

prof. dr hab. dr n. med. Renata B. Kostogryś
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Wydział Technologii Żywności
Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki

Kraków, 29 stycznia 2024 r.

RECENZJA

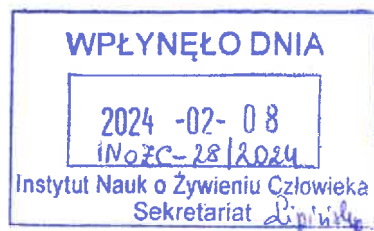
pracy doktorskiej mgr Łukasza Kopiasz
pt. „Mechanizmy działania β -D-glukanu z owsa na przebieg choroby Crohna i wczesnych stadiów
kancerogenezy okrężnicy – badania modelowe in vivo”
wykonanej w Katedrze Dietetyki, Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem
prof. dr hab. Joanny Gromadzkiej-Ostrowskiej (Promotor) oraz
dr hab. Katarzyny Dziendzikowskiej (Promotor pomocniczy)

Choroba Leśniowskiego-Crohna (CD) i rak jelita grubego (CRC) należą do przewlekłych schorzeń jelit. Liczba nowo diagnozowanych przypadków CD stale rośnie, a choroba związana jest z wysokim ryzykiem zachorowania na CRC, który jest drugim na świecie nowotworem pod względem śmiertelności. Konieczne jest zatem opracowywanie nowych, skutecznych metod wspomagania leczenia tych schorzeń, w tym dietoterapii. Doskonałą możliwością upatruje się w zmianie sposobu żywienia.

Celem badań było określenie terapeutycznego potencjału wysokooczyszczonego beta-glukanu z owsa (O β G) w chorobie Leśniowskiego-Crohna i potencjalnych możliwości hamowania rozwoju wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy, a także poznanie mechanizmów tych działań.

Mając powyższe na uwadze podjęcie przez mgr Łukasza Kopiasz badań mających na celu ocenę możliwości wykorzystania O β G (1% w diecie) o dużej lub małej masie molowej oraz O β G (1% lub 3% w diecie) o małej masie molowej w kształtowaniu odżywczych i prozdrowotnych właściwości diety w zwierzęcym modelu stanu zapalnego (model CD) lub wczesnego stadium kancerogenezy jelita grubego (model CRC) należy uznać za jak najbardziej uzasadnione.

W ocenie przedłożonej pracy składającej się z dwóch części (opisu oraz trzech artykułów) oceniam stronę formalną dysertacji, jak również zwracam uwagę na jej wartość merytoryczną, w tym zasadność celu pracy, metodologię badań, umiejętność interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników,



a także wnioskowania. Recenzja pracy doktorskiej oparta jest na analizie obu załączonych części tj. opisu zawartości artykułów, jak również treści artykułów.

Ocena formalna pracy

Rozprawę doktorską stanowi zestaw trzech publikacji poprzedzonych 64-stronicową częścią wprowadzającą do prac, w skład której wchodzi: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, spis treści, wstęp, uzasadnienie podjętego tematu w oparciu o dane literaturowe, cel badań, w którym postawiono trzy hipotezy badawcze i zakres badań wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, materiał i metodyka badań, syntetyczne omówienie wybranych wyników wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, podsumowanie wyników i ich dyskusja, wnioski oraz bibliografia. Całość zamykają załączniki w postaci oświadczeń współautorów oraz artykuły. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską to zbiór oryginalnych prac naukowych, które zostały opublikowane w czasopiśmie z listy *Journal Citation Reports* i dotyczą wspólnego obszaru badawczego, a mianowicie prozdrowotnych właściwości wysokooczyszczonego β -glukanu z owsa w chorobie Leśniowskiego-Crohna i potencjalnych możliwości hamowania rozwoju wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy.

Wśród trzech publikacji wykazanych jako osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę postępowania doktorskiego pierwsza została zamieszczona w *Nutrients* (140 pkt. MEiN, IF₂₀₂₁=6.706 Artykuł 1), druga w *International Journal of Molecular Sciences* (140 pkt. MEiN, IF₂₀₂₁=5.6, Artykuł 2), a trzecia w *International Journal of Biological Macromolecules* (100 pkt. MEiN, IF₂₀₂₂=8.2, Artykuł 3).

W dokumentacji przesłanej do recenzji przedłożono oświadczenia współautorów potwierdzających udział Doktoranta w badaniach. Wszystkie załączone prace są współautorskie (od trzech do siedmiu współautorów). W zgłoszonych do uzyskania stopnia doktora artykułach Doktorant jest autorem wiodącym (w każdej pracy pierwszym). Jego procentowy udział w pracach wynosi: 50% w jednej publikacji i po 70% w dwóch pozostałych.

Wprawdzie przedstawione prace są wieloautorskie, jednakże czasopisma w których opublikowano wyniki bez wątpienia zaliczyć należy do czasopism renomowanych. Na podkreślenie zasługują ilościowe wskaźniki charakteryzujące publikacje wchodzące w skład monotematycznego cyklu. Łączny *impact factor* wymienionych publikacji wynosi 20.506, a suma punktów zgodnie z wykazem MEiN wynosi 380. Wynik ten jest ponadprzeciętny.

Praca doktorska została zrealizowana w ramach dwóch projektów badawczych OPUS, tj. 2015/17/B/NZ9/01740 (konkurs OPUS 9) oraz 2018/29/B/NZ9/01060 (konkurs OPUS 15) finansowanych z środków Narodowego Centrum Nauki, co jest imponujące.

Część wprowadzająca napisana jest ładną polszczyzną i jest pozbawiona błędów stylistycznych oraz interpunkcyjnych, co świadczy o jej niezwykle starannym przygotowaniu.

Ocena poprawności sformułowania tytułu, celu pracy oraz jego uzasadnienia

Tytuł pracy jest sformułowany poprawnie i realizowany w zaplanowanych eksperymentach.

W rozdziale *Cel badań i hipotezy* Doktorant podał cel główny. Cel ten został sprecyzowany w sposób jasny i klarowny. Został on sformułowany prawidłowo, podobnie jak postawione trzy hipotezy badawcze.

We wstępie Autor wyjaśnił uzasadnienie podjętego tematu w oparciu o dane literaturowe. Autor przejrzyście przedstawił w nim podstawy naukowe rozprawy. Doktorant scharakteryzował chorobę Leśniowskiego-Crohna, nowotwory jelita grubego. Opisał również mechanizmy działania β -glukanów z owsa na przebieg choroby Leśniowskiego-Crohna oraz wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy. Zwrócił uwagę na kilka prawdopodobnych mechanizmów korzystnego działania β -glukanów z owsa, m.in. wpływ na proces apoptozy i autofagii poprzez ich działanie prebiotyczne polegające na zwiększeniu wytwarzania SCFA. Również opisał mechanizm związany z właściwościami immunomodulacyjnymi oraz przeciwzapalnymi porównując do β -glukanów z jęczmienia i nawiązując do badań własnych. Opisał wpływ O β G na proces apoptozy. Na zakończenie zwrócił uwagę na inny, związany z właściwościami fizyko-chemicznymi mechanizm przeciwzapalnego działania O β G o dużej masie molowej.

Zamieszczone dane Autor poparł cytatami z bibliografii zawierającej aktualne pozycje literaturowe (59 pozycji). Piśmiennictwo wykorzystane w tym rozdziale jest starannie dobrane. Wiele prac (24 pozycji) pochodzi bowiem z ostatnich pięciu lat.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska włącza się w światowy nurt badań nad prozdrowotnymi właściwościami O β G u szczurów jakim jest ocena potencjału terapeutycznego wysokooczyszczonego β -glukanu z owsa.

W ocenie szczegółowej tej części pracy zwracam jednak uwagę, że w rozdziale: „Cel badań i hipotezy badawcze” Doktorant podaje jedynie cel główny. Zasadne jest podanie celu uzupełniającego podjętych badań, w którym można szczegółowo zdefiniować problemy badawcze.

Ocena metodologii badań

Autor w części wprowadzającej do prac przedstawia zarys doświadczeń żywieniowych, stosowanych metod analitycznych oraz statystycznych. Wszystkie procedury z udziałem zwierząt były zatwierdzone przez II Lokalną Komisję Etyczną w Warszawie (Uchwała nr 60/2015 oraz Uchwała nr WAW2/040/2019). Opis doświadczeń jest skrupulatny i uporządkowany. Dodatkowo schematy doświadczeń pozwalają na łatwe zrozumienie układu doświadczeń. W tym rozdziale Doktorant wykorzystał 4 pozycje literaturowe. Wg Recenzenta Autor powinien również uwzględnić pracę *Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, J. Nutr. 123 (1993) 1939–1951.*

Realizacja nakreślonego celu wymagała zastosowania specyficznych analiz. Przedstawiona rozprawa doktorska wykonana została za pomocą poprawnych metod badawczych przy wykorzystaniu właściwie dobranych nowoczesnych metod instrumentalnych. W mojej opinii dobór metod jest właściwy w stosunku do założonego celu, zarówno w zakresie badań *in vivo*, jak i analiz chemicznych.

W tej części pracy nasuwają się następujące wątpliwości/spostrzeżenia:

- Brakuje wyjaśnienia/przesłanki doboru i celowości stosowania w badaniach *in vivo* dawki O β G w diecie szczurów, liczby zwierząt w grupie oraz punktów czasowych i długości trwania eksperymentów. Autor tłumaczy jedynie punkty czasowe doświadczenia I (na str. 32) oraz doświadczenia II (na str. 45) dopiero w rozdziale podsumowanie wyników i ich dyskusja. Autor na początku powinien wytłumaczyć, co Go skłoniło do prowadzenia pierwszego doświadczenia (opisanego w dwóch pierwszych artykułach) przez okres 21 dni, natomiast drugiego (opisanego w trzecim) przez okres 8 tygodni (str. 29).
- W ogromnej większości badań żywieniowych stosuje się dietę AIN-93 opracowaną przez Reeves i wsp. [1993]. Autor nie podaje, na czym polegała modyfikacja składu diety, zatem nie wiadomo, czy dieta była bilansowana.

- Opisując analizy immunohistochemiczne oraz Western Blot Autor nie podaje rozcieńczenia przeciwciał. Dane takie można jednak znaleźć w artykułach.
- Autor nie podaje źródła metodyki, wg której analizował preparaty immunohistochemiczne (dwadzieścia obszarów nabłonka jelitowego o zbliżonej powierzchni na każdym skrawku).

Ocena prezentacji, interpretacji i dyskusji wyników

W syntetycznym omówieniu wyników Doktorant dokonał przedstawienia rezultatów badań mieszczących się w załączonych publikacjach. W opisie odniósł się do najważniejszych wyników i przedstawił krótką dyskusję. Autor wykazał się tym samym dużą znajomością problematyki i umiejętnością wykorzystania literatury naukowej. W omawianym rozdziale Doktorant porównał uzyskane rezultaty z wynikami prac innych badaczy koncentrując się na ocenie mechanizmów stwierdzonych zależności.

Nasuwają się następujące spostrzeżenia:

- Dlaczego w opisie Autor nie wspomniał o wynikach uzyskanych w ostatnim punkcie czasowym (tj. 21 dzień).
- Nie do końca wiadomo co oznacza stwierdzenie „bardzo znaczący wzrost ekspresji białka” (str. 35).
- Wg Recenzenta nie ma konieczności dwukrotnego opisywania słupków na rycinach.

Ocena wnioskowania

Na podstawie otrzymanych wyników sformułowano cztery spostrzeżenia. Przedstawiają one najważniejsze wyniki badań w kontekście założonego celu stanowiąc podsumowanie przeprowadzonych badań. Upoważniły one Autora do wyciągnięcia trzech wniosków głównych i jednego wniosku praktycznego.

Ocena wykorzystanej bibliografii

W części opisowej skorzystano z 88 pozycji literatury. Zdecydowana większość z nich to oryginalne prace twórcze. Ponad 42% cytowanych prac opublikowano w ostatnich pięciu latach. Na uwagę zasługuje więc zarówno trafny dobór źródeł oraz ich aktualność.

Przegląd artykułów wchodzących w zakres pracy doktorskiej

Artykuł 1:

W Artykule 1 przedstawiono ocenę zależnego od czasu wpływu β -glukanów z owsa w diecie na apoptozę oraz autofagię okrężnicy w zwierzęcym modelu (szczury Sprague-Dawley). Eksperyment żywieniowy prowadzono 3, 7 i 21 dni. Wykazano, że spożycie w diecie O β G o małej i dużej masie molowej (1%) znacząco zmniejszyło stan zapalny jelita grubego poprzez zależną od czasu modyfikację autofagii i apoptozy, przy czym wg Autora O β G o małej masie molowej (GI) wykazują silniejszy wpływ na apoptozę, natomiast O β G o dużej masie molowej (Gh) na autofagię. Mechanizm tego działania może opierać się na aktywacji receptorów TLRs i Dectin-1 oraz jest zależny od okresu zaostrzenia lub remisji.

Doktorant przedstawił uzyskane wyniki w sposób zwięzły właściwie je interpretując i przeprowadzając prawidłową ich analizę. Zastanawiające jest jedynie użycie różnych nazw grup na Fig. 2, które nie są tożsame z nazwami zdefiniowanymi w metodyce.

Udział w tworzeniu publikacji Autor szacuje na 50%. W ramach prac Doktorant prowadził eksperymenty, przygotowywał manuskrypt, opisywał wyniki, prowadził wizualizację oraz analizę statystyczną, jak również dyskutował wyniki.

O wysokiej wartości merytorycznej pracy świadczy fakt, że wg bazy Scopus była ona cytowana już jedenaście razy (w tym 3 autocytowania).

Artykuł 2:

W Artykule 2 przedstawiono wpływ β -glukanu z owsa na modulację odpowiedzi w chorobie zapalnej jelit poprzez wpływ na chemokiny i szlak sygnałowy ich receptorów. W pracy wykorzystano doświadczenie opisane w pierwszym artykule. Jako że nie jestem zwolennikiem ilości, a jakości prac zwracam uwagę na fakt, że lepszym pomysłem jest publikowanie większej ilości wyników w jednym artykule i tym samym celowanie w czasopisma o jeszcze wyższej randze mające szerszy zasięg.

Doktorant przedstawił uzyskane wyniki w sposób przejrzysty i właściwie je zinterpretował. Rezultaty badań zostały przedstawione w formie wykresów w sposób czytelny i zrozumiały. Warto podkreślić, że cała analiza uzyskanych rezultatów została przeprowadzona bardzo wnikliwie i starannie.

Procentowy udział w tworzeniu publikacji Autor szacuje na 70%. W ramach prac Doktorant brał udział w opracowaniu koncepcji badań, deklaruje współudział w wykonywaniu doświadczeń, pisaniu artykułu, prowadzeniu analizy statystycznej, opisywaniu wyników oraz ich wizualizacji. Wg bazy Scopus artykuł był cytowany cztery razy (w tym 1 autocytowanie).

Artykuł 3:

W Artykule 3 przedstawiono wpływ β -glukanu z owsa (O β Gl) na poziom autofagii i apoptozy u szczurów z indukowanym wczesnym etapem kancerogenezy jelita grubego (CRC). Zwierzęta przez 8 tygodni żywiono zmodyfikowanymi półsyntetycznymi dietami (AIN-93, Reeves, 1997) z dodatkiem niskomolekularnego β -glukanu z owsa. Wykazano, że 3% dodatek O β Gl ma działanie modulujące stymulując autofagię i zewnątrzpochodny szlak apoptozy, natomiast 1% dodatek O β Gl ma działanie stymulujące na wewnętrzny szlak apoptozy.

Autor szacuje swój udział w tworzeniu publikacji na 70%. Deklaruje współudział w przygotowaniu metodyki badań, wykonywaniu analiz laboratoryjnych oraz wizualizacji wyników. Autor brał udział w pisaniu manuskryptu. Należy podkreślić, że w tym Artykule Doktorant opisał również ograniczenia badania, co świadczy o Jego dojrzałości naukowej.

Rolą Recenzenta jest wskazanie uchybień, których Doktorant się nie ustrzegł w swojej pracy:

- str. 16 Autor pisze „... patologiczne zmiany zajmują jelito cienkie i kręte”. Jelito kręte jest częścią jelita cienkiego.

Str. 17 Autor pisze „stosowanej przez pacjenta diecie” powinno być „stosowanej przez pacjenta diety”

Str. 18 Autor wskazuje na rolę zmiany mikrobioty jelitowej. Szkoda, że w pracach brakuje takich analiz.

Str. 22 Autor wskazuje na prebiotyczne właściwości O β G polegające na zwiększeniu wytwarzania krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA). Również i takie analizy byłyby wartościowym dodatkiem w pracy.

Str. 51 w spisie literatury podając dane bibliograficzne Autor podwójnie wpisał rok (Günaltay 2015).

Str. 27, str. 28 ... opisując żywienie Autor powinien używać raczej nazwę „dieta kontrolna” a nie „pasza (Reeves i wsp. J Nutr. 1993, 123(11):1939-51).

- Autor powinien unikać sformułowania „bardzo znaczący” (m.in. str. 35).
- W pracy pojawiają się niezwykle sporadycznie błędy językowe.

Jednocześnie stwierdzam, że uchybienia te są niewielkie i nie mają wpływu na bardzo wysoką wartość pracy.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi bardzo wartościowe opracowanie naukowe, świadczące o doskonałym przygotowaniu merytorycznym i warsztatowym Doktoranta.

Autor określił problemy badawcze, sformułował cel pracy, sprecyzował metodologię badań. W efekcie uzyskał wiele wartościowych wyników oraz dokonał prawidłowej ich interpretacji. Podsumowując moją ocenę przedstawionej pracy doktorskiej pragnę podkreślić duży wkład pracy włożony w jej realizację. Dodatkowo poziom edytorski pracy należy ocenić jako bardzo wysoki.

Podkreślić należy również potencjalny aspekt aplikacyjny pracy. Podejmowanie badań mających na celu określenie prozdrowotnych właściwości β -D-glukanu z owsa w diecie szczurów wzbogaca istniejący stan wiedzy. Wyniki te potwierdzają bowiem, że z uwagi na obecność składników cennych z żywieniowego punktu widzenia systematyczne ich spożywanie może być korzystne dla zdrowia. Uzyskane wyniki sugerują, że beta-glukan z owsa stosowany jako dodatek do pożywienia jest bezpiecznym i skutecznym środkiem wspomagającym terapię, który może być stosowany w schorzeniach jelita grubego, takich jak choroba Leśniowskiego-Crohna oraz w chorobach nowotworowych jelita grubego na wczesnych etapach ich rozwoju. Tym samym dają również nadzieję na praktyczne wykorzystanie tej wiedzy podczas projektowania sposobu żywienia przeznaczonego dla określonych grup populacyjnych oraz pojedynczych osób.

Uważam, że zarówno dobór tematu pracy doktorskiej, jak i jej zakres, cele poznawcze oraz użyteczne są prawidłowe. Użyty w pracy doktorskiej nowoczesny metodyczny warsztat naukowy pozwala na prawidłową realizację postawionych celów badawczych. Ogólnie zarysowana teza naukowa pracy jest nowatorska. Nieliczne uwagi/spostrzeżenia zawarte w recenzji w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy.

Stwierdzam, że praca mgr Łukasza Kopiasz spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w *Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.)*.

Zatem mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Kopiasz do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'L. Kopiasz', written in a cursive style.