

Prof. dr hab. med. Jacek Jawień  
Katedra Farmakologii Collegium Medium UJ  
31-531 Kraków, ul. Grzegórzecka 16  
tel. 12 421 11 68 (609 192 058)  
e-mail: [mmjawien@cyf-kr.edu.pl](mailto:mmjawien@cyf-kr.edu.pl)

Kraków, 14.06.2019

## RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Recenzja pracy doktorskiej mgr. inż. Angeliki Manterys, pt.: „*Ocena przeciwmiążdżycowego działania witaminy K<sub>2</sub> podawanej w formie syntetycznej oraz produktu żywnościowego - natto u myszy ApoE/LDLR-/-*”.

Przedstawiona do oceny praca posiada typowy dla rozprawy doktorskiej układ. Liczy 165 stron, zawiera 18 tabel, 42 ryciny i 371 pozycji piśmiennictwa. Praca przygotowana jest przejrzyście i nowocześnie.

Witamina K do niedawna kojarzona była jedynie z regulacją układu krzepnięcia. Termin witamina K odnosi się do grupy rozpuszczalnych w tłuszczach związków chemicznych wśród których wyróżnić można witaminę K<sub>1</sub> (filochinon) oraz witaminę K<sub>2</sub> (menachinony), na którą składa się kilka form pochodnych, różniących się długością bocznego łańcucha izoprenoidowego. Wzrost zainteresowania działaniem biologicznym tych związków pojawił się w momencie odkrycia, że witamina K wpływa na procesy kalcyfikacji zarówno kości, jak i tkanek miękkich. Proces kalcyfikacji naczyń krwionośnych często towarzyszy miażdżycy, przez co zasadnym wydaje się zbadanie wpływu witaminy K<sub>2</sub> na proces rozwoju miażdżycy.

Wyniki badań wykazały negatywną korelację pomiędzy spożyciem witaminy K<sub>2</sub> a umieralnością z powodu choroby niedokrwiennej serca. Jednocześnie zależność taka nie została zaobserwowana w przypadku spożycia witaminy K<sub>1</sub>.

Dane żywieniowe dotyczące spożycia witaminy K wskazują, że z tzw. dietą zachodnią (charakterystyczną dla mieszkańców Europy i Ameryki Północnej) dostarczana jest głównie witamina K<sub>1</sub>, stanowiąc 90% całkowitej podaży tej witaminy. Ze względu na fakt, że witamina K<sub>2</sub> (za wyjątkiem pochodnej MK-4) powstaje w wyniku syntezy bakteryjnej, produktami będącymi najbogatszym źródłem tych związków dla Europejczyków mogą być sery dojrzewające oraz w mniejszym stopniu kiszonki spożywane w Europie Środkowo-

Wschodniej. Mimo to, stężenia menachinonów w organizmie mieszkańców Europy są kilkukrotnie niższe w porównaniu do Japończyków. Zmienność ta wynika z faktu częstego spożywania w Japonii fermentowanej soi *natto*, dla której zawartość menachinonu-7 jest około dziesięciokrotnie większa w porównaniu do spożywanych w Europie serów podpuszczkowych.

Duża zawartość witaminy K<sub>2</sub> w soi fermentowanej warunkowana jest przez wykorzystywane w czasie produkcji kultury bakterii *Bacillus subtilis natto*. Dodatkowo proces fermentacji powoduje zmiany w składzie chemicznym nasion soi oraz pojawienie się w końcowym produkcie bioaktywnych składników nieodżywczych takich jak nattokinaza.

**Tytuł pracy** jest zgodny z treścią rozprawy.

**Wstęp** jest dobrze uzasadniony merytorycznie. Stanowi on wartościowy element rozprawy i wprowadzenie do badanych w pracy zagadnień.

**Cele pracy** są przedstawione klarownie i jednoznacznie, a ich wybór jest dobrze uzasadniony z punktu widzenia poznawczego.

Celem niniejszej rozprawy było określenie działania witaminy K w procesie rozwoju i progresji blaszki miażdżycowej ze szczególnym uwzględnieniem długołańcuchowego menachinonu-7 podawanego w formie syntetycznej, jak i produktu żywnościowego *natto*. Dokonano również oceny wpływu zwiększonego spożycia witaminy K<sub>2</sub> na czynniki istotne w przebiegu aterosogenezy, takie jak metabolizm lipidowy i procesy antyoksydacyjne.

W oparciu o dotychczasowe dane literaturowe postawiono hipotezę o przeciwmiażdżycowym działaniu witaminy K<sub>2</sub>. Weryfikację hipotezy przeprowadzono na podstawie trzech doświadczeń żywieniowych w mysim modelu miażdżycy, pozwalających określić:

1. wpływ wybranych form witaminy K na progresję zmian miażdżycowych i strukturę blaszki miażdżycowej u dorosłych myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>,
2. wpływ syntetycznej witaminy K<sub>2</sub> MK-7 na rozwój zmian miażdżycowych u rosnących myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>,
3. wpływ zwiększonej podaży produktu żywnościowego *natto*, będącego źródłem witaminy K<sub>2</sub> MK-7, na rozwój zmian miażdżycowych u rosnących myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>.

W ramach realizacji trzeciego zadania badawczego przeprowadzono ocenę składu chemicznego oraz aktywności antyoksydacyjnej soi fermentowanej *natto*.

**Metodyka** – jest opisana bardzo przejrzyście.

Głównym celem niniejszej rozprawy było określenie działania VK w procesie rozwoju i progresji blaszki miażdżycowej ze szczególnym uwzględnieniem długołańcuchowego menachinonu-7 (MK-7) podawanego w formie syntetycznej, jak i produktu żywnościowego *natto*. Weryfikację hipotezy o przeciwmiażdżycowym działaniu VK<sub>2</sub> wykonano na podstawie trzech doświadczeń żywieniowych na zwierzęcym modelu miażdżycy – myszach ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>.

W doświadczeniu I zastosowano ośmiotygodniową suplementację wybranymi formami VK (VK<sub>1</sub>, MK-4 i MK-7) w dawce 10 mg/kg m.c. u dorosłych (24 tygodniowych) myszy. Kolejne II doświadczenie prowadzono na zwierzętach rosnących (16 tygodniowych) stosując suplementację VK<sub>2</sub> MK-7 w dawkach 0,05 i 1 mg/kg m.c.

W doświadczeniu III przeprowadzono fermentację nasion soi bakteriami *Bacillus subtilis natto* w celu uzyskania produktu o dużej zawartości VK<sub>2</sub> MK-7, którym następnie żywiono rosnące myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> przez okres ośmiu tygodni. Ilość soi fermentowanej w dietach odpowiadała dawkom MK-7 zastosowanym w doświadczeniu II.

Opis **analizy statystycznej** dowodzi dobrego opanowania metod analitycznych przez Doktorantkę. Dobór metod statystycznych pozwala na właściwą interpretację uzyskanych wyników.

**Wyniki** stanowią wartościową część pracy.

- 1) Suplementacja witaminą K<sub>2</sub> powoduje istotną redukcję masy ciała dorosłych myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>. Brak wpływu VK<sub>1</sub> na przyrosty masy ciała wskazuje na mechanizm zależny od stopnia nienasycenia łańcucha bocznego naftochinonu.
- 2) Suplementacja witaminą K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> MK-4, K<sub>2</sub> MK-7 w dawce 10 mg/kg m.c. przyczynia się do poprawy parametrów profilu lipidowego dorosłych myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>, wyrażonej zmniejszonym stosunkiem cholesterolu całkowitego do frakcji HDL.



- 3) Powierzchnia zmian miażdżycowych, oceniana metodą *cross-section*, była najmniejsza, spośród badanych grup, u dorosłych myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> suplementowanych witaminą K<sub>2</sub> MK-7 w dawce 10 mg/kg m.c. Dodatkowo parametr ten był istotnie mniejszy w porównaniu do suplementacji witaminą K<sub>2</sub> MK-4, co wskazuje na różnice w działaniu poszczególnych form witaminy K<sub>2</sub>, zależne od długości łańcucha bocznego menachinonu. Jednocześnie, niezależnie od formy, suplementacja witaminą K nie wpływa istotnie na strukturę blaszki miażdżycowej w początkowym odcinku aorty wstępującej odcinka.
- 4) Witamina K<sub>2</sub> MK-7 podawana w dawce 1 mg/kg m.c. wykazuje działanie hipocholesterolemiczne w osoczu rosnących myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> obniżając poziom cholesterolu frakcji LDL. Suplementacja tą witaminą przyczynia się również do zmian profilu kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej oraz tkance wątrobowej m. in. zwiększając udział nieparzystych kwasów tłuszczowych.
- 5) Suplementacja witaminą K<sub>2</sub> MK-7 w dawce 0,05 oraz 1 mg/kg m.c. nie wykazała jednoznacznego wpływu na rozwój zmian miażdżycowych u rosnących myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>. Uzyskane wyniki nie pozwalają na potwierdzenie hipotezy o przeciwmiażdżycowym działaniu suplementacji witaminą K<sub>2</sub> MK-7.
- 6) Fermentacja bakteriami *Bacillus subtilis natto* powoduje istotne zwiększenie zawartości witaminy K<sub>2</sub> MK-7, wody, białka oraz tłuszczu surowego w nasionach soi. Dodatkowo w czasie fermentacji następuje zwiększenie zawartości polifenoli ogółem w produkcie, jednak bez wpływu na potencjał antyoksydacyjny nasion soi.
- 7) Zwiększona podaż *natto* nie ma wpływu na masę ciała, metabolizm lipidowy oraz potencjał antyoksydacyjny osocza i tkanki wątrobowej.
- 8) Ośmiotygodniowe podawanie *natto* w ilości 19% diety hamuje rozwój zmian miażdżycowych w proksymalnym odcinku pnia ramiennie-głowego rosnących myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>.

**Dyskusja** jest prowadzona jasno i kompetentnie. Dowodzi ona swobodnego poruszania się Autorki w dość złożonym dotychczasowym dorobku światowym w tej materii, a zarazem umieszcza uzyskane przez siebie wyniki we właściwym świetle.

Witamina K odgrywa istotną rolę w regulacji procesów zakrzepowych oraz w procesach przebudowy kości, poprzez mechanizmy regulowane przez białka zależne od witaminy K (VKD). Ostatnie badania epidemiologiczne wskazują, że spożywanie witaminy K<sub>2</sub> – wywierającej głównie skutki pozawątrobowe (ale nie witaminy K<sub>1</sub> - wywierającej głównie skutki wątrobowe) – zmniejsza śmiertelność sercowo-naczyniową i całkowitą śmiertelność. Tego efektu nie można wytłumaczyć znanymi dzisiaj mechanizmami działania witaminy K<sub>2</sub>.

Na podstawie otrzymanych wyników nie stwierdzono wpływu ośmiotygodniowego podawania VK<sub>2</sub> MK-7, zarówno w dawce 0,05, jak 1 mg/kg m.c. na potencjał antyoksydacyjny osocza oraz tkanki wątrobowej myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>.

Podsumowując przedstawione wyniki, mimo korzystnego wpływu VK<sub>2</sub> MK-7 na profil lipidowy, masę ciała oraz profil kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej i wątrobowej nie można potwierdzić istotnego wpływu podawania tego związku w okresie ośmiu tygodni na rozwój oraz strukturę zmian miażdżycowych u myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>. Obiecujące oraz stwarzające pole do dalszych badań wydaje się natomiast działanie VK<sub>2</sub> MK-7 w zakresie metabolizmu lipidowego szczególnie, w kontekście częstości występowania chorób metabolicznych.

Wyniki uzyskane po 8 tygodniowym podawaniu soi fermentowanej *natto* nie potwierdziły korzystnego wpływu fermentacji bakteriami *Bacillus subtilis natto* na zwiększenie potencjału antyoksydacyjnego w osoczu oraz tkance wątrobowej myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>. Obserwacje te wynikać mogą z opisanego wcześniej braku wpływu fermentacji na potencjał antyoksydacyjny surowców użytych do przygotowania diet. Co ciekawe, porównując wyniki pod kątem ilości zastosowanego dodatku soi do diety, również nie zaobserwowano różnic między badanymi grupami. Wskazuje to zatem na brak wpływu fermentacji, ale także samej soi, na potencjał antyoksydacyjny organizmu.

Warto dodać w tym miejscu, że wstępne wyniki badań Pana Profesora Chłopickiego i wsp. wskazują na to, że witamina K<sub>2</sub> podawana w małej dawce poprawia czynność śródbłonka u myszy z miażdżycą. Sądzą oni, że upośledzenie endogennej syntezy witaminy

K2 w śródbłonku przyczynia się do rozwoju dysfunkcji śródbłonka w miażdżycy, a suplementacja witaminy K2 odwraca deficyt endogennej witaminy K2 w śródbłonku, a w konsekwencji poprawia status karboksylacji białek zależnych od witaminy K i czynność śródbłonka.

**Wnioski:** są zgodne z wynikami pracy i prawidłowo opisane

**Piśmiennictwo** jest bardzo obszerne, adekwatne i aktualne, a jego dobór potwierdza dobrą znajomość dostępnej i aktualnej literatury, dotyczącej tematów poruszanych w rozprawie.

**Uwagi:**

Na str. 56: Na podstawie analizy preparatów barwionych ORO oceniono, że najbardziej reprezentatywna dla początkowego odcinka aorty wstępującej dorosłych myszy jest część środkowa, z tego względu analizę parametrów jakościowych prowadzono dla preparatów z wysokości 400, 500 i 600  $\mu\text{m}$  od pojawienia się płatków zastawki aortalnej. Wynikiem końcowym ocenianych parametrów dla poszczególnych zwierząt była średnia arytmetyczna z trzech wymienionych wysokości.

Jest to odejście od kanonicznego postępowania, biorącego pod uwagę 10 kolejnych przekrojów tzw. „korzenia aorty” – od jego początku do końca, obejmując w ten sposób cały 1 mm długości „korzenia aorty”. Taka zmiana metodyki mogła odbić się na precyzji otrzymanych wyników.

Praca zawiera kilka błędów literowych:

- na str. 21 powinno być:

prawidłowej

ezetymibu

*area under the curve*

- str. 22:

remnanty



## Podsumowanie

Prezentowana praca stanowi oryginalne doniesienie eksperymentalne na temat przeciwmiażdżycowego działania witaminy K2.

W mojej ocenie rozprawa mgr. inż. Angeliki Manterys spełnia warunki stawiane pracom na stopień doktora nauk rolniczych.

W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Jacek Jawień*

Prof. dr hab. med. Jacek Jawień

*Prof. dr hab. med. Jacek Jawień*

Kraków, ul. Kolberga 14/7

tel. 609 192 058

2452935

980602365