

Prof. dr hab. Jerzy Juśkiewicz
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
Zakład Biologicznych Funkcji Żywności
ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn

Ocena

Rozprawy doktorskiej mgr KATARZYNY BŁASZCZYK p.t. „**Działania beta-glukanów owsa w stanach zapalnych jelit – badania modelowe**”, wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Joanny Gromadzkiej-Ostrowskiej i promotora pomocniczego dr inż. Jacka Wilczaka na Wydziale Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Podstawa opracowania recenzji

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Błaszczyk została przygotowana na podstawie decyzji Rady Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dnia 24 października 2018 roku oraz pisma Prodziekan ds. Nauki tego Wydziału prof. dr hab. Marzeny Jeżewskiej-Zychowicz z dnia 7 listopada 2018 roku.

Ocena strony formalnej

Recenzowana praca, stanowi zgodnie z Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), zbiór dwóch spójnych tematycznie opublikowanych anglojęzycznych artykułów naukowych, w których mgr Katarzyna Błaszczyk jest pierwszym autorem w jednym opracowaniu i drugim w kolejnym. Są to następujące publikacje:

1. Wilczak J., Błaszczyk K., Kamola D., Gajewska M., Harasym J.P., 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* 6, 590-603.
2. Błaszczyk K., Gajewska M., Wilczak J., Kamola D., Majewska A., Harasym J., Gromadzka-Ostrowska J., 2018. Oral administration of oat beta-glucans preparations of different molecular weight results in regulation of genes connected with immune

response in peripheral blood nuclear cells of rats with LPS-induced enteritis. European Journal of Nutrition. DOI: 10.1007/s00394-018-1838-3.

Pozostali współautorzy złożyli stosowane oświadczenia, wskazując ważną rolę Doktorantki w pracach koncepcyjnych, analizach laboratoryjnych i statystycznych oraz przy przygotowaniu manuskryptów. Szkoda, że Kandydatka nie pełniła roli autora korespondencyjnego w żadnej z wymienionych prac. Zdaniem recenzenta, to autor korespondencyjny jest odpowiedzialny za ostateczny kształt opublikowanego manuskryptu i dźwiga, niekiedy bardzo uciążliwy, ciężar przekonywania edytora i recenzentów do swoich racji. Promotorka pracy oraz Doktorantka złożyli deklaracje, co do zgodności opracowania z warunkami w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego oraz braku naruszenia praw autorskich osób trzecich. Do omawianego zbioru publikacji dołączono streszczenia w języku polskim i angielskim, oraz polskojęzyczny wstęp, uzasadnienie podjętego tematu w oparciu o dane literaturowe, cel, zakres badań i hipotezy badawcze, opis wykorzystanych metod badawczych, uzyskanych najważniejszych wyników prac eksperymentalnych, a opracowanie zakończono podsumowaniem i wyciągniętymi wnioskami.

Z przedstawionych do oceny dwóch prac, pierwszą opublikowano w Food & Function z IF 2,686 (2015). Taka zatem wartość IF (2,686) winna towarzyszyć pozycji z 2015 roku w wykazie publikacji stanowiących rozprawę doktorską, a nie dane z roku 2017 (IF = 3,289). Food & Function to uznane czasopismo z 5-letnim IF 3,178 (2015) zajmujące miejsce w pierwszym kwartylu w kategorii „Food Science & Technology” i miejsce w drugim kwartylu w kategorii „Biochemistry & Molecular Biology” na liście Journal Citation Reports. Druga praca została opublikowana w European Journal of Nutrition, z obecnym IF = 4,423 i 5-letnim IF = 4,125 i zajmującym miejsce w 1 kwartylu w kategorii „Nutrition & Dietetics” na liście Journal Citation Reports. Zdaniem recenzenta, wymienione periodyki są czasopismami o ugruntowanej renomie i uznaniu w środowisku naukowym.

Mając powyższe na uwadze, stwierdzam, że formalna strona przedstawionej rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Błaszczyk nie budzi zastrzeżeń.

Ocena strony merytorycznej

Tematyka prac przedstawionych do oceny skupia się wokół zjawisk zachodzących podczas indukowanego stanu zapalnego jelita a dotyczących reakcji organizmu na różnych poziomach, a mianowicie odpowiedzi immunologicznej, poziomu stresu oksydacyjnego, aktywności mikrobioty kałowej, oraz ekspresji genów białek sygnałowych u szczurów, których

dieta została wzbogacona w preparaty beta-glukanów owsa. Wprawdzie fizjologiczno-biologiczne właściwości beta-glukanów pochodzących z ziaren zbóż, bakterii, grzybów i alg mają liczną bibliografię, to pewne aspekty naszej wiedzy na ten temat nie są pozbawione luk, a uzyskiwane sprzeczne wyniki z różnych badań skłaniają nas do podjęcia prób potwierdzania kolejnych hipotez badawczych. Obecne badania *in vitro* i *in vivo* dotyczące fizjologicznego i metabolicznego oddziaływania spożytych z dietą beta-glukanów koncentrują się przede wszystkim na odpowiedzi immunomodulacyjnej, przeciwzapalnej, prebiotycznej, a także wspomaganie terapii antynowotworowych. Przegląd literatury dokonany przez recenzenta, a także zamieszczone w ocenianej dysertacji uzasadnienie podjętego tematu w oparciu o dane literaturowe, jasno wskazują na istotny brak kolejnych badań potwierdzających silną aktywność przeciwzapalną wraz z opisem mechanizmów tej aktywności beta-glukanów zbóż, w tym owsa, w przebiegu takich chorób jak choroby Leśniowskiego-Crohna czy wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Z tego powodu uważam, że wybrana przez Doktorantkę tematyka badawcza jest niezwykle aktualna i ważna, i doskonale wpisuje się nie tylko w węższy aspekt poznawczy stanów zapalnych jelit, ale także w kształtowanie koncepcji profilaktyki i terapii chorób cywilizacyjnych poprzez zdefiniowanie odpowiedzi fizjologicznej organizmu zdrowego i chorego na składniki żywności. Pozytywnie oceniam także wybór zwierzęcego modelu stanu zapalnego jelita, który to stan zapalny został wywołany poprzez dwukrotną iniekcję do żyły ogonowej lipopolisacharydu otoczek *Escherichia coli* (LPS). W tym miejscu chciałbym prosić Kandydatkę, aby podczas publicznej obrony dokładniej uzasadniła wybór modelu LPS do swoich badań – biorąc pod uwagę dostępność innych szczurzych modeli zapalenia okrężnicy (jelita) (np. model TNBS z kwasem trójnitrobenzenosulfonowym, model DSS z wykorzystaniem dekstranu siarczanu sodu, transgeniczny model HLA-B27 spontanicznie rozwijający zapalenie jelita cienkiego, okrężnicy wraz z zapaleniem stawów).

Przy określeniu celu oraz formułowania hipotez badawczych, Kandydatka użyła zbyt mało szczegółowych określeń w odniesieniu do hipotez, które zdaniem recenzenta wymagają doprecyzowania. Prawidłowa hipoteza ma dostarczyć odpowiedzi na pytanie odzwierciedlające problem badawczy oraz zawiera uzasadnienie dlaczego takie założenie przyjęto. Innymi słowy, w hipotezach pierwszej i drugiej nie określono natury wpływu beta-glukanów diety (np. wpływ korzystny, niekorzystny, prozdrowotny, itp. – jako funkcjonalnych składników diety) a tylko podano, że taki wpływ istnieje.

W zamieszczonych na początku dysertacji streszczeniach w języku polskim i angielskim można znaleźć pewne rozbieżności powodujące inny wydźwięk i znaczenie poszczególnych zdań; w polskiej wersji czytamy o „czystych chemicznie” preparatach beta-glukanów owsa zaś

w wersji angielskiej zamieszczono frazę „oat beta-glucans”; w innym miejscu w polskim streszczeniu Kandydatka pisze „... natomiast na poziomie komórek jelita...” co w wersji angielskiej zostało przetłumaczone na frazę „... while at the cellular level...” czyli zabrakło słowa „intestinal”. W tym miejscu chciałbym powrócić do przytoczonego stwierdzenia Doktorantki sugerującego wykorzystanie czystych chemicznie beta-glukanów jako składników diety dla szczurów. Oczywiście to stwierdzenie jest nieprawdziwe i szkoda, że pada ono już na samym początku dysertacji. Owies będący surowcem do pozyskania badanych preparatów beta-glukanowych jest również doskonałym źródłem inhibitorów amylazy/trypsyny (ATIs). Białka te wykazują znaczące działanie immuno-metaboliczne oraz modulujące mechanizmy prozapalne poprzez aktywację receptora TLR4 (patrz praca Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, i wsp. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 2012; 209(13): 2395-408). W pracy doktorskiej badane preparaty beta-glukanów zawierały frakcję białkową (3,3% - 5,4%) oraz odnotowano znaczącą aktywację mechanizmów związanych z TLR4. Czy była robiona charakterystyka frakcji białkowej w celu określenia obecności ATIs oraz czy Doktorantka zwróciła uwagę na możliwe znaczące działanie inhibitorów ATIs w obserwowanej odpowiedzi immunologicznej i rozwoju stanu zapalnego? Podczas obrony proszę także skrótowo, ale możliwie precyzyjnie opisać w jaki sposób uzyskiwano dwa preparaty beta-glukanów, i czy były one uzyskane z jednej partii zboża?

Część eksperymentalną doktoratu stanowiło jedno, ale długotrwałe doświadczenie żywieniowe na 72 szczurach samcach Sprague-Dawley. W dysertacji, w tym w publikacjach należałoby dokładniej określić czy wykorzystane szczury pochodziły ze szczepu wsobnego czy też ze stada niekrewniaczego (sądzę, że z tego ostatniego). Co kierowało Kandydatką w wyborze szczurów Sprague-Dawley? Biorąc pod uwagę schemat eksperymentu oraz zakres analiz biochemicznych i histologicznych, oraz analizy mikromacierzy komórek jądrzastych krwi obwodowej, pozwalających na przedstawienie uzyskanych wyników w dwóch publikacjach, uważam przedmiot badań za wystarczający w tego typu opracowaniach. W tym miejscu mam jednak pytanie, dlaczego spożycie paszy rejestrowano co dwa dni, a nie codziennie? Czy nie obawiano się często spotykanego w zwierzętarniach zabrudzenia podanej diety moczem lub kałem, co skutecznie mogło zniechęcić zwierzęta do dalszego jej pobierania? W opisie metodyki Doktorantka podała, że dietę półsyntetyczną sporządzono zgodnie z wytycznymi National Research Council (1995); w cytowanym opracowaniu (NRC, 1995) wspomina się o skrobi pszennej, jako o składniku diety, tylko w przypadku chomików. Zatem zastosowana dieta dla szczurów była modyfikacją własną zaleceń NRC (1995).

Podczas lektury rozdziału „Syntetyczne omówienie wyników ...” oraz pracy nr 1 opublikowanej w *Food & Function*, zastanowiłem się i zastanawiam dalej czy uzyskane wyniki stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w kale szczurów są typowe i zgodne z danymi literaturowymi? Proszę o krótką polemikę podczas obrony. Według mojej wiedzy, zarówno w treści końcowego odcinka przewodu pokarmowego oraz w kale szczura laboratoryjnego dominuje kwas octowy, a następnie kwasy propionowy i masłowy – te ostatnie mogą zamieniać się miejscami w zależności od rodzaju błonnika pokarmowego diety. Odnotowane w badaniach Kandydatki wysokie stężenie kwasu mlekowego jest, moim zdaniem, dość nietypowe. Kwas mlekowy jest kwasem „przejściowym” w mikrobiologicznej produkcji SCFA i jest bardzo szybko i intensywnie przekształcany przede wszystkim do kwasu octowego, a w mniejszym stopniu do pozostałych. Dlatego w analizie kwasów produkowanych przez mikrobiotę w jelicie nie spotyka się dużych stężeń kwasu mlekowego (patrz np. He i wsp. 2006. *J Nutr.* 136; 58-63). Zresztą, bakteryjne wykorzystanie kwasu mlekowego jest jednym z mechanizmów zabezpieczających przewód pokarmowy przed niekorzystną akumulacją tego kwasu. Wysokie stężenia kwasu mlekowego są bowiem ściśle powiązane z zespołem krótkiego jelita (short bowel syndrome), wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (ulcerative colitis), a także mogą prowadzić do zmian neurotoksycznych czy arytmii serca (Munoz-Tamayo i wsp. 2011. *FEMS Microbiol Ecol.* 76; 615-624).

Rozdział „Podsumowanie wyników i ich dyskusja” prowadzony jest w sposób przejrzysty i zrozumiały, aczkolwiek zawiera kilka fragmentów, do których Kandydatka mogłaby się odnieść podczas publicznej obrony. Doktorantka wskazuje cytując inną pracę [Brown i wsp. (2003)], że beta-glukany odgrywają istotną rolę w reakcji zapalnej, ponieważ zwiększają syntezę cytokin, takich jak IL-8, TNF α , IL-10, IL-12 – czyli zarówno cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych. Jaka jest zatem, zdaniem Kandydatki, wartość poznawcza oznaczenia tych parametrów charakteryzujących trwałe zapalenie a wskazujących na „mediację”, odpowiednio w odpowiedziach zapalnych i odpornościowych. W innym miejscu Doktorantka pisze, że oznaczona aktywność reduktazy glutationowej sugeruje, że transformacja formy utlenionej do zredukowanej glutationu była bardziej skuteczna gdy do paszy zwierząt dodano beta-glukan o małej masie molowej. Proszę o krótkie wyjaśnienie, a mianowicie z tabeli zamieszczonej w publikacji nie wynika taka zależność, gdyż u szczurów z zapaleniem grupy kontrolnej i grupy GII aktywność reduktazy glutationowej w tkance okrężnicy jest taka sama, a stosunek GSH/GSSG jest dwa razy większy u szczurów GII.

W rozdziale 8 „Wnioski” Doktorantka zamieściła dwa punkty dotyczące mechanizmów działania beta-glukanów diety w zależności od ich masy molowej; w pierwszym z nich

należałoby dodać, że oznaczona ekspresja genów dotyczyła poziomu komórek jądrzastych krwi obwodowej; w stwierdzeniu drugim prawidłowo odniesiono odpowiednie oddziaływanie do poziomu komórek jelita grubego, jakkolwiek należałoby być bardziej precyzyjnym i użyć słowa „okrężnica”, gdyż jelito grube u szczura składa się z dwóch dobrze rozwiniętych części, tj. jelita ślepego i właśnie okrężnicy. Na zakończenie rozdziału 8 Kandydatka sformułowała wniosek praktyczny; proszę o wyjaśnienie dlaczego odniesiono się w nim do ewentualnego efektu profilaktycznego podawania beta-glukanów owsa? Przecież nie wywoływano zapalenia u szczurów, którym uprzednio podawano w diecie beta-glukany.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na pewne nieścisłości i braki, lub sformułowania wymagające wyjaśnień:

- strona 18: jest „na liczebność bakterii kwasu mlekowego w jelicie...” winno być „... w kale...”

- strona 20: kilka razy użyto, w tym w tytule podrozdziału słowa „inflamason” – winno być „inflammason”; znalazło się też słowo „inflammosomami”

- strona 22: czy „przepuszczalność jelit” jest czynnikiem środowiskowym związanym z predyspozycją do IBD?

- strona 22: „Mikroflora jelitowa stanowi endogenną część ekosommu, ...”; pytanie dlaczego „endogenną”? – przecież światło jelit jest zazwyczaj uważane za środowisko zewnętrzne a nie wewnątrz ciała.

- strona 26: „... większość składników NSP dociera do jelita grubego w stanie nienaruszonym, gdzie są fermentowane przez bakterie probiotyczne, ...” – właściwie to są wykorzystywane przez większość bakterii, nie tylko probiotyczne.

- strona 27: „... zredukował wskaźniki stanu zapalnego (stężenie mieloperoksydazy, tlenu azotu i malondialdehydu) ...” – MDA, główny drugorzędowy produkt peroksydacji lipidów, jest traktowany jako biologiczny marker stresu oksydacyjnego a nie stanu zapalnego!

- strona 29: winno być „Sprague”

- strona 29: łączny IF winien wynieść 7,109

- strona 24 i dalej: zamiast określenia jelito grube należałoby być bardziej precyzyjnym i używać słowa „okrężnica” (ten odcinek był przedmiotem badań Doktorantki) – jelito grube u szczura ma dwa bardzo dobrze rozwinięte odcinki: jelito ślepe i okrężnicę.

- strona 35: „Stwierdzono, że wywołanie stanu zapalnego w jelicie szczurów wpłynęło na stężenie cytokiny TNF α ...” – zamiast ogólnego stwierdzenia „wpłynęło” należy określić czy był wzrost czy też spadek stężenia.

- strona 36: „... stężenie GSSG było znacząco niższe, ale silniejszy efekt wywołał GII” – nie można pisać o silniejszym efekcie GII, gdyż nie zostało to potwierdzone statystycznie.

- strona 36: „... wpłynęło na profil SCFA, ...” – nie znalazłem danych dotyczących profilu, czyli wartości procentowej danego kwasu w stosunku do sumy SCFA.

- strona 45: „Obecność beta-glukanów owsa w paszy badanych zwierząt spowodowała obniżenie stężenia TNF α , ale ta różnica nie była istotna statystycznie” – nie można pisać o obniżeniu lub zwiększeniu wartości danego wskaźnika, jeśli nie było to potwierdzone analizą statystyczną – po to właśnie taka analiza jest wykonywana!

- strona 50: „... stan zapalny jelit wiąże się ze silnym stresem oksydacyjnymi rozchwianiem równowagi redoks.” – brak spacji w odpowiednim miejscu (oksydacyjnym i) powoduje chaos podczas czytania tekstu.

- strona 51: „granzymów” ? czy „granzym” ? – chyba druga forma jest poprawna?

Piśmiennictwo: skróty czasopism albo z kropkami albo bez - ujednoczenie!

Po lekturze załączonych publikacji kieruję następujące pytanie do ich Autorki:

W publikacji znalazłem zapis o zastosowaniu dwu-czynnikowej analizy ANOVA i testu post-hoc Tukey'a. Czy faktycznie przeprowadzono typową analizę dwuczynnikową i zbadano czy na efekt biologiczny/fizjologiczny miały wpływ dwa główne czynniki, tj. pierwszy czynnik: brak lub obecność zapalenia, i drugi czynnik: brak lub zawartość w diecie preparatów beta-glukanów, oraz czy wystąpiła istotna interakcja pomiędzy dwoma czynnikami głównymi? W tabelach nie znajdują się zapisy typowe dla dwu-czynnikowej ANOVY, takie jak wartości średnie i wartości P dla dwóch czynników głównych (zapalenie, dieta) oraz wartość P dla interakcji.

Ocena końcowa

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Błaszczyk p.t. „Działanie beta-glukanów owsa w stanach zapalnych jelit – badania modelowe” wnosi istotny wkład w poznanie fizjologicznych zjawisk zachodzących podczas indukowanego stanu zapalnego jelita i łagodzenia tych stanów na poziomie odpowiedzi mikrobiologicznej, immunologicznej, biochemicznej, molekularnej organizmu szczura poprzez dodatek do diety bioaktywnych beta-glukanów owsa. W pracy wykorzystano odpowiednie do zakładanych celów metody badawcze, które pozwoliły uzyskać naukowo interesujące wyniki. Omówione przez Kandydatkę rezultaty badań, pomimo drobnych potknięć, mogą stanowić punkt wyjścia do dalszej dyskusji.

Stwierdzam, że praca doktorska mgr Katarzyny Błaszczyk w pełni spełnia warunki Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Pozytywna ocena pracy doktorskiej upoważnia mnie do przedłożenia wniosku o dopuszczenie mgr Katarzyny Błaszczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, 10.12.2018

A handwritten signature in blue ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that are difficult to decipher as a specific name.