nowotworu piersi, przetworów z powszechnie dostępnej rośliny jaką jest burak ćwikłowy jest niezwykle cenne. Bardzo ważnym jest też ostatni wniosek zawarty w niniejszej pracy, wskazujący na potrzebę dalszych badań dotyczących działania przeciwnowotworowego tego materiału roślinnego, szczególnie pochodzącego z młodych pędów.

Ostatnią część pracy stanowi Bibliografia, na która składa się 276. pozycji literaturowych, w tym 1/3 opublikowana w ostatnich 10 latach. W pracy może nieco zabrakło spisu rycin i tabel, co mogłoby pomóc w sprawnym odnajdowaniu prezentowanych w pracy wyników.

Podsumowując rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Piasna-Słupeckiej jest wartościowym opracowaniem badawczym o dużym walorze aplikacyjnym. Pani mgr inż. Ewelina Piasna-Słupecka wykazała się znajomością podjętej tematyki badawczej, umiejętnością weryfikacji stawianych hipotez, a przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne opracowanie naukowo-badawcze.

Rozprawa wnosi istotną wartość poznawczą do nauk z zakresu technologii żywności i żywienia, będąc przyczynkiem do dalszych badań oceniających mechanizmy działania przeciwnowotworowego przetworów z buraka ćwikłowego, w tym szczególnie przygotowanych z młodych pędów.

Praca Pani mgr inż. Eweliny Piasna-Słupeckiej pt.: „Wpływ soku z młodych pędów buraka ćwikłowego (*Beta Vulgaris L.*) na mechanizmy apoptozy komórek nowotworowych gruczołu piersiowego” w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom badawczym na stopień doktora zgodnie z Ustawą z dnia 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017r. poz. 1789 z późniejszymi zmianami) w związku z art. 179 ust. 1 i ust. 3 Ustawy z dnia 3.07.2018 r.: *Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669). W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny technologii żywności i żywienia, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Eweliny Piasna-Słupeckiej i dopuszczenie jej do dalszego toku postępowania oraz publicznej obrony pracy, wnosząc dodatkowo o wyróżnienie niniejszej dysertacji.



dr hab. Ewa Lange, prof. SGGW