

dr hab. Jadwiga Hamułka, prof. nadzw. SGGW
Katedra Żywienia Człowieka
Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Dominika Domagały

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

wykonanej w Katedrze Żywienia Człowieka, na Wydziale Technologii Żywności,
Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

pod kierunkiem naukowym **prof. dr hab. Teresy Leszczyńskiej**

oraz promotora pomocniczego **dr hab. Anety Koronowicz**

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Podstawą wykonania niniejszej recenzji było pismo Dziekana Wydziału Technologii Żywności, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie dr hab. inż. Agnieszki Filipiak-Florkiewicz, prof. UR, z dnia 3.07.2019 roku. Przedmiotem recenzji jest ocena czy rozprawa doktorska mgr. Dominika Domagały spełnia warunki ustawowe określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595, z późn. zm.).

2. Uzasadnienie wyboru tematu rozprawy doktorskiej

Sprzężone dniy kwasu linolowego (ang. *Conjugated linoleic acid* - CLA), stanowiące mieszaninę izomerów kwasu linolowego (C18:2), są związkami aktywnymi biologicznie o udowodnionym działaniu przeciwnowotworowym, przy czym mechanizmy ich działania na komórkę nie zostały do dokładnie poznane. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy największą aktywność biologiczną wykazują dwa izomery CLA, tj.: *cis9,trans11-CLA* (80-90% CLA w żywności) oraz *trans10,cis12-CLA* (3-5% CLA w żywności), przy czym ich wpływ na komórkę jest różny, a często bywa nawet przeciwstawny. Biorąc pod uwagę przeciwnowotworowe właściwości CLA wykazano, że obniżają one proliferację komórek rakowych, jednak efektywność ich działania jest różna, co może wynikać z różnic w ich pobraniu, przyswajaniu oraz metabolizmie. W literaturze stosunkowo niewiele jest badań dotyczących wpływu kwasów tłuszczowych zawierających CLA pochodzących z produktów żywnościowych na komórki

nowotworowe m.in. komórki czerniaka oraz potencjalnych proapoptotycznych mechanizmów, za pomocą których izomery te mogą obniżać żywotność komórek nowotworowych.

Stąd też, zasadność podjęcia przez Doktoranta badań *in vitro* dotyczących przeciwnowotworowego działania mieszaniny kwasów tłuszczowych wyekstrahowanych z żółtek jaj kurzych wzbogaconych w sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA) względem ludzkich komórek nowotworowych czerniaka linii WM793 oraz 1205Lu, jak również prawidłowych komórek fibroblastów linii BJ stanowiących kontrolę (grupę odniesienia) uważam za celowe i bardzo potrzebne, nie tylko ze względów poznawczych, ale również aplikacyjnych.

3. Ogólna charakterystyka i ocena formalna pracy

Układ rozprawy doktorskiej jest typowy dla prac promocyjnych o charakterze doświadczalnym. Dysertacja jest klasycznym opracowaniem przedstawionym w postaci maszynopisu, liczącym 156 stron, składającym się z 8 rozdziałów oraz wykazu stosowanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim. W pracy zamieszczono 9 tabel oraz 22 ryciny. Poszczególne rozdziały pracy układają się w logiczną całość. Konstrukcję pracy doktorskiej oparto na sześciu głównych rozdziałach obejmujących wstęp stanowiący przegląd piśmiennictwa naukowego z zakresu prowadzonych badań, cel pracy oraz hipotezy badawcze, materiał i metody, wyniki, dyskusję wyników oraz podsumowanie. Pierwsze rozdziały zawierają wstęp i przegląd piśmiennictwa (część teoretyczna), a pozostałe dotyczą części empirycznej. Proporcje poszczególnych części pracy są prawidłowe, a uzyskane wyniki zinterpretowano i przedyskutowano prawidłowo.

W dysertacji zacytowano 216 publikacji naukowych i 7 stron internetowych. Dobór bibliografii jest odpowiedni i obejmuje najważniejsze pozycje literaturowe z tego zakresu. Od strony formalnej praca nie budzi zastrzeżeń.

4. Charakterystyka i ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Badania do niniejszej rozprawy doktorskiej przeprowadzono w ramach 2 grantów badawczych finansowanych z Narodowego Centrum Nauki (2011/03/B/NZ9/01423 oraz 2016/21/N/NZ9/01331), w których w jednym Doktorant był wykonawcą a w drugim kierownikiem.

Problematyka pracy mająca na celu poznanie oraz wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za proliferację komórek nowotworowych, indukcję apoptozy oraz wytypowanie genów i białek związanych z apoptozą, których ekspresja uległa zmianie na skutek działania mieszaniny sprzężonych dienów kwasu linolowego pochodzących z żółtek jaj kurzych wzbogaconych w CLA w moim odczuciu jest bardzo cenna. Stąd też wybór problemu badawczego recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr. Dominika Domagały jest w pełni uzasadniony potrzebami społecznymi i bardzo aktualny w kontekście stale wzrastającej liczby zachorowań na różne typy nowotworów, w tym również nowotwory skóry.

Przegląd piśmiennictwa jest bardzo dobrym wprowadzeniem w problematykę opracowania oraz przeprowadzonych w dalszej części pracy analiz. W rozdziale tym, Doktorant przedstawia m.in. definicję, przyczyny powstawania oraz patofizjologię nowotworów, zagadnienia związane z apoptozą komórek oraz wzbogacanie żywności, jak również syntezę, źródła żywieniowe i właściwości prozdrowotne sprzężonych dienów kwasu linolowego.

Podsumowując stwierdzam, iż Doktorant dokonując opisu dotychczasowego stanu wiedzy, dobrze uzasadnił założenia pracy oraz potrzebę podjęcia niniejszych badań.

Cel pracy został przedstawiony prawidłowo i łączy się w logiczną całość z wcześniejszym przeglądem piśmiennictwa, pozwalając na weryfikację postawionych hipotez. Do zrealizowania celu głównego określono 4 cele szczegółowe oraz sformułowano cztery **hipotezy badawcze**.

Materiały i metody. Badanie zostało przeprowadzone w ramach projektów badawczych NCN, a Doktorant umiejętnie wykorzystał bardzo dobre wyposażenie Katedry Żywienia Człowieka UR w Krakowie, jak również wiedzę i umiejętności zespołu realizującego badania z zakresu nutrigenomiki żywienia człowieka. Metodyka pracy została dobrze zaplanowana i szczegółowo opisana (15 stron maszynopisu), z dokładnym podaniem warunków doświadczalnych (m.in. wzbogacanie jaj kurzych w CLA, ich pozyskiwanie i identyfikacja; hodowle komórkowe wraz z warunkami doświadczalnymi), wykonania poszczególnych analiz, w tym cytotoksyczności, proliferacji, apoptozy oraz ekspresji genów i białek, jak również zastosowanych metod (np. metody RealTime-PCR, Western blot), odczynników do analiz oraz sprzętu najnowszej generacji. Pozwala to na dokładne prześledzenie poszczególnych etapów pracy oraz ich możliwości odwzorowania.

Rozdział **Wyniki** składa się z ośmiu podrozdziałów. W tej części - wynikowej Doktorant wyczerpująco omówił uzyskane wyniki, które zinterpretowano w oparciu o właściwie dobrane metody statystyczne. Wyniki zostały przedstawione w logiczny i zrozumiały sposób. Nazwy rozdziałów są czytelne i oddają w pełni informację dotyczącą zamieszczonych analiz. Wyniki badań zostały zestawione w postaci tabel i rycin. To, co się nasuwa w trakcie czytania tego rozdziału, to ewentualne przeniesienie podrozdziałów 4.1. *Analiza profilu wyekstrahowanej mieszaniny kwasów tłuszczowych* oraz 4.2 *Wybór optymalnego, nietoksycznego zakresu stężeń mieszaniny kwasów tłuszczowych* do metodyki (sprawa dyskusyjna) oraz interesujące graficzne przedstawienie zarówno detekcji komórek apoptotycznych, jak również zmiany fazy cyklu komórkowego komórek nowotworowych i proponowanych mechanizmów działania mieszanin kwasów tłuszczowych. Wymaga to z jednej strony dobrej znajomości programów (np. program GraphPad Prism), jak również dobrej znajomości metod i możliwości ich zastosowania w praktyce.

Dyskusja wyników jest dobrze napisaną i wartościową częścią dysertacji. Ta część rozprawy przedstawiona została zgodnie z zaprezentowanymi wcześniej celami oraz opisanymi wynikami, co sprawia, że praca jest spójna tematycznie, a jej układ przejrzysty. Autor rzetelnie i umiejętnie

konfrontuje własne osiągnięcia i obserwacje z wynikami prac innych autorów w odniesieniu do postawionych hipotez badawczych, starając się określić stopień ich weryfikacji. Należy podkreślić, że Doktorant wykazał się dobrą znajomością stanu wiedzy w zakresie rozwiązywanego problemu badawczego. Ma On jednak świadomość ograniczeń prowadzonych analiz wskazując na konieczność ich kontynuacji i potwierdzenia np. badanych związków (naturalnych oraz syntetycznych) w stosunku do innych typów nowotworów. Dodatkowym ciekawym atutem pracy i jednocześnie godnym podkreślenia, jest przedstawienie w podsumowaniu proponowanych mechanizmów apoptozy ludzkich komórek nowotworowych linii WM793 pod wpływem działania mieszaniny kwasów tłuszczowych wyekstrahowanych z żółtka jaja kurzego wzbogaconego w CLA (ryc. 21) oraz dla porównania działania mieszaniny kwasów tłuszczowych wyekstrahowanych z żółtka jaja kurzego niewzbogaconego w CLA (ryc. 22). Wskazuje to na możliwości praktycznego zastosowania uzyskanych wyników oraz wytyczenie kierunków dalszych badań (np. na zwierzętach doświadczalnych).

Przygotowaną rozprawę doktorską kończy rozdział **Podsumowanie** (z wnioskiem ogólnym). Zdaniem recenzenta siedem przedstawionych w podsumowaniu punktów bardziej odpowiada stwierdzeniom końcowym, które są syntetycznym podsumowaniem podjętych badań. Weryfikacja hipotez odzwierciedla najistotniejszą wartość merytoryczną pracy. Doktorant wykazał, że mieszanina kwasów tłuszczowych wyizolowanych z żółtka jaja kurzego wzbogaconego w procesie biofortyfikacji w izomery CLA silniej niż mieszanina kwasów tłuszczowych nie zawierających tych izomerów zmniejszała proliferację ludzkich komórek nowotworowych czerniaka linii WM793, a nie wykazano tak istotnych zmian w przypadku komórek nowotworowych linii 1205Lu.

Ponadto obniżenie proliferacji ludzkich komórek nowotworowych czerniaka było związane z indukcją apoptozy. Mieszanina badanych kwasów wzbogaconych w CLA zwiększała ekspresję genów oraz aktywację białek odpowiedzialnych głównie za apoptozę zależną od szlaku mitochondrialnego. Tak jak słusznie podkreśla Doktorant istnieje konieczność kontynuacji tego typu badań z powodu braku spójności wyników z obecnym stanem wiedzy, ale głównie z powodu ich nowości wymagającej potwierdzenia.

Bibliografia – wg. Doktoranta liczy 218 pozycji, przy czym po odjęciu powtórzeń (3 razy jest zapisana ta sama pozycja literaturowa - Ochoa i in., 2004) obejmuje 216 pozycji literaturowych. Zamieszczona w pracy bibliografia jest obszerna i dobrze dobrana, pochodzi głównie z ośrodków zagranicznych, stanowiących przeważającą większość w tym zakresie (powyżej 95%), w tym 7 pozycji pochodzi z własnego ośrodka (Katedra Żywienia Człowieka UR w Krakowie, w tym w 2 Doktorant jest współautorem). Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant zacytował zarówno prace pochodzące sprzed wielu lat (1957 – poz. 65) jak i najnowsze z 2019 roku. Świadczy to o dobrym rozeznaniu literaturowym Autora rozprawy.

Jak wspomniałam wcześniej, oceniana dysertacja wykonana jest starannie i napisana została poprawnie pod względem językowym i merytorycznym, niemniej jednak z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kilka kwestii, które zauważyłam podczas czytania pracy:

- podpisy rycin powinny znajdować się pod rycinami, tak jak w przypadku ryc. 21 i 22;
- zmiana miejsca i kolejność niektórych tabel i rycin zwiększyłaby czytelność pracy (np. tab. 6 i ryc. 14; podsumowanie str. 74 na str. 75);
- nieliczne błędy literowe i stylistyczne (np. apoptoryczne zamiast apoptotyczne – str. 57, treść jaj, tytuły podrozdziałów 6.6; 5.7 i 5.8 - powinno być wpływ nie wpływu);
- drobne nieścisłości w spisie piśmiennictwa (np. poz. 105 i 107; 113 i 114 bez liter a, b; pisownia czasopism).

Odnosząc się do przeprowadzonych przez Doktoranta badań i bardzo ciekawych wyników własnych, podczas publicznej obrony pracy doktorskiej prosiłabym o ustosunkowanie się do poniższych kwestii:

- Jaki był wkład Doktoranta w badania, biorąc pod uwagę iż przedstawione w dysertacji wyniki były realizowane w ramach 2 grantów badawczych finansowanych przez NCN?
- Co Doktorant uznaje za swoje nowatorskie osiągnięcie naukowe i jak zamierza to wykorzystać w dalszej pracy? Czy zaprezentowany układ badawczy można wykorzystać do opracowania zaleceń dietetycznych w celu projektowania terapii dietetycznych na etapie prewencji/leczenia chorób nowotworowych?
- Jakie są możliwości i jednocześnie ograniczenia wykorzystania uzyskanych wyników?

5. Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji praca doktorska oraz uzyskane wyniki są bardzo interesujące z punktu widzenia poznawczego, a problem badawczy podjęty przez Doktoranta ma ważne znaczenie naukowe, duży potencjał eksploracyjny i mam nadzieję realne możliwości zastosowania w profilaktyce zdrowotnej. Przedstawiona w pracy część teoretyczna nie budzi zastrzeżeń. Jest dobrze osadzona w obszernej, aktualnej i trafnie dobranej literaturze przedmiotu. Część doświadczalna została przedstawiona jasno i przejrzysto, a sformułowane hipotezy badawcze prawidłowo zweryfikowane. Część eksperymentalna została przeprowadzona konsekwentnie według zamierzeń, starannie i przy pomocy dobrze dobranych oraz aktualnych (nowoczesnych) metod badawczych z wykorzystaniem bardzo dobrze wyposażonego zaplecza badawczego Katedry Żywienia Człowieka UR w Krakowie. Przeprowadzona analiza statystyczna z wykorzystaniem adekwatnych metod oraz prawidłowa interpretacja uzyskanych wyników pozwoliła na sformułowanie stwierdzeń i wniosków, które nie

wykraczają poza uzyskane wyniki, są wyważone i korespondują z celem badań, jaki nakreślił sobie Doktorant. Praca wnosi nowe elementy wiedzy z zakresu nutrigenomiki żywienia człowieka.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Dominika Domagały, pt. *„Apoptoza komórek czerniaka indukowana przez kwasy tłuszczowe żółtka jaja biofortyfikowanego w sprzężone dniy kwasu linolowego (CLA)”* spełnia wszystkie wymagania ustawowe określone w Ustawie z dnia 14. marca 2003 roku stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki wraz z późniejszymi zmianami, stawiane rozprawą doktorskim (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595, z późn. zm.). Autor wykazał się dobrą znajomością tematu, zrealizował postawione sobie cele badawcze i umiejętnie zinterpretował uzyskane wyniki, wnosząc nowe dane do nauki o żywności i żywieniu. Stąd też wnioskuje do Wysokiej Rady Wydziału Technologii Żywności, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr. Dominika Domagały do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę podjętą tematykę, wpisującą się w nurt najnowszych badań z zakresu nutrigenomiki, szeroki zakres dobrze zaplanowanych i konsekwentnie zrealizowanych badań oraz wnikliwą analizę uzyskanych wyników, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Dominika Domagały** pt. *„Apoptoza komórek czerniaka indukowana przez kwasy tłuszczowe żółtka jaja biofortyfikowanego w sprzężone dniy kwasu linolowego (CLA)”*.

KIEROWNIK ZAKŁADU

/ Dr hab. Jadwiga Hamulka /
Profesor nadzwyczajny SGGW