

Jabłonna, 19 listopada 2018 r.

Dr hab. Jarosław Woliński, prof. nadzw.
Zakład Fizjologii Zwierząt
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt *im. Jana Kielanowskiego*
Polskiej Akademii Nauk, Jabłonna

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Błaszczyk pt. „Działanie beta-glukanów owsa w stanach zapalnych jelit-badania modelowe” (Action of oat beta-glucans in inflammatory bowel diseases - model studies) wykonanej pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. Joanny Gromadzkiej-Ostrowskiej oraz Promotora pomocniczego dr inż. Jacka Wilczaka. Pracę wykonano w Katedrze Dietetyki Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Nieswoiste zapalenie jelit (*inflammatory bowel disease, IBD*) to grupa schorzeń przewodu pokarmowego skupiająca dwie jednostki chorobowe: wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*ulcerative colitis*) oraz chorobę Leśniowskiego-Crohna. Niestety z roku na rok, liczba chorych wzrasta natomiast w dalszym ciągu nie jest znany patomechanizm wywołujący zapalenia, a także nie ma skutecznych metod leczenia. Jest to grupa chorób, która dotyka ludzi młodych, między 15 a 40 rokiem życia, a przez swoją specyfikę bardzo często może prowadzić do wykluczenia z życia społecznego. Uporczywe biegunki, wymioty, ból oraz niespecyficzne objawy ogólnoustrojowe mogą uniemożliwić naukę, oraz pracę, a także doprowadzić do ciężkiej depresji. Szacuje się, że aktualnie w Polsce co roku diagnozuje się 700-1000 nowych przypadków nieswoistych zapaleń jelit. We wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego proces zapalny dotyczy błony śluzowej, a także podśluzowej. Jest to choroba przewlekła z długimi okresami remisji, które przerywane są nagłymi i ostrymi nawrotami. Z punktu widzenia patofizjologii przewodu pokarmowego w dużym uproszczeniu mechanizm wrzodziejącego zapalenia jelita polega na utracie przez błonę śluzową jelita swojej integralności tkankowej, która zapewnia prawidłową funkcję bariery jelitowej, a tym samym umożliwia penetrację błony śluzowej przez mikroorganizmy patogenne oraz substancje chemiczne. W warunkach fizjologicznych integracja błony śluzowej utrzymywana jest przez wypadkową intensywności przebiegu procesów apoptozy i proliferacji. W przypadku silnego bodźca patogenne może dojść do powstania stanów zapalnych i uszkodzenia błony śluzowej w przewodzie pokarmowym. W warunkach zapalenia tempo proliferacji komórek macierzystych krypt jelitowych jest spowolnione, natomiast śmierć enterocytów/kolonocytów istotnie wzrasta, co w konsekwencji prowadzi do atrofii i braku możliwości odbudowy błony śluzowej.

Beta-glukany, które naturalnie występują między innymi w ziarnach zbóż, są w ostatnich latach tematem wielu badań i opracowań naukowych. Polisacharydy te wykazują silne działanie immunomodulacyjne na komórki układu odpornościowego zlokalizowanego na terenie przewodu pokarmowego. Ulegając fermentacji, mogą również modyfikować środowisko jelita, stwarzając optymalne warunki do rozwoju bakterii o właściwościach prebiotycznych. Mając również na uwadze ich właściwości przeciwnowotworowe, przeciwalergiczne oraz przeciwosteoporotyczne zasadne jest badanie ich potencjalnego wpływu na procesy zapalne na terenie przewodu pokarmowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Błaszczyk pt. „Działanie beta-glukanów owsa w stanach zapalnych jelit – badania modelowe” obejmuje przeprowadzone przez Autorkę badania mające na celu określenie roli beta-glukanów owsa w stanach zapalnych jelita grubego. Ponadto, podjęto próbę określenia ich wpływu na badane parametry w zależności od masy molowej podawanego, czystego chemicznie preparatu.

Sam wybór bardzo istotnego i aktualnego tematu badań z punktu widzenia aktualnych problemów gastroenterologii, jakim są nieswoiste formy stanów zapalnych jelit (IBD) należy ocenić bardzo wysoko, jako zasadny naukowo, dający możliwość transferu wyników badań na modelu zwierzęcym do praktyki klinicznej.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Błaszczyk jest zbiorem dwóch oryginalnych prac, przedstawiona do recenzji w postaci 69-stronicowej wersji drukowanej formatu A4 w sztywnej oprawie. Układ dysertacji jest prawidłowy i zawiera streszczenie (w języku polskim i angielskim), spis prac wchodzących w skład rozprawy, wykaz skrótów, spis treści, wstęp oraz uzasadnienie podjętego tematu zawierające teoretyczne podstawy problemu, cel i hipotezy badawcze, zakres badań wchodzących w skład rozprawy, metodykę badań, syntetyczne omówienie wyników, podsumowanie, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo oraz załączniki (dwa artykuły wchodzące w skład rozprawy wraz z oświadczeniami współautorów dotyczące procentowego udziału w tworzeniu publikacji).

Jednotematyczne opracowanie pod wspólnym tytułem składa się z dwóch oryginalnych publikacji, których łączna liczba punktów MNiSW wynosi 60, liczba cytowań = 18, a sumaryczny IF = 7,712. Artykuły dotyczą wpływu beta-glukanów owsa na parametry błony śluzowej jelita grubego oraz profil transkryptomiczny w krwi obwodowej szczurów z indukowanym zapaleniem za pomocą liposacharydów (LPS). Oryginalne artykuły są pracami opublikowanymi w czasopismach z Listy Filadelfijskiej (*Food & Function* oraz *European Journal of Nutrition*). Spełnione zostały tym samym ustawowe wymogi co do spójności tematycznej publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Do rozprawy dołączono oświadczenia Doktorantki oraz wszystkich współautorów, wskazujące na istotny wkład Pani Błaszczyk w opracowanie koncepcji badań, udziału w części eksperymentalnej oraz opracowaniu i interpretacji wyników opublikowanych prac.

Wstęp oraz uzasadnienie podjętego tematu badań wprowadza czytelnika w tematykę ocenianej rozprawy. Doktorantka w sposób czytelny wykazała istotną rolę beta-glukanów w fizjologii przewodu pokarmowego oraz ich rolę w nieswoistych stanach zapalnych jelit ze szczególnym uwzględnieniem zapalenia jelita grubego.

Zaplanowane w pracy badania zostały zrealizowane na modelu szczurzym. Układ doświadczalny jest prawidłowo skonstruowany i według Recenzenta w pełni umożliwia zrealizowanie postawionych celów. Na podkreślenie zasługuje fakt wysokiego i nowoczesnego poziomu analitycznego wykonanych badań i oznaczeń.

Jako cel pracy Doktorantka postawiła sobie określenie działania/wpływu dwóch czystych chemicznie preparatów beta-glukanów o różnej masie molowej (małej i dużej) izolowanych z ziaren owsa na profil komórek odpornościowych w ścianie jelita, wybrane parametry immunologiczne i parametry równowagi redoks w jelicie oraz ekspresję genów białek szlaków sygnałowych w komórkach jądrazstych krwi obwodowej w modelu stanu zapalnego jelit *in vivo*. Do osiągnięcia celu, Doktorantka przeprowadziła badania w poszukiwaniu odpowiedzi na pytania:

1. Czy wzbogacenie pokarmu w beta-glukany owsa ma wpływ na profil komórek odpornościowych jelita, wybrane parametry obrony humoralnej i równowagi redoks w jelicie zmienionym stanem zapalnym tego narządu oraz liczebność mikroflory jelitowej i profil krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w kale?
2. Czy wzbogacenie pokarmu w beta-glukany owsa ma wpływ na ekspresję genów białek sygnałowych w komórkach jądrazstych krwi obwodowej zmienionych stanem zapalnym jelita?
3. Czy powyższe działanie beta-glukanów owsa zależą od ich masy molowej?

Najważniejszą część rozprawy stanowią dwa artykuły przedstawiające wyniki badań z udziałem czystych chemicznie preparatów beta-glukanów owsa o różnej masie molowej spożywanych z paszą na profil komórek odpornościowych, markery stanu zapalnego, równowagi redoks jelita oraz liczebność bakterii kwasu mlekowego i profil krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w kale szczurów z wywołanym eksperymentalnie stanem zapalnym jelita:

1. Wilczak J, Błaszczyk K, Kamola D, Gajewska M, Harasym JP, Jałosińska M, Gudej S, Suchecka D, Oczkowski M, Gromadzka-Ostrowska J. (2015). The effect of low or high molecular weight oat beta-glucans on the inflammatory and oxidative stress status in the colon of rats with LPS-induced enteritis. *Food & Function*, Feb;6(2):590-603. doi: 10.1039/c4fo00638k, (30 pkt. MNiSW; IF = 3,289).
2. Błaszczyk K, Gajewska M, Wilczak J, Kamola D, Majewska A, Harasym J, Gromadzka-Ostrowska J. (2018). Oral administration of oat beta-glucan preparations of different



molecular weight results in regulation of genes connected with immune response in peripheral blood of rats with LPS-induced enteritis. *European Journal of Nutrition*, Oct 4. doi: 10.1007/s00394-018-1838-3, (30 pkt. *MNiSW*; *IF* = 4,423).

W pierwszej pracy zbadano wpływ beta-glukanów owsa o małej i dużej masie molowej na stężenie wybranych cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych, a także wykonano analizę cytometryczną populacji poszczególnych fenotypów leukocytów znajdujących się w ścianie jelita grubego szczura z eksperymentalnie indukowanym zapaleniem błony śluzowej. Badania przeprowadzono na 72, ośmiotygodniowych szczurach Sprague-Dawley. Zwierzęta podzielono na dwie grupy po 36 osobniki. W obrębie każdej grupy, u połowy zwierząt ($n = 16$) wywołano zapalenie błony śluzowej jelita grubego przez dwukrotną infuzję dożylną lipopolisacharydu otoczek *Escherichia coli* (LPS) w dawce 10mg/kg masy ciała. U zwierząt, które otrzymywały LPS, w obrazie makroskopowym jelita obserwowano typowe objawy stanu zapalnego błony śluzowej. Również wzrost stężenia cytokiny prozapalnej IL-12 przy jednoczesnym wzroście stężenia interleukiny 10 (IL-10, cytokiny przeciwzapalnej) w homogenatach jelita potwierdził patologiczne zmiany na jego terenie. Podawanie badanych preparatów powodowało obniżenie stężenia IL-12 u wszystkich badanych zwierząt, jednak tylko w przypadku beta-glukanów o dużej masie molowej zmiana była istotna statystycznie. Nie odnotowano wpływu badanego czynnika na stężenie czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- α). Podając zwierzętom preparat o dużej masie molowej, zaobserwowano obniżenie stężenia cytokiny przeciwzapalnej IL-10 do poziomu oznaczonego u zwierząt z grupy kontrolnej. Ponadto, badano wpływ beta-glukanów na wybrane parametry równowagi redoks. Wykazano, że niezależnie od ich masy molowej podawanie beta-glukanów powoduje wzrost całkowitego potencjału antyoksydacyjnego błony śluzowej jelita grubego. Badane preparaty powodowały również zmiany w profilu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA), powodując wzrost stężenia kwasu propionowego, co w połączeniu ze zwiększoną liczbą bakterii kwasu mlekowego może wskazywać na właściwości probiotyczne badanych polisacharydów. Podsumowując, wszystkie efekty podawania beta-glukanów sugerują właściwości przeciwzapalne badanych preparatów z owsa.

W ocenie recenzenta coraz częściej w pracy naukowej skupiamy się na dążeniu do badania procesów fizjologicznych w mikro skali, natomiast zapominamy o efekcie, jaki może wywierać badany czynnik na tkanki, organy czy też całe układy organizmu. Głównym i najważniejszym efektem nieswoistych stanów zapalnych jelit, w tym wrzodziejącego zapalenia jelita grubego są zmiany strukturalne błony śluzowej jelita (brak integralności tkanki), a w konsekwencji zmiany funkcjonalne manifestujące się opisywanymi przez Doktorantkę parametrami. W ocenie recenzenta w niniejszym opracowaniu brakuje podstawowych, a jednocześnie najtańszych pomiarów histometrycznych jelita oraz parametrów charakteryzujących przebudowę błony śluzowej (prolifracja, apoptoza). Wykazanie, że podawanie beta-glukanów z owsa szczurom wpływa na odbudowę/regenerację struktury błony śluzowej jelita grubego byłoby ostatecznym dowodem na przeciwzapalne właściwości badanych preparatów. Biorąc jednak pod uwagę główne założenia badania, brak analiz histometrycznych błony śluzowej jelita grubego nie wpływa negatywnie na ocenianą rozprawę. Ma tylko na celu zwrócenie uwagi Doktorantki na inne możliwości wykorzystania materiału biologicznego oraz na szerszy aspekt prowadzonych przez Nią badań.

W drugiej pracy celem badania było określenie, czy suplementacja paszy beta-glukanami owsa o dużej i małej masie molowej u szczurów z wywołanym stanem zapalnym jelita grubego wpływa na ekspresję genów w komórkach jądrzastych krwi obwodowej. Badania zostały wykonane na materiale zabezpieczonym w doświadczeniu opisanym powyżej. Przeprowadzono analizę z użyciem dwukolorowych mikromacierzy ekspresyjnych, po cztery mikromacierze dla każdej grupy badanej. Na podstawie wcześniejszych wyników do tego badania wybrano 4 z 6 grup: grupa kontrolna żywiona paszą bez beta-glukanów, grupa zwierząt z wywołanym zapaleniem jelita żywiona bez dodatku beta-glukanów oraz dwie grupy zwierząt z wywołanym stanem zapalnym karmionych dietą z dodatkiem beta-glukanów o małej i dużej masie molowej. Analiza uzyskanych wyników wykazała szereg zmian ekspresji genów we wszystkich badanych grupach zwierząt. Wykazano, że beta-glukany o dużej masie molowej regulują pięć komórkowych szlaków sygnałowych związanych głównie z odpowiedzią układu immunologicznego. Z kolei beta-glukany o małej masie molowej regulują cztery komórkowe

szlaki sygnałowe związane z regulacją cyklu komórkowego i jedną ścieżkę związaną z odpowiedzią immunologiczną.

Przeprowadzone badania *in vivo* na modelu zwierzęcym w ocenie Recenzenta pozytywnie zweryfikowały postawione przez Doktorantkę hipotezy badawcze, a także pozwoliły sformułować merytoryczne wnioski, z których jasno wynika, że beta-glukany owsa wykazują na terenie jelita działanie immunomodulacyjne, przeciwzapalne, a ich mechanizm działania zależy od masy molowej.

Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską mgr Katarzyny Błaszczyk uważam, że Autorka pracy bardzo dobrze posługuje się nowoczesną metodyką badawczą, potrafi te umiejętności odpowiednio wykorzystać w pracy eksperymentatorskiej, a otrzymane wyniki logicznie zinterpretować. Należy bezwzględnie podkreślić niezwykle wysoką wartość przeprowadzonych badań, czego dowodem są wyniki opublikowane w czasopismach wysokiej rangi w danej dziedzinie. Co więcej, uzyskane wyniki pozwalają stawiać kolejne hipotezy i stanowić doskonały materiał do kolejnych badań.

Mając powyższe na uwadze, pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Błaszczyk pt. „Działanie beta-glukanów owsa w stanach zapalnych jelit-badania modelowe” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnoszę do Wysockiej Rady Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Błaszczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny oraz nowatorski charakter recenzowanej dysertacji wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

