



WYDZIAŁ BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA

Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 29 stycznia 2021 r.

Dr hab. Joanna Kołodziejczyk-Czepas, prof. UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
tel. 42 635 44 83

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Sut

„Ocena wpływu spożycia kwasów tłuszczowych omega-3 i polifenoli roślinnych na wskaźniki stanu zapalnego i reaktywność płytek krwi w wybranych chorobach cywilizacyjnych”

WYKONANEJ W ZAKŁADZIE ZABURZEŃ KRZEPNIĘCIA KRWI KATEDRY NAUK BIOMEDYCZNYCH
UNIwersytetu Medycznego w Łodzi

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy bardzo aktualnej tematyki, obejmującej ocenę wpływu diety na przebieg stanów zapalnych i możliwości modulowania nasilenia procesów zapalnych oraz przeciwdziałania powikłaniom zakrzepowym przez składniki diety, w kontekście patofizjologii wybranych chorób cywilizacyjnych.

Wzrost potencjału prokoagulacyjnego osocza krwi, zwiększenie reaktywności płytek krwi (obejmujące zarówno ich aktywność hemostatyczną, jak i prozapalną) oraz osłabienie efektywności działania układu fibrynolitycznego stanowią kluczowe elementy dysfunkcji hemostatycznych, towarzyszących przebiegowi chorób nowotworowych, a także patofizjologii zaburzeń funkcjonowania układu krążenia. Ze względu na częstość występowania, choroby układu krążenia oraz nowotwory stanowią wiodącą przyczynę śmiertelności w krajach rozwiniętych. Obie grupy chorób są wyzwaniem dla współczesnej medycyny i wzbudzają duże zainteresowanie badaczy. Wpisując hasło „*cardiovascular disease*” w tylko jednej z popularnych baz danych naukowych (PubMed; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>; dane na dzień 25 stycznia 2021 r.), otrzymujemy już ponad 2,614,000 rekordów. Jednocześnie, należy podkreślić, że liczne badania dotyczące zarówno profilaktyki pierwotnej i wtórnej, jak i opracowywania nowych strategii terapeutycznych, nadal jednak nie doprowadziły do satysfakcjonującej redukcji zapadalności na wyżej wymienione schorzenia i śmiertelności wśród chorych. Co więcej, nowe badania ujawniają coraz więcej molekularnych powiązań pomiędzy mechanizmami patofizjologii chorób nowotworowych

i schorzeń układu sercowo-naczyniowego w różnych stadiach ich rozwoju, a fizjologią hemostazy, w tym reaktywnością płytek krwi.

Przedmiotem badań wchodzących w zakres pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Sut jest wpływ spożycia ważnych składników diety człowieka, takich jak kwasy tłuszczowe omega-3 i polifenole reprezentujące różne klasy metabolitów roślinnych, na poziom wskaźników stanu zapalnego i reaktywność płytek krwi u osób ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową lub schorzeniami kardiologicznymi. Obejmuje ona 127 stron i charakteryzuje się uporządkowaną, przejrzystą strukturą, typową dla dysertacji zawierających część doświadczalną. Pracę podzielono na 11 głównych sekcji, obejmujących wstęp (I), cel pracy (II), materiały i metody (III), wyniki (IV), dyskusję (V), streszczenie w języku polskim (VI) i angielskim (VII), wykaz cytowanego piśmiennictwa (VIII), załączniki (IX) oraz wykazy: tabel (X) i rycin (XI). Tekst zilustrowano 48 tabelami oraz 21 rycinami. Załączniki obejmują natomiast formularze autorskich, opracowanych na potrzeby dysertacji ankiet i kwestionariuszy żywieniowych dla pacjentów kardiologicznych oraz pacjentek onkologicznych.

Przed zasadniczym tekstem pracy zamieszczono **wykaz stosowanych skrótów i symboli**, choć niestety wyjaśnia on tylko część zastosowanych w tekście skrótów (brak jest w nim między innymi wyjaśnień skrótów takich jak PGI₂, VCAM-1, 5HT, HSV, CMV, PAF, NF-κB, ICAM-1, DHA, EPA).

Część teoretyczna pracy

Wstęp pracy obejmuje bardzo zwięzłe omówienie głównych zagadnień istotnych dla przedmiotu pracy, takich jak patogeneza raka piersi oraz miażdżycy i choroby wieńcowej serca, udział procesów zapalnych w wyżej wymienionych chorobach, rola płytek krwi w patogenezie chorób cywilizacyjnych, a także przeciwzapalne właściwości składników żywności (rozdziały 1-6). Ponadto, w tej części pracy krótko nakreślono także charakterystykę związków polifenolowych, ich występowanie i główne kierunki aktywności biologicznej (rozd. 7). W kolejnych rozdziałach Doktorantka przedstawiła źródła kwasów tłuszczowych omega-3 i omega 6 (rozdział 8), wpływ związków polifenolowych i kwasów tłuszczowych omega-3 na reaktywność płytek krwi (rozdział 9) i na parametry stanu zapalnego (rozdział 10). W ogólnej ocenie, sekcja „Wstęp” jest zrozumiała i dostarcza dobrego wprowadzenia do tematyki pracy. Ze względu na obszerność wszystkich zagadnień związanych z przedmiotem pracy, zrozumiałe jest skrótowe nakreślenie części kwestii w tej części dysertacji. Jednak w aspekcie podjętego tematu, warto byłoby nieco szerzej omówić rolę dyslipidemii w procesie aterogenezy. Dlatego chciałabym poprosić Doktorantkę o krótkie omówienie tego zagadnienia w trakcie odpowiedzi na recenzję. Z obowiązku recenzenta

muszę również zwrócić uwagę na dość częste niedociągnięcia edytorskie oraz pojawiające się niezbyt fortunate sformułowania lub skróty myślowe, na przykład:

- „...leki z rodziny antracyklin (doksorubicyna) i z rodziny taxan (paklitaksel)” – zamiast „...z grupy taksanów (paklitaksel)” (strona 12);
- bardzo ogólnikowe zdanie: „Zapalenie w organizmie można mierzyć na wiele sposobów.” (strona 15);
- nieprecyzyjne określenie „ciężkość miażdżycy tętnic” w zdaniu: „Z kolei w badaniu Yüksel i wsp. wykazano niezależny związek pomiędzy przedoperacyjnym poziomem PLR a ciężkością miażdżycy tętnic...” (strona 17);
- niezbyt jasne sformułowanie myśli w zdaniu „Płytki krwi zawierają wiele czynników wzrostu, w tym płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), które produkowane przez komórki nowotworowe przyczyniają się do ich wzrostu.” (strona 17);
- nieprecyzyjne sformułowanie: „Godnym uwagi płytkopochodnym wskaźnikiem prozapalnym jest MPVLR”. (strona 18). Jako czynniki płytkopochodne lub płytkowopochodne określa się bowiem substancje uwalniane z tych komórek, natomiast parametr MPVLR to wyliczona wartość, stosunek średniej objętości płytek krwi do limfocytów;
- stosowanie trybu osobowego, zamiast ogólnie przyjętego stylu pisanie w formie bezosobowej lub w 3 osobie: „Przeprowadzając badanie metodą hsCRP (o podwyższonej czułości) jesteśmy w stanie sklasyfikować wyniki...” (strona 19), „Do polifenoli zaliczamy ponad 8000 różnych fitozwiązków [50]. Dzielimy je pod kątem budowy chemicznej...” (strona 23);
- „Kolejną bardzo ważną grupą związków są kwasy tłuszczowe omega-3, znane ze swojej aktywności przeciwzapalnej. W badaniach klinicznych udokumentowano ich liczne korzyści zdrowotne.” (strona 22; ze zdania tego wynika, że kwasy mają korzyści zdrowotne);
- opis źródeł kwasu synapinowego (strona 24), należy skorygować z „Kwas sinapowy – soki cytrusowe, warzywa z rodziny Brassicaceae, jarmuż, kapusta, brokuły” np. na „Kwas synapinowy – soki cytrusowe, warzywa z rodziny Brassicaceae, w tym jarmuż, kapusta, brokuły”, ponieważ rodzina Brassicaceae (kapustowate) obejmuje wyżej wspomniane warzywa;
- strona 26: niejasne zdanie „Hamuje ona aktywność COX, a dokładniej syntazy cyklicznych nadtlenków prostaglandyn G/H, która wykazuje się tylko aktywność cyklooksygenazy, ale również peroksydazy.”
- nieprecyzyjne sformułowanie „U osób zdrowych, suplementacja umiarkowanymi dawkami omega-3 (640mg/dobę) może przyczyniać się do nieznacznego obniżania agregacji płytek z ADP...” także wymaga korekty, na „...agregacji płytek wywołanej ADP”, ponieważ na skutek aktywacji płytki agregują ze sobą – tzn. w odpowiedzi na stymulację ADP, a nie zaś z samym ADP.

Część badawcza

Część doświadczalna pracy została zaprojektowana w sposób bardzo przemyślany, a jej struktura jest uporządkowana. **Cel pracy** jest jasny – choć przedstawiony nieco nietypowo – w formie pytań, a nie jak to najczęściej bywa – jako sformułowanie: „celem/przedmiotem pracy (czy też badań) było...” lub hipotezy badawczej. Należy także podkreślić, że wprowadzenie celów szczegółowych i wypunktowanie założeń było bardzo dobrym rozwiązaniem, ułatwiającym czytelnikowi zapoznanie się z koncepcją badawczą pracy.

Sekcja materiały i metody stanowi dobrze przygotowane omówienie charakterystyki grup badanych pacjentów, grupy kontrolnej, a także zastosowanych metod. W oparciu o dane przedstawione w tabeli 5, jako recenzent, chciałabym jednak prosić o wyjaśnienie powodów nieoznaczenia statusu receptorów HER2, ER i PR u tak dużej części pacjentek (40-42) na 78. Czy jest to przypadkowy wynik uzyskany akurat w tej grupie badanej, czy na przykład efekt braku dostępności tych badań dla pacjentek?

- W tabeli 7 (obejmującej charakterystykę zdrowych dawców), pojawiają się natomiast nieprecyzyjne sformułowania „agregacja z AA”, „agregacja z ADP”, „agregacja z kolagenem”. Sformułowaniem zdecydowanie bardziej precyzyjnym byłoby „agregacja wywołana (czy indukowana)...”.
- Rozdział „3.3 *Badanie reaktywności płytek krwi - wielokanałowa agregometria impedancyjna (MEA, Multiple Electrode Aggregometry)*” zawiera bardzo krótkie omówienie zasady metody oraz zastosowanego sprzętu i reagentów, Doktorantka nie wsparła jednak tego fragmentu żadnym odnośnikiem literaturowym, wskazującym prace przedstawiające podstawy zastosowanej metody i/lub potwierdzające szerokie zastosowanie agregometrii impedancyjnej we współczesnych badaniach odpowiedzi płytek krwi.
- W rozdziale „3.6 *Analiza statystyczna*” nie podano rodzaju zastosowanego testu t-Studenta. Warto byłoby również wskazać, dla jakich parametrów zastosowano ten test do oceny istotności statystycznej różnic między grupami.

Wyniki uzyskane z przeprowadzonych przez Doktorantkę badań omówiono dokładnie, a dane zilustrowano rycinami oraz tabelami. Sposób prezentacji wyników jest typowy dla rodzaju realizowanych badań, w większości prawidłowy i zrozumiały dla odbiorcy. Niektóre fragmenty wymagają jednak doprecyzowania lub korekty.

- W pracy pojawia się niespójny zapis jednostek objętości, częściowo „ml” oraz „l”, a częściowo „mL” i „L”.
- W rozdziale „4.1 *Walidacja kwestionariusza*” można napotkać niezbyt naukowe sformułowanie „*Wskaźnik Blanda-Altmana wyszedł poprawny dla wszystkich podklas*”

polifenoli..." - poza kwestią użycia kolokwialnego sformułowania „wyszedł”, warto byłoby pokusić się o dokładniejsze wyjaśnienie znaczenia tego parametru dla walidacji kwestionariusza.

- W tabelach obejmujących wyniki uzyskane z pomiarów agregacji (np. tabela 19), w kolumnie „*Agonista*” Autorka zamieściła niejasny zapis nazwy zastosowanego agonisty wraz z jednostkami „*μmol/L [U]*” lub „*mmol/L [U]*”, wynikający zapewne ze zbyt skrótowego połączenia w jednej sekcji: nazwy substancji, jej stężenia użytego do stymulacji płytek krwi oraz jednostek, w których wyrażano wyniki.
- Tabela 17 – pojawia się nazbyt potoczne określenie „zdrowa kontrola” pod tabelą: „*Punkty odcięcia były wyliczone jako 95-ty percentyl markerów stanu zapalnego w zdrowej kontroli (n=102)*”
- Tabela 18 „*Zgodność pomiędzy podwyższonymi wskaźnikami stanu zapalnego a niskim spożyciem polifenole w grupie pacjentek z rakiem piersi (n=78).*” – w kolumnie prezentującej wynik analiz statystycznych podano wartości *p*, z wyjątkiem danych dla MPVLR, gdzie zaznaczono „*ns*” (nieistotne statystycznie). Nawet jeśli nie zaobserwowano istotności statystycznej, uzyskano z obliczeń konkretną wartość *p*, którą należy podać. Ponadto, w rozdziale dotyczącym analizy statystycznej (rozdział 3.6) Doktorantka zawarła następujące stwierdzenie: „*Dla wszystkich analiz, wartość P niższa niż 0,05 uznawana była jako istotna statystycznie.*”, a jednak z opisu wyżej wymienionych wyników i ze sposobu ich przedstawienia w tabeli 18 wynika, że różnice, dla których wartość *p* wynosiła 0,06 także przyjęto za istotne statystycznie.
- Tabela 21 „*Oszacowanie dziennego spożycia kwasów tłuszczowych i polifenoli u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca (n=105).*” obejmuje również cholesterol, który nie jest kwasem tłuszczowym. Dlatego, bardziej precyzyjnym określeniem byłoby użycie słowa „*lipidów*” zamiast „*kwasów tłuszczowych*” w tytule wyżej wskazanej tabeli.
- Tabela 30: błąd edytorski - przesunięcie wartości *p* względem wyników uzyskanych dla prezentowanych paramentów.
- Podrozdział 4.2.3 Wpływ kwasów tłuszczowych na agregację w grupie pacjentów kardiologicznych – Doktorantka zawarła następujące stwierdzenie „*W grupie wysokiego spożycia nasyconych kwasów tłuszczowych zaobserwowano istotnie wyższą agregację z AA (p=0,006; tabela 40). Dodatkowo w tej grupie zauważono znaczne, aczkolwiek nieistotne statystycznie, wyższe wartości agregacji z ADP (p=0,09; tabela 40).*” Drugie zdanie w przytoczonym fragmencie jest bardzo nieprecyzyjne. Chciałabym prosić o wyjaśnienie, co Doktorantka chciała przekazać pisząc o znacznych wartościach i do jakich grup odnosi się powyższe porównanie.

Dyskusja obejmuje prawie 8 stron omówienia wyników uzyskanych przez Doktorantkę na tle obecnego stanu wiedzy. Jest ona poprowadzona w sposób poprawny, choć warto byłoby

bardziej uwypuklić nowatorskie aspekty pracy i nieco dynamiczniej przedyskutować wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy. Bardzo ciekawe są m.in. wyniki aktywności biologicznej lignanów uzyskane z pomiarów w obu badanych grupach pacjentów. Choćby krótkie omówienie wyników dotyczących wpływu lignanów na agregację płytek krwi i inne badane parametry oraz skonfrontowanie ich z danymi literaturowymi znacznie wzbogaciłoby dyskusję.

W części dyskusyjnej Autorce również nie udało się ustrzec przed potknięciami stylistycznymi i edytorskimi, pojawiły się także kolejne kwestie wymagające pewnego doprecyzowania.

- Na stronie 80, Doktorantka zawarła stwierdzenie *”W dużym badaniu wieloośrodkowym wykryto związek pomiędzy zawartością polifenoli w diecie a biomarkerami stanu zapalnego przedstawionymi jako INFLA-score, do którego kalkulacji bierze się pod uwagę m.in. stężenie CRP, leukocytów, płytek krwi i granulocytów [106].”* Chciałabym prosić o doprecyzowanie liczności grupy objętej cytowanym badaniem.
- Zdanie *„W nauce przedstawia się różne potencjalne mechanizmy przeciwplatekowej aktywności polifenoli takie jak aktywność antagonisty tromboksanu, wpływ na szlaki trombogenne np. P2Y1/P2Y12 czy COX-1 [110].”* jest bardzo skrótowe i wymaga przeredagowania. Między innymi, zdecydowanie lepiej byłoby użyć precyzyjniejszych określeń opisujących wyżej wymienione szlaki, na przykład określenia „aktywacja przy udziale receptorów P2Y1 i P2Y12” oraz „przemiany kwasu arachidonowego katalizowane przez płytkową cyklooksygenazę 1”.
- Podobnie, przeredagowania i uściślenia wymaga zdanie *„W badanie Maki i wsp. również potwierdzono, że dawki EPA i DHA poniżej 1g dziennie w większości publikacji nie powodują istotnych zmian w badanych parametrach.”* Autorka nie wskazała typu badania - w zdaniu jest mowa o większości publikacji, czy zatem była to metaanaliza? Jeśli była to metaanaliza, to jaki był zakres prac włączonych do jej przeprowadzenia?
- Korekty stylistycznej wymaga również ogólnikowe i nieco kolokwialne zdanie *„W świetle aktualnych doniesień, z powodu niewielu przeprowadzonych eksperymentów, ciężko jednoznacznie potwierdzić użyteczność stosunku kwasów tłuszczowych omega-6 do omega-3 jako wskaźnika prozapalności diety.”*

Rozdział **Podsumowanie i wnioski** zawiera 3-stronnicowe posumowanie wyników uzyskanych w pracy. Wnioski przedstawiono w 9 dość obszernych punktach. W większości są one prawidłowe w odniesieniu do uzyskanych wyników, jedynie punkt 9 może budzić pewne zastrzeżenia. We wniosku tym, Doktorantka zawarła następujące stwierdzenie *„Nawiązując do celu ogólnego pracy, odpowiednio dobrana dieta z odpowiednią proporcją kwasów tłuszczowych omega-6 do omega-3, zawierająca związki bioaktywne takie jak*

polifenole roślinne i kwasy tłuszczowe omega-3 może ograniczać proces zapalny w chorobach cywilizacyjnych.”

Ze względu na złożony charakter etiologii i patofizjologii chorób nowotworowych oraz zaburzeń funkcji układu sercowo-naczyniowego, na podstawie badań wykonanych w ramach omawianej dysertacji jest zdecydowanie za wcześnie na wyciąganie tak daleko idących wniosków. Stwierdzenie dotyczące chorób cywilizacyjnych jest również zbyt ogólne, ponieważ w swojej pracy, Doktorantka skupiła się jedynie na wybranych jednostkach chorobowych.

Streszczenia w języku polskim i angielskim odzwierciedlają zawartość pracy.

Wykaz piśmiennictwa obejmuje 124 pozycje, a jego dobór jest adekwatny do tematyki objętej pracą, choć podobnie jak w poprzednich sekcjach pracy, również w wykazie piśmiennictwa można znaleźć liczne potknięcia edytorskie (m.in. brak numerów stron – np. pozycja 39, niewykasowane komentarze pozostałe po sprawdzaniu pracy – pozycja 20, błędnie podane skróty nazw czasopism – pozycja 54, niespójny sposób przedstawiania tytułów prac – część pisano małą, część natomiast wielką literą). Należy jednak podkreślić, że aż 58 zacytowanych źródeł pochodzi z ostatnich 5 lat (lata 2016-2020), w tym 17 pozycji opublikowano w latach 2019-2020. Dobór literatury jest zasadny, a jej aktualność oraz różnicowanie potwierdzają znajomość tematyki badawczej i najnowszej literatury przez Doktorantkę.

Doktorantka cytuje także pracę swojego współautorstwa – poz. 39: *“Sut, A., et al., Polyphenol-rich diet is associated with decreased level of inflammatory biomarkers in breast cancer patients. Roczn. Państw. Zakł. Hig., 2019. 70(2).”* Pracę tę zacytowano w rozdziale „4. Podłoże zapalne chorób cywilizacyjnych – wskaźniki oceny stanu zapalnego” części teoretycznej pracy (bez wspomnienia, że jest to publikacja przygotowana w oparciu o wyniki z pracy doktorskiej). Właściwie jest to jedyny moment, w którym pojawia się kwestia publikacji własnych Autorki dysertacji. W pracy nie zawarto bowiem wykazu publikacji i komunikatów, których tematyka związana była z badaniami realizowanymi w ramach przygotowanej rozprawy doktorskiej.

Część końcowa rozprawy zawiera informacje uzupełniające - załączniki zawierające zawartość ankiet i kwestionariuszy żywieniowych dla pacjentów kardiologicznych i pacjentek onkologicznych, a także wykaz tabel i rycin.

Podsumowanie oceny pracy i wniosek końcowy

Podjęcie przez Doktorantkę tematu oceny poziomu wskaźników stanu zapalnego i reaktywności płytek krwi w wybranych chorobach cywilizacyjnych oceniam jako w pełni zasadne. Przedstawiona do recenzji praca autorstwa Pani mgr Agnieszki Sut opiera się na prawidłowo opracowanej koncepcji badawczej. Dostarcza nowych, cennych informacji na temat fizjologicznych efektów aktywności biologicznej badanych składników diety oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Wskazane w recenzji uchybienia edytorskie lub kwestie wymagające doprecyzowania, nie wpływają na ogólną, pozytywną ocenę pracy. Należy również podkreślić, że wyniki uzyskane w ramach badań objętych rozprawą stanowią ciekawą podstawę do dalszych prac badawczych.

Dysertacja odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim zawartym w art.13 *Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz.U.nr 65, poz. 595 z późn.zm.). W związku z powyższym, wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Sut do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Kołodziejczyk-Czepas
Joanna Kołodziejczyk-Czepas