

Prof. dr hab. Juliusz Przysławski

Poznań, dnia 15.07.2019 roku

Katedra i Zakład Bromatologii

Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Recenzja pracy doktorskiej pt.:

„Modyfikacje profilu kwasów tłuszczowych oraz statusu oksydacyjnego u szczurów w warunkach procesu nowotworowego, jako efekt wpływu granatowca właściwego i przepękli ogórkowatej”, wykonanej przez mgr farm. Tomasza Lepionkę w Zakładzie Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Białek

Ocena wyboru tematu

Choroby nowotworowe, obok chorób układu sercowo-naczyniowego stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów wśród społeczeństw krajów wysoko rozwiniętych. Ich etiologia jest złożona, a czynniki inicjujące procesy nowotworzenia, mogą mieć charakter wrodzony – są niemodyfikowalne (płeć, wiek, rasa, predyspozycje genetyczne) lub związany z szeroko pojętym środowiskiem zewnętrznym człowieka. Wpływ na modyfikację czynników ryzyka, które mają podłoże dziedziczne, jest z reguły ograniczony, natomiast ograniczenia te w mniejszym stopniu dotyczą czynników związanych ze środowiskiem. W tej grupie, szczególne miejsce zajmują te, które są związane ze stylem życia, którego składową jest właściwy sposób żywienia, determinowany między innymi odpowiednią jakością zdrowotną żywności. Czynniki żywieniowe mają wpływ zarówno zwiększający, jak i zmniejszający ryzyko rozwoju chorób nowotworowych. Wiąże się to z obecnością określonych związków chemicznych – składników żywności takich jak: fitoestrogeny, resweratrol, kwasy tłuszczowe nasycone i wielonienasycone z rodziny n-6 oraz sprzężone dieny i trieny kwasów tłuszczowych o 18 atomach węgla. Ważną składową są również niewłaściwe zachowania żywieniowe, jako efekt niewłaściwie zbilansowanej i mało urozmaiconej diety. W badaniach epidemiologicznych podkreśla się również rolę tzw. „używek” zwiększających ryzyko rozwoju chorób nowotworowych określonych narządów,

układów, tkanek, a sztandarowym przykładem jest związek pomiędzy spożyciem alkoholu i zapadalnością na nowotwory gruczołu sutkowego. Badania z tego zakresu są niezwykle cenne, bowiem statystyki epidemiologiczne alarmują, że nowotwory gruczołu sutkowego, stanowią dominującą grupę zachorowań wśród kobiet, i stanowią drugą, główną w skali globalnej przyczynę zgonów. Pomimo postępów w profilaktyce i leczeniu tej grupy nowotworów, nadal obserwuje się trend rosnący, pomimo wzrostu wskaźników przeżywalności. Nowotwory gruczołu sutkowego stanowią nie tylko poważny problem kliniczny lecz także społeczny, który dotyczy zarówno kobiet zamieszkujących kraje rozwinięte, jak i będące na etapie rozwoju. W kontekście powyższych faktów za niezwykle słuszne i celowe, wydaje się podejmowanie badań, które poszerzyłyby naszą wiedzę w zakresie wzajemnych powiązań pomiędzy wpływem czynników zewnętrznych (dieta, skład kwasów tłuszczowych, związki farmakologicznie czynne występujące w produktach spożywczych, w szerszym aspekcie - styl życia) i wewnętrznych (hormony, stany patologiczne, uwarunkowania genetyczne) na promocję lub hamowanie procesów nowotworzenia. Szczególne miejsce w badaniach z tego zakresu, znajdują prace dotyczące możliwości wykorzystania surowców pochodzenia roślinnego, których skład fitochemiczny wskazuje na potencjalną aktywność przeciwnowotworową – zwłaszcza w kontekście raka gruczołu sutkowego. Nie dziwi zatem fakt, że problematyka ta stała się także tematem wiodącym rozprawy doktorskiej mgr farm. Tomasza Lepionki w której – w oparciu o model zwierzęcy (zgoda: nr 53/2013 oraz 54/2015 – Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie), określono wpływ oleju z granatowca właściwego (*Punica granatum*, *Punicaceae*) i ekstraktu wodnego z przepękli ogórkowatej (*Momordica charantia*, *Cucurbitaceae*), na ryzyko powstania raka gruczołu sutkowego w warunkach chemicznie indukowanej kancerogenezy. Wybór tematu badań należy uznać za trafny i aktualny, rokujący uzyskanie wyników badań o dużym ładunku poznawczym jak i praktycznym. Potwierdza to tezę, że wybór tematu pracy doktorskiej nie został dokonany przypadkowo, lecz w oparciu o dogłębną analizę problemu, dokonaną przez Doktorantkę i jej Promotora.

Ocena układu redakcyjnego pracy

Rozprawa doktorska mgr Tomasza Lepionki jest opracowaniem obszernym, bowiem zawiera 178 stron maszynopisu. Dysertacja została napisana zgodnie z ogólnymi wytycznymi przyjętymi w tego typu opracowaniach, aczkolwiek umieszczenie spisu treści na końcu rozprawy pod postacią rozdziału 10 uważam, za rozwiązanie

oryginalne. Składa się z 10 części – rozdziałów obejmujących: wstęp – będący przeglądem piśmiennictwa w realizowanym temacie badawczym, celu pracy, materiału i metod, wyników i dyskusji, podsumowania, wniosków, streszczeń w języku polskim i angielskim, piśmiennictwa i wspomnianego powyżej spisu treści. Wstęp poprzedza bardzo przydatny wykaz skrótów. Proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są prawidłowe, przy mocno zaakcentowanych częściach dotyczących materiału i metodyki badań (co jest w pełni uzasadnione) oraz wyników i dyskusji (szkoda, że nie oddzielnie). Od strony redakcyjnej praca jest napisana językiem komunikatywnym, a kluczowe problemy badawcze realizowane przez Doktoranta, są wyraźnie i jasno sformułowane. Jest to ważne, ponieważ pracę charakteryzuje wielowątkowość, będąca następstwem analizowania wielu parametrów badawczych. Praca zawiera łącznie 23 tabele oraz 29 rycin – w tym 3 (6 do 8) będące schematami. Wyniki zostały zebrane w tabelach 6 do 23, natomiast 19 rycin jest ściśle związane z wynikami badań. Tabele, zawierające zbiorcze zestawienia wyników z poszczególnych etapów badań zostały skonstruowane w sposób prawidłowy, aczkolwiek duża liczba wyników sprawia, że nie zawsze tekst „nadąża” z ich interpretacją. Ponadto, w tabelach 13 i 14 brakuje skrótu CLnA, który został umieszczony w objaśnieniach pod tabelami. Oczywiście nie zmienia to faktu, że Doktorant włożył wiele wysiłku i staranności przy redagowaniu ostatecznej wersji pracy doktorskiej. Słowa uznania należą się również za ilustrację graficzną, która uzupełnia część teoretyczną jak również wynikową pracy doktorskiej. Jak już wspomniano, praca została napisana językiem komunikatywnym, pozbawionym zbędnej frazeologii, jednakże z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na kilka kwestii, które mają charakter redakcyjny i nie wpływają na wartość merytoryczną dysertacji. W opinii recenzenta, niezbyt fortunne jest sformułowanie o „nabytych chorobach genetycznych”, „architektonice tkanki” (str. 9), „kobietach rasy amerykańskiej” (str. 11), „ryzyku zapadnięcia” (str. 12), badaniach na „gryzoniach” (str. 13), białku „antyapotecznym” (str. 21) i „niskiej kaloryczności” (str. 33). Cennym uzupełnieniem jest przygotowany przez Doktoranta wykaz skrótów, w którym jednakże zabrakło między innymi pełnej nazwy receptora HER2 (str. 11) oraz agencji FTSE. Warto również pamiętać, że zdań nie rozpoczyna się od akronimów (str. 22, 29). Dla porządku logicznego dobrze byłoby, aby podrozdziały miały zróżnicowane tytuły („nowotwory piersi” 1.1 i 1.2.3.1.1). Słowa uznania należą się za schematy badań/oznaczeń, które przy tak obszernym zakresie eksperymentalnym są wręcz koniecznością. Reasumując należy stwierdzić, że Doktorant bardzo dobrze poradził

sobie z redakcją poszczególnych części pracy. Treść i forma nie przeszkadzają sobie, a wprost przeciwnie – wzajemnie się uzupełniają. Pod względem redakcyjnym, a w szerszym tego słowa znaczeniu – także edycyjnym, dysertacja może być wzorem, właściwego opracowania tego typu wyników badań.

Bibliografia i znajomość omawianej przez Doktoranta problematyki

Przedstawiona do oceny praca doktorska zawiera imponującą, obejmującą 240 pozycji piśmiennictwa bibliografię, która została starannie dobrana i wyselekcjonowana ze zbiorów światowego piśmiennictwa. W przeważającej większości (około 80%) to pozycje zagraniczne, które zostały uzupełnione wybranymi pracami polskojęzycznymi. Połowa z ogółu cytowanych prac pochodzi z lat 2010-2019. Taki dobór piśmiennictwa wskazuje na aktualność podjętej tematyki badawczej, a także na dbałość Doktoranta o zapewnienie sobie szerokiego zakresu najnowszej wiedzy wykorzystanej z powodzeniem nie tylko w dyskusji wyników ale również w części teoretycznej pracy. Ten rozdział pracy – zatytułowany jako „Wstęp”, obejmuje 41 stron maszynopisu, w którym Doktorant dokonał przeglądu piśmiennictwa w kilku wzajemnie się uzupełniających obszarach tematycznych dotyczących nowotworów gruczołu piersiowego, sprzężonych trienów kwasu linolenowego, przepękli ogórkowatej, granatowca właściwego oraz krótkiego rozdziału dotyczącego aspektów zdrowotnych suplementów diety. Należy podkreślić, że poszczególne rozdziały i podrozdziały części teoretycznej zawierają specjalistyczną i aktualną wiedzę, tworzącą jako całość – po uporządkowaniu, udaną monografię tematu. W opinii recenzenta, część teoretyczna pracy powinna opierać się na trzech filarach wiedzy, dotyczących nowotworów gruczołu sutkowego, oraz właściwości przepękli ogórkowatej i granatowca właściwego w kontekście profilaktyki i możliwości farmakoterapii chorób nowotworowych, ze szczególnym zwróceniem uwagi na nowotwory gruczołu piersiowego. Uporządkowałoby to wieloznaczność w sformułowaniach dotyczących wpływu – czego ? – surowca roślinnego, suplementu diety, składnika suplementu diety, czy wreszcie – 1% wodnego ekstraktu z przepękli ogórkowatej i oleju z nasion granatowca na ryzyko powstawania raka sutka u zwierząt doświadczalnych w warunkach chemicznie indukowanej kancerogenezy (tak sprecyzowano cel pracy). Oczywiście, powyższe uwagi mają charakter wyłącznie redakcyjny i nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną teoretycznego uzasadnienia podjętych badań. Słowa uznania dla Doktoranta za podrozdziały 1.3.3 i 1.4.2.3. dotyczące bezpieczeństwa stosowania/wykorzystania przepękli ogórkowatej i granatowca właściwego w celach

lecniczych, zwłaszcza w kontekście interakcji z określonymi lekami oraz składnikami żywności. Podsumowując część teoretyczną należy podkreślić, że Doktorant wykazał się dobrą znajomością piśmiennictwa naukowego związanego tematycznie z obszarem prowadzonych badań, wskazał na ich celowość i spodziewane aspekty poznawcze i praktyczne.

Ocena merytoryczna pracy

Doktorant, poprzez interesującą część teoretyczną, wprowadza czytelnika w problem będący przedmiotem dysertacji. Został on sformułowany w celu pracy. W warstwie ogólnej, Doktorant założył przeprowadzenie na modelu zwierzęcym badań, których celem było określenie wpływu oleju z nasion granatowca (PSO) oraz wyciągu wodnego z przepętki ogórkowatej (BME) na ryzyko powstawania raka gruczołu sutkowego w warunkach chemicznie indukowanej kancerogenezy. W warstwie szczegółowej, cele badawcze dotyczyły między innymi: zmiany profilu kwasów tłuszczowych (KT) (surowica, tkanka wątrobowa, frakcja mikrosomalna wątroby) w wyniku modyfikacji paszy standardowej PSO oraz BME, oceny aktywności wybranych enzymów, uczestniczących w metabolizmie KT i ksenobiotyków, ocenę wybranych parametrów stresu oksydacyjnego. Powłokę zewnętrzną badań stanowiło podanie zwierzętom z tzw. grupy „plus” w 50 dniu eksperymentu 7,12-dwumetylobenz[a]antracenu (DMBA), a następnie identyfikacja wymienionych powyżej parametrów w warunkach wywołanego procesu nowotworowego wraz z badaniami histopatologicznymi. Niezbyt jasno brzmi zawarty w celu pracy „postulat” dotyczący oceny jakości wybranych suplementów diety na parametry stanu zdrowia w kontekście działania synergistycznego lub antagonistycznego. Ponadto szkoda, że tak ambitny i obszerny plan badań nie znalazł swego odzwierciedlenia w hipotezach badawczych, co podkreśliłoby niezaprzeczalne walory poznawcze i praktyczne przeprowadzonych badań. Oczywiście, przeprowadzenie badań na takim etapie zaawansowania byłoby niemożliwe bez opracowania nowych/zmodyfikowanych metod badawczych, które w tym przypadku są odzwierciedleniem analityki na poziomie światowym. Słowa uznania należą się Doktorantowi również za wzorowo opisaną metodykę badań, która może być przykładem, jak tego typu opracowanie powinno być przygotowane. Z uznaniem należy również odnieść się do statystycznego opracowania uzyskanych wyników badań. W związku z dużą liczbą analizowanych zmiennych, klasyczne miary statystyki opisowej zostały uzupełnione o wybrane o wybrane elementy analizy statystycznej. W celu redukcji zmiennych, przeprowadzono

analizę czynnikową metodą składowych głównych z rotacją Oblimin. W analizie uwzględniono te czynniki, dla których wartości własne były większe od 1., a brakujące dane w każdej z analizowanych grup nie przekraczały 10%.

Punktem wyjścia do udzielenia odpowiedzi na postawione w celu pracy pytania stały się wyniki badań przedstawione łącznie z dyskusją, dotyczące sześciu obszarów wynikowych związanych *stricto* z celem pracy. W opinii recenzenta powinny to być wyniki odnoszące się do zmian masy ciała oraz narządów wewnętrznych, efektywności indukcji nowotworowej i badań histopatologicznych w celu określenia typu guza nowotworowego, dalej – profili kwasów tłuszczowych w surowicy, tkance wątrobowej i mikrosomach wątrobowych, stężeń MDA, cholesterolu i jego utlenionych pochodnych oraz tokoferoli w tkance wątrobowej i kończąc na wynikach aktywności izoformy 1B1 cytochromu P450, COX-2 oraz wyliczonych indeksach utlenialności dla desaturaz i izomerazy LA. Można dyskutować, czy skład paszy hodowlanej oraz charakterystyka jakościowa PSO i BME powinna być w części wynikowej, czy też stanowić integralną część rozdziału zatytułowanego „Materiał i metody” ?.

Jak już wcześniej zostało podkreślone, ciekawie zaprogramowana, nowoczesna metodyka badawcza (zwłaszcza technika Ag+-HPLC-PDA do identyfikacji jakościowej i ilościowej sprzężonych dienów kwasów tłuszczowych), została dobrana w sposób przemyślany, zoptymalizowany na uzyskanie kompleksowej odpowiedzi na postawione pytania badawcze, i w konsekwencji uzyskanie wiarygodnych i obiektywnych wyników badań. Główny aspekt praktyczny i poznawczy badań skupia się na części doświadczalnej przeprowadzonej z udziałem zwierząt doświadczalnych. Poprzez wprowadzenie do diety PSO i BME w warunkach indukowanego chemicznie procesu nowotworowego (DMBA), poddano ocenie potencjalne chemoprewencyjne działanie oleju z nasion granatowca oraz 1% wodnego wyciągu z przepękli ogórkowatej. Kontekst poznawczy został poszerzony o profile kwasów tłuszczowych, parametry stresu oksydacyjnego, aktywność enzymów frakcji mikrosomalnej wątroby. Badania nie potwierdziły przeciwnowotworowych właściwości PSO i BME w zastosowanym modelu badawczym. Modyfikacja diety PSO i PSO+BME powodowała zwiększenie zapadalności na nowotwory. Wyrafinowana technika badawcza pozwoliła wykazać, że sprzężone trieny CLnA są w części wbudowywane w struktury lipidowe tkanek, jednakże w głównej mierze są przekształcane do cis-9, trans-11 CLA (kwas wakcenowy). W żadnej z badanych prób materiału biologicznego nie stwierdzono

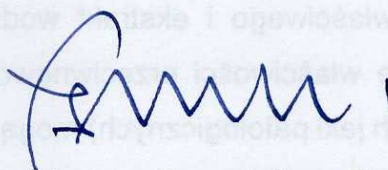
obecności kwasu punikowego, którego bogatym źródłem jest PSO. Modyfikacja diety i współistniejący proces nowotworowy zmieniały profil kwasów tłuszczowych w surowicy, tkance wątrobowej i frakcji mikrosomalnej wątroby (w zasadzie odpowiedź na tytuł dysertacji ?). Ocena statusu oksydacyjnego w oparciu o stężenia malonylodwualdehydu (MDA), oksysteroli i tokoferoli w tkance wątrobowej, nie dostarczyła przekonujących dowodów, wpływu PSO i BME w warunkach narażenia na DMBA na powyższy parametr. W grupie zwierząt nie „plus” (bez narażenia na DMBA), zarówno PSO i BME powodowało obniżenie poziomu MDA, natomiast w grupie zwierząt „plus”, (narażenie na DMBA), podanie PSO, nasilało procesy peroksydacji lipidów. Zaobserwowano również różnice w stężeniach wybranych oksysteroli i tokoferoli. Podsumowując ten fragment badań, Doktorant słusznie stwierdza, że wpływ PSO i BME na procesy peroksydacyjne zależy od stanu organizmu (fizjologia vs patologia) (w zasadzie odpowiedzi na tytuł dysertacji ?). Badania wykazały również, że w warunkach narażenia na DMBA, obserwuje się przeciwny wpływ PSO i BME na aktywność izoformy CYP1B1 cytochromu P450. Olej z nasion granatowca obniżał jej aktywność i nie miał istotnego wpływu na aktywność COX-2. W przypadku BME zaobserwowano efekt odwrotny. Chemometryczna analiza czynnikowa, metodą składowych głównych wykazała, że w badanym modelu doświadczalnym, suplementacja PSO bardziej różnicowała materiał badawczy oraz wskazała na konieczność interpretacji parametrów opisujących zmiany na poziomie komórkowym i subkomórkowym. Z perspektywy aspektów poznawczych badań, najbardziej istotne jest wykazanie przez Doktoranta, że olej z nasion granatowca właściwego i ekstrakt wodny z przepekli ogórkowatej, którym często przypisuje się właściwości przeciwnowotworowe, w pewnych warunkach (zarówno fizjologicznych jak i patologicznych) mogą wykazywać działanie odwrotne – tzn. istotnie zwiększać ryzyko rozwoju raka gruczołu sutkowego !!.

Podsumowaniem w aspekcie praktycznym i poznawczym są wnioski, które odzwierciedlają wyniki poszczególnych etapów badań i wskazują na umiejętność krytycznej analizy uzyskanych wyników. Oceniając ten fragment dysertacji Doktoranta, należy stwierdzić, że zostały one zredagowane w sposób prawidłowy (może za wyjątkiem wniosku nr 8), nie wykraczają poza zakres uzyskanych wyników badań i wskazują na dojrzałość naukową Doktoranta.

Podsumowanie

Uważam, że przedstawiona do oceny praca jest ciekawym opracowaniem, na który składają się: sposób przygotowania i opracowanie teoretyczne tematu, staranne zaplanowanie eksperymentu, przeprowadzenie badań w oparciu nowoczesną metodykę oraz interpretacja uzyskanych wyników badań. Doktorant wykazał dobre przygotowanie teoretyczne i praktyczne. Uzyskane wyniki badań mają zarówno wartości poznawcze jak i praktyczne i mogą stanowić podstawę do dalszych badań w tym zakresie. Stwierdzam, że mgr farm. Tomasz Lepionka zrealizował założony cel pracy. Zawarte w recenzji uwagi mają charakter głównie redakcyjny i nie mają wpływu na ocenę końcową przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr farm. Tomasza Lepionki pt.: „Modyfikacje profilu kwasów tłuszczowych oraz statusu oksydacyjnego u szczurów w warunkach procesu nowotworowego jako efekt wpływu granatowca właściwego i przepękli ogórkowatej” spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr farm. Tomasza Lepionki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. n. farm. Juliusz Przysławski