

Olsztyn, 04-02-2020

prof. dr hab. inż. Anita Franczak
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Kamili Stepanow, pt. " Wpływ diety o zróżnicowanej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-6/omega-3 na profil proteomiczny i metabolizm wątroby myszy"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Kamili Stepanow została wykonana w Zakładzie Genomiki i Bioróżnorodności Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu, pod kierunkiem promotora - Pana prof. dr. hab. Mariusza Pierzchały (Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk) i Pana dr. inż. Adama Lepczyńskiego, pełniącego funkcję promotora pomocniczego (Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie). Przeprowadzone badania sfinansowano ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego "Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność", decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015, w ramach projektu promotorskiego, numer rejestracyjny KNOW/2015/CB/PRO1/44. Doktorantka uzyskała zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach na przeprowadzenie prezentowanych badań (uchwała nr WAW2_22/2016).

Przedstawiona do recenzji praca ma formę klasycznej rozprawy doktorskiej i składa się z charakterystycznych, dla tego typu prac, rozdziałów głównych, tj. Wstęp, Przegląd literatury, Hipotezy badawcze, Cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie, Stwierdzenia i wnioski, Bibliografia, Spis rycin, tabel i załączników oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim. Zdaniem Recenzenta, tytuł pracy: „Wpływ diety o zróżnicowanej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-6/omega-3 na profil proteomiczny i metabolizm wątroby myszy” powinien uwzględniać również nazwę łacińską gatunku, na którym wykonano badania. Doktorantka zamieściła oświadczenie, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została napisana przez nią samodzielnie i nie zawiera treści

uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, a także nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w uczelni wyższej, a w wersji papierowej jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przesłanką do podjęcia przez Doktorantkę badań, dotyczących wpływu diety o zróżnicowanej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-6/omega-3 na profil proteomiczny i metabolizm wątroby, są obserwacje, iż w ostatnich latach, w diecie człowieka nastąpił znaczący wzrost spożycia produktów bogatych w nasycone kwasy tłuszczowe (NKT) oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WNKT) n-6, przy niskim spożyciu WNKT n-3. W konsekwencji wpłynęło to na zwiększenie stosunku kwasów tłuszczowych n-6 do n-3 w diecie. Obecność w diecie NKT i zmieniony stosunek kwasów n-6 do n-3 mogą potencjalnie przyczyniać się do zaburzenia procesów metabolicznych w organizmie, wzrostu ciśnienia krwi, poziomu cholesterolu i glukozy, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego i chorób z nadwrażliwości, procesów zapalnych, cukrzycy, nadwagi i otyłości, chorób nowotworowych, a także zaburzeń procesów odpornościowych oraz zmian statusu mikrobiomu. Istnieją przesłanki, że pozytywny efekt dla zdrowia można uzyskać przez zastąpienie nasyconych kwasów tłuszczowych wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi. Jednakże wyniki doświadczeń dotyczące pozytywnego wpływu WNKT w diecie na zdrowie nie są jednoznaczne i dlatego wymagają dalszych badań. Wykazano wprawdzie korzystny wpływ na organizm niskiego stosunku kwasów n-6 do n-3, ale istotne jest pytanie jaka wartość stosunku kwasów n-6 do n-3 jest optymalna. Należy stwierdzić, że podjęty przez Doktorantkę temat jest bardzo aktualny.

Główną rolę w metabolizmie kwasów tłuszczowych pełni wątroba, co mocno uzasadnia podjęty przez Doktorantkę cel prezentowanych badań, obejmujący m.in. analizę proteomu tego narządu. Doktorantka określała wpływ różnego wzajemnego stosunku zastosowanych w diecie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych n-3 i n-6 na zmiany w proteomie wątroby, zależnie od czasu trwania takiej diety, a na podstawie kompleksowej analizy zmian w profilach białkowych wątroby podjęła próbę identyfikacji kluczowych białek funkcjonalnych.

Poznanie profilu proteomicznego i aktywności metabolicznej wątroby jest w pełni uzasadnione, na co wskazują przekonujące argumenty i przesłanki do podjęcia takich badań, które Doktorantka przedstawiła we *Wstępie* rozprawy oraz w rozdziale *Przegląd literatury*. Omawia tutaj również funkcje i rolę wątroby, strukturę i metabolizm narządu oraz występowanie w diecie i rolę kwasów tłuszczowych i znaczenie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w organizmie. Doktorantka rozważa również potencjalny wpływ diety na profil

proteomiczny narządów. Wstęp pracy dowodzi, iż Doktorantka dobrze opanowała umiejętność dokonywania selekcji oraz analizy wiedzy z zakresu podjętego problemu badawczego.

Biorąc pod uwagę aktualną wiedzę, a także uwzględnione przez Doktorantkę dowody i przesłanki należy uznać, że podjęty w ramach rozprawy doktorskiej temat badawczy jest bardzo interesujący, a przyjęte hipotezy badawcze i podjęte cele badawcze w pełni zasadne, choć sposób sformułowania hipotez może budzić pewne zastrzeżenia. Doktorantka założyła, że zastosowanie diet wysokotłuszczowych o zróżnicowanym składzie jakościowym aktywuje odmienne procesy metaboliczne, które mają odzwierciedlenie w zmianach profilu proteomicznego wątroby (a nie są „manifestowane poprzez zmiany profilu proteomicznego”). Założono również, że znaczny udział w diecie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (czy powinno być: przewaga w diecie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ?), w szczególności kwasów $n-3$, wpłynie na regulację ekspresji genów (powinno być: poziom ekspresji - ponieważ mechanizmów regulacji ekspresji genów nie badano) bezpośrednio związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych oraz genów związanych z metabolizmem energetycznym i odpowiedzialnych za regulację procesów zapalnych oraz oksydoredukcyjnych w wątrobie badanych myszy. Założono również, że określenie profilu proteomicznego wątroby myszy pozwoli określić aktywność metaboliczną tego narządu, co będzie wskaźnikiem indukcji zaburzeń o charakterze metabolicznym. W opinii recenzenta korekty wymaga sformułowanie brzmienia hipotezy nr 2 : *„Znaczny udział w diecie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w szczególności kwasów $n-3$, wpłynie na regulację ekspresji genów związanych bezpośrednio z ich metabolizmem, genów związanych z metabolizmem energetycznym, genów odpowiedzialnych za regulację procesów zapalnych oraz oksydoredukcyjnych w wątrobie myszy.”* Należałoby doprecyzować, że chodzi o geny związane z metabolizmem kwasów tłuszczowych – z metabolizmem tych kwasów – przecież nie z metabolizmem genów – cyt. „ich metabolizmem”. Kontrowersyjne jest również założenie uwzględnione w hipotezie nr 3 i brzmienie tej hipotezy: *„Profil proteomiczny białek wątroby myszy pozwoli na określenie aktywności metabolicznej tego narządu, będąc jednocześnie wskaźnikiem indukcji zaburzeń o charakterze metabolicznym.”*. Czy rzeczywiście profil proteomiczny „pozwoli na określenie aktywności metabolicznej narządu”? Wskazano wprawdzie ścieżki metaboliczne, w których uczestniczą zidentyfikowane białka, czy jednak może należałoby powiedzieć: poznanie profilu proteomicznego wątroby pozwoli na określenie potencjału do aktywności metabolicznej narządu i identyfikację białek funkcjonalnych, ważnych dla tej aktywności. Sformowanie właściwego brzmienia hipotez jest bardzo ważnym elementem każdej rozprawy naukowej i dlatego proszę o odniesienie się do powyższych rozważań.

Podjęte cele szczegółowe odzwierciedlają zakres przeprowadzonych badań i nie budzą zastrzeżeń. Cele te uwzględniają m.in.: określenie wpływu różnego stosunku wielonienasyconych kwasów tłuszczowych $n-6$ do $n-3$ w diecie na indukcję zmian ilościowych i jakościowych proteomu wątroby myszy w zależności od czasu stosowania diety; charakterystykę zależności między zmianami profili białkowych, w tym zmianami poziomu ekspresji białek w wątrobie myszy pod wpływem diety o różnym stosunku kwasów tłuszczowych $n-6$ do $n-3$, a zmianami w procesach metabolicznych wątroby; charakterystykę zmian poziomu ekspresji wybranych genów w wątrobie myszy pod wpływem diety o różnym stosunku kwasów tłuszczowych $n-6$ do $n-3$ oraz identyfikację i charakterystykę białek funkcjonalnych, ważnych dla odpowiedzi metabolicznej wywołanej dietą o różnej zawartości kwasów tłuszczowych $n-6$ i $n-3$.

W rozdziale Materiał i metody, Doktorantka skrupulatnie opisała zastosowane metody badawcze i dokonała precyzyjnego przedstawienia wykonanych czynności laboratoryjnych. Dodatkowo, zamieściła poglądowy schemat graficzny układu doświadczalnego, który uwzględnia grupy badawcze i wykonane analizy. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż opisy stosowanych przez Autorkę metod pozwalają na ich wierne odtworzenie. Jednakże zauważyłam w tej części rozprawy kilka nieścisłości. Na przykład, na str. 48 Doktorantka pisze: „*Krew do badań biochemicznych i morfologicznych była pobierana z komory serca. Taką samą procedurę wykonano po sześciu miesiącach żywienia zwierząt.*”, co sugeruje, że chodzi o te same zwierzęta. Strona 52: „*Stężenie białka całkowitego w otrzymanym supernatancie mierzono metodą Bradford z użyciem Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Inc.)*.” – w opisie należałoby uwzględnić jakie było stężenie białka i czy było ono oczyszczane po izolacji? Cyt.: „*Do utworzenia krzywej standardowej wykorzystano albuminę surowicy wołowej (BSA)*.” – powinno być – do wyznaczenia punktów krzywej standardowej ... Zastosowana albumina jest albuminą bydlęcą. Cyt. „*Elektroforezę w pierwszym wymiarze (powinno być – w pierwszym kierunku) przeprowadzono metodą gel-side down, polegającą na nałożeniu 600 μg mieszaniny białek na rynienkę tacy do izoelektroogniskowania i przykryciu paskiem z żelowym immobilizowanym nieliniowym gradientem pH (IPG) od 3 do 10 (Bio-Rad Laboratories, Inc.)*.” – nie podano tutaj jaka była długość pasków używanych do IEF. Taką informację znajdujemy dopiero w opisie wyników, pod rycinami przedstawiającymi obraz białek wątroby rozdzielonych przy użyciu elektroforezy dwukierunkowej – „*długość paska IPG to 17 cm*”. Proszę o wyjaśnienie dlaczego skorzystała Pani z pasków z gradientem nieliniowym, a nie z pasków z gradientem liniowym?

Strona 54 - cyt. „*W celu obliczenia zmian w poziomach ekspresji poszczególnych plamek białkowych dla grupy zastosowano parametr wielokrotności wyliczany poprzez podzielenie średniej wartości intensywności densytometrycznej danej plamki białkowej pochodzącej z wątrób zwierząt żywionych paszą standardową (grupa STD), paszą o zawartości LA/ALA 14:1 (grupa 14:1) lub 5:1 (grupa 5:1), przez średnią wartość danej plamki w wątrobach zwierząt żywionych paszą o wysokiej zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych (grupa NKT)*”. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego w celu obliczenia zmian w poziomach ekspresji poszczególnych plamek białkowych nie zastosowano parametru wyliczanego poprzez podzielenie średniej wartości intensywności densytometrycznej danej plamki białkowej pochodzącej z wątrób zwierząt żywionych paszą o zawartości LA/ALA 14:1 (grupa 14:1) lub 5:1 (grupa 5:1) i paszą o wysokiej zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych (grupa NKT), przez średnią wartość danej plamki w wątrobach zwierząt żywionych paszą standardową (STD). Strona 56 – „*Tworzenie sieci interakcji między białkami*” – czy do określenia sieci używano wszystkich zidentyfikowanych DE-białek, czy tylko wybranych? Powinno to być opisane w tej części metodyki.

Rozdział *Wyniki* zasługuje na szczególne uznanie ze względu na rzetelny opis uzyskanych wyników oraz ich dokumentację i prezentację w formie graficznej, choć czasami nie jest pozbawiony drobnych nieścisłości wynikających z błędów językowych lub edytorskich. Szczególną uwagę zwracają reprezentacyjne obrazy 2DE białek wyizolowanych z wątroby i rozdzielonych techniką elektroforezy dwukierunkowej, a także ryciny obrazujące zmiany wszystkich spotów różniących się intensywnością densytometryczną pomiędzy grupami żywieniowymi, dołączone do pracy w postaci suplementu na płycie DVD. Dokumentacja ta potwierdza, że Doktorantka mogła z sukcesem dokonać precyzyjnych analiz intensywności densytometrycznej poszczególnych spotów, uzyskanych w zależności od zastosowanej diety i czasu jej trwania. Obrazy żeli poddano analizie komputerowej przy użyciu programu PDQuest 8.0.1, do sklasyfikowania białek użyto bazy STRING 11.0 opartej na systemach klasyfikacji funkcjonalne genów i białek z baz KEGG, REACTOME i Gene Ontology. Tę część rozprawy oceniam bardzo wysoko, gdyż potwierdza profesjonalne podejście Doktorantki do wykonywanych analiz proteomicznych, a także umiejętność poradzenia sobie z interpretacją i prezentacją ogromu wyników. Podczas żmudnych badań proteomicznych Doktorantka wykonała analizy różnic statystycznych w wartościach densytometrycznych plamek białkowych zestawu 510 spotów, które występowały na każdym ze 128 analizowanych żeli. W toku wnikliwych analiz zidentyfikowała białka o zróżnicowanej ekspresji w wątrobie myszy

zależnie od rodzaju stosowanej diety i czasu jej podawania. Zobrazowała też zmiany ekspresji tych białek w formie diagramów, uwzględniając liczbę białek o zmienionej ekspresji pomiędzy badanymi grupami, a także wyodrębniła białka o podwyższonej i obniżonej ekspresji. Analizując 128 dwuwymiarowych map białkowych badanych narządów wyizolowanych od 64 osobników, Doktorantka wskazała plamki różniące się statystycznie istotnie, a spośród nich, przy pomocy spektrometrii mas, zidentyfikowała 76 spotów, w tym 63 reprezentujące pojedyncze białka. Wśród zidentyfikowanych 76, 13 spotów stanowiły mieszaniny białek i dlatego nie uwzględniono ich do dalszych analiz. Kolejnym analizom poddano zatem 63 plamki białkowe, ale liczne (42) spoty białkowe nie zostały zidentyfikowane z powodu wyników nie przekraczających progu istotnej identyfikacji. Doktorantka słusznie rozważa, co może być przyczyną takiej sytuacji, ale zastrzeżenia budzi fakt, iż w przypadku żadnego ze zidentyfikowanych białek nie podjęto próby jego walidacji inną metodą, np. Western blot lub metodą immunofluorescencyjną, pozwalającymi na potwierdzenie ekspresji analizowanego białka w badanej tkance. Byłoby to bardzo istotne zwłaszcza dlatego, że dokonywano także analiz intensywności sygnału, na podstawie których wnioskowano o poziomie ekspresji (względnej koncentracji) białek.

Rozdział *Wyniki* jest obszerny, zajmuje 50 stron formatu A4. W tej części rozprawy Doktorantka nie uniknęła jednak błędów, które rozpraszają czytelnika i utrudniają przyswojenie wyników i podążanie za nimi, np. str. 64: „*Stężenie glukozy we krwi na czczo mierzony z ogona był wyższy u myszy żywionych paszami wysokotłuszczowymi w porównaniu do grupy STD.*”, str. 65: „*Stwierdzono, że pod wpływem działania kwasów tłuszczowych wystąpiły zmiany liczby czerwonych krwinek (RBC), hematokrycie (HCT), szerokości rozkładu objętości krwinek czerwonych (RDWcv) oraz średniej objętość płytek krwi (MPV).*”, str. 67 „*Zmiana fosforu nieorganicznego została podwyższona pod wpływem trzymiesięcznej diety o wysokiej zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych (grupa NKT).*”

Rozdział *Dyskusja* jest napisany w sposób umożliwiający czytelnikowi ustosunkowanie się do uzyskanych przez Autorkę wyników, ale przejrzystość tego rozdziału i jego klarowność byłaby lepsza, gdyby Doktorantka, na początku kolejnych paragrafów dyskusji, odnosiła się do własnych wyników, a potem rozważała je na tle wyników i wniosków innych Autorów. Przyjęcie takiej zasady ułatwiłoby to czytelnikowi podążanie za rozważaniami Autorki i pozwoliłoby unikać w dyskusji przytaczania informacji, które powinny (lub mogłyby) znaleźć się we wstępie pracy i nie stanowiłyby dodatkowego przeglądu literatury w rozdziale dyskusja. Przykładem są rozważania Doktorantki na stronie 116, w których przedstawia ewentualne powiązania między jakością spożywanego tłuszczu (zawartością poszczególnych kwasów

tłuszczowych), a przyrostem masy ciała i analizuje znaczenie oleju kokosowego (zastosowanego w paszy kontrolnej), który nie był bezpośrednim przedmiotem badań. Należy jednak stwierdzić, że układ Dyskusji odzwierciedla kolejne cele badawcze, wykonane zadania badawcze i uzyskane wyniki. Rozważania dotyczące uzyskanych wyników są interesujące. Szczególnie zaciekały mnie interpretacje wyników dotyczących ekspresji genu kodującego syntezę czynnika transkrypcyjnego PPAR α , odpowiedzialnego za regulację ekspresji licznych genów m.in. w wątrobie, kodujących syntezę kluczowych enzymów biosyntezy długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Równie interesujące są rozważania o znaczeniu zjawiska związanego z obniżeniem ekspresji białek zaangażowanych w procesy glikolityczne u osobników, którym aplikowano dietę o obniżonym stosunku kwasów n-6 do n-3. W tych częściach dyskusji Doktorantka znakomicie dowiodła umiejętności interpretacji wyników i ich powiązania z danymi literaturowymi.

Przeprowadzona analiza proteomiczna wątroby myszy pozwoliła Autorce na wskazanie białek, których ekspresja zmienia się w tym narzędzie zależnie od rodzaju i czasu trwania diety. Doktorantka stwierdziła, że wprowadzenie u myszy diety, w której nasycone kwasy tłuszczowe zastąpiono kwasami tłuszczowymi wielonienasyconymi o różnym stosunku kwasu linolowego do kwasu α -linolenowego, powoduje zmiany w potencjale do aktywności związanej z metabolizmem lipidów, aminokwasów i homeostazy oksydo-redukcyjnej / lub w parametrach wskazujących na obniżenie metabolizmu lipidów, w tym beta oksydacji kwasów tłuszczowych oraz syntezy glukozy, glikolizy oraz procesów warunkujących homeostazę oksydo-redukcyjną. Należy zaznaczyć, że obecność i poziom ekspresji zidentyfikowanych białek powinien również zostać potwierdzony również przy użyciu innych metod. Proszę Doktorantkę do odniesienia się do tej uwagi. Rozprawę wieńczy rozdział Podsumowanie oraz rozdział Stwierdzenia i wnioski (5), z przewagą jednak stwierdzeń, ale nie wniosków. Bardzo proszę o odniesienie się do przyjętych hipotez i sformowanie trzech najważniejszych wniosków tej rozprawy.

Podsumowując, wykonane badania wymagały od Doktorantki ogromnego nakładu pracy, są bardzo interesujące i zaawansowane. Przeprowadzono je na modelu myszy który, jak słusznie wskazuje Doktorantka, jest cennym organizmem modelowym w odniesieniu do procesów zachodzących także w organizmie człowieka. Doktorantka interpretuje uzyskane wyniki i odnosi je do procesów zachodzących w organizmie myszy, szczura i człowieka, ale nie uwzględnia w tych rozważaniach zwierząt gospodarskich. Jakie zatem praktyczne znaczenie dla żywienia, zdrowia i dobrostanu dużych zwierząt gospodarskich mają uzyskane wyniki? Uwzględniając fakt, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest dziełem naukowym, na podstawie którego ma być nadany stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk

rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo, takich odniesień i refleksji zabrakło mi we wstępie i dyskusji pracy, dlatego bardzo uprzejmie proszę o ich uzupełnienie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Wpływ diety o zróżnicowanej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-6/omega-3 na profil proteomiczny i metabolizm wątroby myszy”, autorstwa Pani mgr Kamili Stepanow spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 ze zm.) stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Kamili Stepanow do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uwzględniając ogromny wkład pracy, umiejętności i warsztat metodyczny Doktorantki, a także potencjał uzyskanych wyników do rozwoju badań z zakresu dynamicznie rozwijającej się nutriproteomiki, proszę również o rozważenie możliwości wyróżnienia pracy stosowną nagrodą.



prof. dr hab. inż. Anita Franczak