

Dr hab. Adam Jurgoński, prof. IRZBŻ PAN  
Zakład Biologicznych Funkcji Żywności  
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności  
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie  
[a.jurgonski@pan.olsztyn.pl](mailto:a.jurgonski@pan.olsztyn.pl)

Olsztyn, dnia 31.01.2024

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**mgra Łukasza Kopiasza**

pt. *Mechanizmy działania  $\beta$ -D-glukanu z owsa na przebieg choroby Crohna i wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy – badania modelowe in vivo* wykonanej w Instytucie Nauk o Żywieniu Człowieka Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Gromadzkiej-Ostrowskiej oraz dr hab. Katarzyny Dziendzikowskiej

*Niniejszą recenzję wykonano w odpowiedzi na postanowienie Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dnia 24.11.2023 r. oraz na podstawie przepisów Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce zwanej dalej Ustawą (Dz.U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.). Recenzję sporządzono w oparciu o otrzymaną w dniu 4.12.2023 r. rozprawę doktorską niniejszego kandydata do stopnia doktora zwanego dalej Kandydatem.*

### Wybór i znaczenie tematu

Nieswoiste zapalenia jelit, w tym choroba Leśniowskiego-Crohna, oraz nowotwory jelita grubego, często będące konsekwencją tych pierwszych, stanowią poważny problem zdrowotny ludzi na całym świecie. Nieswoiste zapalenia jelit są chorobami dokuczliwymi o charakterze przewlekłym i niedającymi się całkowicie wyleczyć, natomiast w przypadku nowotworów jelita grubego ważne jest ich jak najwcześniejsze wykrycie i leczenie, ponieważ w późniejszych stadiach stają się przyczyną wielu zgonów. W związku z tym, że przewód pokarmowy stanowi pierwszą barierę, przez którą żywność przenika w postaci składników odżywczych i nieodżywczych do naszego organizmu, sposób odżywiania się jest jednym z bardziej istotnych czynników mogących przyczynić się zarówno do powstawiania, jak i zapobiegania tym chorobom. Niezwykle ważne znaczenie w tym kontekście ma błonnik pokarmowy, w tym niestrawne polisacharydy, które mogą wchodzić w interakcje z przewodem pokarmowym na całej jego długości oraz z mikrobiotą jelitową w jego części dystalnej. Jednymi z takich polisacharydów są  $\beta$ -glukany rozpatrywane jako czynniki mogące zapobiegać lub wspomagać terapię nieswoistych zapaleń jelit i raka jelita grubego, przy czym

WPŁYNEŁO DNIA

2024 -02- 01

1No2C-21/2024

Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka  
Sekretariat

mechanizm ich korzystnego działania wymaga rozpoznania. Jest to zadanie niełatwe m.in. dlatego, że  $\beta$ -glukany, składając się z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami  $\beta$ -glikozydowymi i występując naturalnie w zbożach, grzybach czy też drożdżach, są zróżnicowane pod względem właściwości fizykochemicznych. Na tym tle podjęta przez mgra Łukasza Kopiasza ocena możliwości wykorzystania frakcji  $\beta$ -glukanu owsa o określonych masach molowych w terapii choroby Leśniowskiego-Crohna i zapobieganiu rakowi jelita grubego oraz próba wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw ich korzystnego oddziaływania jest ważna i w pełni uzasadniona.

### **Formalna ocena rozprawy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest syntetycznie wyodrębnioną i opisaną na 57 stronach częścią pracy zbiorowej, którą stanowią 3 oryginalne artykuły naukowe opublikowane w wartościowych czasopismach z zakresu żywienia lub biologii molekularnej (*Nutrients*, *Int. J. Mol. Sci.* oraz *Int. J. Biol. Macromol.*). Publikacje wraz z oświadczeniami autorów określającymi ich indywidualny wkład w powstanie poszczególnych opracowań stanowią załącznik do niniejszej rozprawy. We wszystkich 3 artykułach Kandydat jest pierwszym autorem, a w jednym również autorem korespondującym, co w połączeniu z załączonymi oświadczeniami jednoznacznie wskazuje na jego istotny udział w realizacji badań. Część zasadnicza rozprawy zawiera wszystkie oczekiwane w tego typu opracowaniach rozdziały, we właściwej kolejności i proporcjach, w tym zamieszczone na jednej stronie streszczenia w języku polskim i angielskim (zgodnie z art. 187, ust. 4 Ustawy). W rozprawie znajduje się w sumie tylko 1 tabela oraz 9 rycin, przy czym 5 z nich to ryciny zagregowane, zawierające liczne wykresy i ewentualnie zdjęcia, w tym histologiczne i z analiz *western blot*. Pozostałe ryciny to schematy, które w sposób uproszczony i przejrzysty obrazują przeprowadzone doświadczenia oraz proponowane mechanizmy działania  $\beta$ -glukanu owsa. Ostatnie 8 stron części zasadniczej rozprawy stanowi piśmiennictwo, w którym znajduje się lista 88 zacytowanych pozycji, głównie anglojęzycznych i opublikowanych na przestrzeni ostatnich 10 lat. Tytuł jest zgodny z treścią rozprawy doktorskiej, którą napisano w sposób skoncentrowany na uzyskanych wynikach i nie pozostawiający miejsca na zbytne domysły oraz w większości poprawnie pod względem językowym. Drobne uwagi redakcyjne zamieszczam do wiadomości poniżej:

- Streszczenie w j. polskim, ostatni wiersz: literówka w zdaniu „...w sposób zależny o rodzaju schorzenia.”.
- Str. 15, akapit 2 oraz str. 21 rozdz. 2.3: niepoprawna odmiana czasownika w zdaniu “Beta-glukan z owsa (O $\beta$ G) są polisacharydami...”.
- Pierwszy wers na str. 16: „...działanie hipoglikemiczne, hipolipemiczne...”, zalecam w tym kontekście stosowanie terminów „działanie hipoglikemizujące” i „działanie hipolipemizujące”, żeby nie sugerować np. działania powodującego hipoglikemię.

- Materiał i metody, str. 30, wersy 9-11: opis niezgodny ze stanem faktycznym, ponieważ oznaczenia ekspresji chemokin i ich receptorów w doświadczeniu II za pomocą immunohistochemii nie zostały uwzględnione w rozprawie doktorskiej.
- Nieprawidłowy skrótowiec w wierszach 9-10 na str. 35, tj. OβGh+.

### **Merytoryczna ocena rozprawy**

Swoją rozprawę Kandydat rozpoczyna krótkim wstępem wprowadzającym w tematykę zagadnienia, w którym słusznie podkreśla problemy zdrowotne i ekonomiczno-społeczne związane z występowaniem nieswoistych zapaleń jelit i nowotworów jelita grubego na świecie. Wskazuje jednocześnie na konieczność poszukiwania czynników żywieniowych mogących zapobiegać i wspomagać leczenie omawianych chorób, koncentrując się przy tym na  $\beta$ -glukanie owsa i jego właściwościach prozdrowotnych, w tym dotyczących omawianych jednostek chorobowych. W rozdziale drugim Kandydat następnie w oparciu o dane literaturowe szczegółowo uzasadnia podjęcie niniejszej tematyki badawczej kompetentnie przybliżając specyfikę choroby Leśniowskiego-Crohna i raka jelita grubego, a także wskazując na istotną rolę jaką odgrywają chemokiny w procesie zapalnym oraz procesy apoptozy i autofagii w patofizjologii tych schorzeń. Podaje także potencjalne mechanizmy interakcji frakcji  $\beta$ -glukanu pozyskiwanych z owsa ze ścianą przewodu pokarmowego, które w konsekwencji mogą modulować wydzielanie chemokin oraz wpływać na procesy apoptozy i autofagii, a tym samym łagodzić przebieg lub zapobiegać występowaniu omawianych schorzeń. Lektura niniejszego rozdziału pozwala w tym kontekście wymienić trzy następujące, bardzo interesujące możliwości: 1) działanie ochronne  $\beta$ -glukanu wynikające z jego zdolności do wiązania wody i tworzenia żelowej warstwy wyściełającej ścianę przewodu pokarmowego, 2) bezpośrednie interakcje frakcji  $\beta$ -glukanu o mniejszym stopniu polimeryzacji związane z jej wnikaniem do błony śluzowej przewodu pokarmowego i wiązaniem się z różnego typu receptorami obecnymi na powierzchni komórek układu odpornościowego oraz 3) pośrednie interakcje  $\beta$ -glukanu w obrębie jelita grubego poprzez jego metabolity bakteryjne w postaci krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (głównie kwasów propionowego i masłowego).

W rozdziale trzecim przedstawiony jest zasadniczy cel badań, który brzmi następująco: *ocena potencjału terapeutycznego wysokooczyszczonego beta-glukanu z owsa w chorobie Leśniowskiego-Crohna oraz jego możliwości do hamowania rozwoju wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy, a także poznanie mechanizmów tych działań*. Kandydat stawia jednocześnie trzy szczegółowe hipotezy badawcze, które są logiczną konsekwencją dokonanego przeglądu literatury, bezpośrednio nawiązują do postawionego celu badań i zakładają korzystny wpływ suplementacji diety frakcjami  $\beta$ -glukanu owsa na przebieg omawianych schorzeń poprzez modulację ekspresji genów związanych z

chemokinami i/lub procesów apoptozy i autofagii. W kolejnym rozdziale Kandydat dodatkowo przedstawia w sposób precyzyjny zakres badań wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej, który obejmuje dwa doświadczenia żywieniowe z zastosowaniem frakcji  $\beta$ -glukanu o małej lub dużej masie molowej przeprowadzone na szczurach laboratoryjnych z eksperymentalnie indukowanymi modelami badanych chorób.

Sposób przeprowadzenia doświadczeń żywieniowych i analizy pobranego materiału biologicznego został skrótowo opisany i przedstawiony na schematach w rozdziale *Materiał i metody*. Więcej szczegółów metodycznych, a także dotyczących zastosowanych preparatów  $\beta$ -glukanu, można znaleźć w załączonych artykułach oraz we wcześniejszych publikacjach zespołu prof. J. Gromadzkiej-Ostrowskiej, które Kandydat cytuje w rozprawie doktorskiej. Badania polegały na indukcji u szczurów zapalenia jelita grubego kwasem trinitrobenzenosulfonowym (TNBS) podanym doodbytniczo (Doświadczenie I) lub wczesnych zmian nowotworowych poprzez dootrzewnową iniekcję azoksymetanu (AOM, Doświadczenie II), a następnie na żywieniu tych zwierząt oraz zwierząt zdrowych półocyszczoną dietą eksperymentalną, do której dodawano badane preparaty (dieta AIN-93M). Metodyka badań w zdecydowanej większości nie budzi wątpliwości. Zastosowane preparaty  $\beta$ -glukanu owsa zostały otrzymane zgodnie z opatentowanymi wcześniej sposobami, wskazując przy tym na ich wysoki stopień oczyszczenia (powyżej 97-99%) oraz różnicując je na frakcje o dużej i małej masie molowej (odpowiednio  $1,7 \times 10^6$  i  $<6 \times 10^4$  g/mol). Sposób indukcji badanych schorzeń dokonano zgodnie z dostępną literaturą przedmiotu, a bardziej lub mniej zaawansowane zaburzenia zostały udokumentowane w publikacjach i/lub materiałach uzupełniających publikacje dostępnych w sieci. W dostępnych materiałach podany jest również częściowo skład diet, proszę jednak Kandydata o wyjaśnienie kosztem których konkretnie składników diety AIN-93M dodano badane preparaty w poszczególnych doświadczeniach (czy też może kosztem diety jako całości?). Proszę również o merytoryczne uzasadnienie doboru ilości suplementowanych preparatów  $\beta$ -glukanu w Doświadczeniu I (1% diety) oraz w Doświadczeniu II (1% oraz 3% diety), a w przypadku Doświadczenia II – także o podanie powodu zastosowania jedynie jego frakcji o małej masie molowej. W pracy dokonano ponadto zaawansowanej analizy materiału biologicznego z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (oznaczenie ekspresji mRNA genów chemokin i ich receptorów w jelicie grubym) oraz analiz *western blot* i immunohistochemicznej (oznaczenie markerów apoptozy i autofagii w jelicie grubym).

W związku z tym, że rozprawa doktorska jest wyodrębnioną częścią pracy zbiorowej to w dalszej części oceny merytorycznej skupię się na wynikach w niej zawartych. Wyniki te analizowano statystycznie z wykorzystaniem kilkuczynnikowej analizy wariancji oraz kilku dodatkowych testów *post hoc*, których liczbę, dzięki zaawansowanemu modelowi analizy wariancji (wpływ czynników i

interakcje), można by bez większego uszczerbku dla pracy zredukować, a przez to jeszcze bardziej uprościć przekaz. Warto jednak podkreślić, że sposób opisanego uzyskanych wyników, jak na relatywnie duży stopień zaawansowania statystycznego, nie jest skomplikowany i oceniam go pozytywnie. Ryciny pomimo zagregowania są czytelne i opatrzone niezbędnymi, wystarczająco szczegółowymi komentarzami, wskazują także na zaistniałe najważniejsze różnice statystyczne. Na podkreślenie zasługują również bardzo czytelne, szczególnie w wersjach elektronicznych załączonych artykułów, zdjęcia mikroskopowe obrazujące lokalizację i dystrybucję markerów apoptozy i autofagii w obrębie błony śluzowej jelita grubego (odpowiednio enzymu kapsazy-3 i białka LC3B), które wykonano za pomocą immunohistochemii. Warto w tym kontekście docenić pracę jaką trzeba było wykonać podczas przygotowywania preparatów histologicznych oraz późniejszej obróbki graficznej zdjęć w celu ilościowego oznaczenia ekspresji badanych markerów.


W dziewięciostronicowym rozdziale *Podsumowanie wyników i dyskusja* Kandydat wykorzystuje swoją rozległą wiedzę z zakresu biologii medycznej i immunologii dokonując w sposób kompetentny interpretacji i syntezy badań własnych na tle literatury przedmiotu. Opisując biologiczną aktywność  $\beta$ -glukanów skupia się jednak przede wszystkim na badaniach opublikowanych wcześniej przez zespół, w którym prowadził doświadczenia. Niemniej jednak Kandydat w sposób racjonalny proponuje potencjalne mechanizmy działania  $\beta$ -glukanu owsa, który w przypadku zmienionej zapalnie okrężnicy ma hamować proces nadmiernej apoptozy poprzez modulację ekspresji chemokin i ich receptorów, przy towarzyszącej tym procesom kaskadzie zmian o podłożu immunologicznym. Co ciekawe, w kontekście hamowania ekspresji chemokin można zauważyć, że jedynym genem chemokiny, którego ekspresja mRNA nie uległa zmianie pod wpływem stanu zapalnego okrężnicy ani pod wpływem suplementacji preparatami  $\beta$ -glukanu, był gen *Cxcl10*, dlatego proszę Kandydata, aby pokusił się o wyjaśnienie takiego stanu rzeczy podczas publicznej obrony. W przypadku wczesnej fazy nowotworu jelita grubego Kandydat sugeruje ponadto przeciwnowotworowe działanie frakcji  $\beta$ -glukanu o mniejszej masie molowej poprzez stymulowanie procesów apoptozy i autofagii w błonie śluzowej, co zostało poparte w badaniach własnych wzrostem ekspresji białek odpowiednich markerów (enzymu kapsazy-3 i białka LC3B). Opisuje także specyfikę zastosowanych modeli zwierzęcych i uwiarygadnia ich podobieństwo do chorób właściwych, diagnozowanych u ludzi: Cytuje w tym kontekście wcześniejszą pracę badawczą, w której również jest pierwszym autorem, a która dotyczy wpływu  $\beta$ -glukanu owsa na status antyoksydacyjny organizmu szczurów z zapaleniem jelita grubego indukowanym w sposób analogiczny do opisanego w niniejszej rozprawie (str. 40, Kopiasz i wsp., 2020; czasopismo *Antioxidants*). Świadczy to pozytywnie o dużym i kilkuletnim już zaangażowaniu Kandydata w tematykę będącą przedmiotem opisywanych badań. Zastosowane eksperymentalne modele zapalenia i nowotworu jelit nie są jednak

jedynymi, które udokumentowano dotychczas w literaturze przedmiotu, dlatego proszę Kandydata o krótkie omówienie dokonanego wyboru także na tle innych dostępnych modeli.

Na zakończenie rozprawy Kandydat w sposób syntetyczny podsumowuje najważniejsze spostrzeżenia z badań własnych i właściwie formułuje cztery wnioski nawiązujące bezpośrednio do postawionego celu i hipotez badawczych, które zostały zweryfikowane pozytywnie. Wyciąga jednocześnie bardzo ważny wniosek praktyczny odnośnie bezpieczeństwa spożywania preparatów  $\beta$ -glukanu owsa i możliwości ich skutecznego stosowania wspomagającego terapię choroby Leśniowskiego-Crohna i wczesnych etapów nowotworów jelita grubego.

### **Podsumowanie i wnioski końcowe**

Reasumując stwierdzam, że mgr Łukasz Kopiasz w sposób oryginalny dokonał oceny potencjału terapeutycznego lub prewencyjnego wysokooczyszczonych frakcji  $\beta$ -glukanu owsa w eksperymentalnych modelach choroby Leśniowskiego-Crohna i raka jelita grubego oraz pogłębił wiedzę na temat mechanizmów ich działania. Wykazał się przy tym ogólną wiedzą teoretyczną, m.in., w zakresie zagadnień związanych z chemią badanych składników żywności, a co za tym idzie także w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Lektura rozprawy doktorskiej mgra Łukasza Kopiasza jednoznacznie przekonuje mnie, że potrafi on zaplanować i przeprowadzić eksperymenty żywieniowe na zwierzętach laboratoryjnych, a następnie poprawnie zinterpretować uzyskane wyniki i wyciągnąć adekwatne wnioski. Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom (zgodnie z art. 187, ust. 1-2 Ustawy), dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Z uwagi na fakt, że uwzględnione w rozprawie wyniki stanowią istotny element wartościowych publikacji naukowych, w których Kandydat jest pierwszym autorem, a także ze względu na duże znaczenie społeczne poruszanych problemów zdrowotnych oraz staranny sposób przygotowania rozprawy, zgłaszam ponadto wniosek o jej wyróżnienie.

p.o. Kierownik Zakładu  
Biologicznych Funkcji Żywności  
  
dr hab. Adam Jurgonski, prof. IRZiBŻ