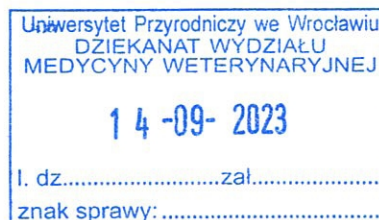


Wrocław 2023-09-11

Dr hab. n. med. Tomasz Witkowski
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Instytut Chorób Serca
Katedra i Klinika Kardiologii
ul. Borowska 213
50-556 Wrocław



Recenzja pracy doktorskiej lek. weterynarii, lek. medycyny Joanny Niewiadomskiej

„Analiza potencjału biologicznego ekstraktu polifenolowego ze skórek *Punica granatum* L. na szczurzym modelu zespołu metabolicznego”

Współistnienie otyłości z podwyższonymi wartościami ciśnienia tętniczego, zaburzeniami gospodarki węglowodanowej oraz lipidowej, określane jako zespół metaboliczny stanowi istotny problem zdrowotny i społeczny w Polsce i na świecie. Otyłość nie tylko często współistnieje z podwyższonymi wartościami ciśnienia tętniczego, zaburzeniami gospodarki węglowodanowej oraz lipidowej, ale jest również odwracalną przyczyną ich rozwoju pod warunkiem jej właściwego leczenia. Rozwój otyłości i postępujący wzrost wartości ciśnienia tętniczego oraz nasilanie się zaburzeń metabolicznych prowadzą z kolei do rozwoju kolejnych schorzeń, które dodatkowo zwiększają ryzyko sercowo-naczyniowe. Z tej perspektywy koncepcja „zespołu metabolicznego” wydaje się słuszna, gdyż pozwala na całościowe podejście do osoby chorującej na otyłość, wskazując na konieczność identyfikacji i modyfikacji współistniejących istotnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego oraz wczesnej prewencji ich rozwoju.

W ostatnich latach możliwość wykorzystania biologicznie aktywnych substancji pochodzenia roślinnego w profilaktyce i leczeniu cywilizacyjnych schorzeń cieszy się rosnącym zainteresowaniem. Biologicznie czynne związki pochodzenia roślinnego, o sprawdzonym i udowodnionym w badaniach klinicznych działaniu, są postrzegane nie tylko jako tańsza, ale przede wszystkim jako bezpieczniejsza dla zdrowia alternatywa lub uzupełnienie tradycyjnych, syntetycznych farmaceutyków. W dokumencie europejskich wytycznych dotyczących leczenia zaburzeń lipidowych wymienia się między innymi

konieczność zwiększenia spożycia błonnika, żywności funkcjonalnej wzbogaconej sterolami oraz stosowanie suplementów obniżających stężenie cholesterolu (m.in. czerwony fermentowany ryż). W licznych badaniach klinicznych i epidemiologicznych dowiedziono, że dieta będąca źródłem związków polifenolowych przyczynia się do zmniejszenia ryzyka występowania między innymi chorób układu sercowo-naczyniowego, otyłości, cukrzycy typu 2 i nowotworów. Szczególnie cennymi składnikami surowców roślinnych są substancje o właściwościach antyoksydacyjnych. Do głównych antyoksydantów roślinnych należą związki polifenolowe, które stanowią najbardziej rozpowszechnioną grupę związków przeciwutleniających w świecie roślin. Jednym ze źródeł polifenoli mogą być skórki granatowca stanowiące produkt uboczny przemysłu, zwłaszcza, że potwierdzono skuteczność ekstraktu ze skórek granatowca w ograniczaniu nasilenia poszczególnych komponent zespołu metabolicznego.

Zbadanie tego zagadnienia jest tematem recenzowanej rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lekarza weterynarii, lekarza medycyny Joanny Niewiadomskiej, pod tytułem „Analiza potencjału biologicznego ekstraktu polifenolowego ze skórek *Punica granatum* L. na szczurzym modelu zespołu metabolicznego”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa składa się z cyklu trzech powiązanych ze sobą tematycznie, opublikowanych w 2022 i 2023 roku prac naukowych. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Części rozprawy to streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wykaz publikacji, wstęp, bibliografia, cele pracy, cykl trzech publikacji, wnioski i podsumowanie. Całość liczy 90 stron. Cytowana literatura liczy 77 pozycji. Streszczenie zawiera jedną rycinę, wstęp zawiera jedną tabelę, w pierwszej pracy znajdują się 2 tabele, w drugiej pracy znajduje się 5 tabel i 8 rycin, w trzeciej pracy znajduje się 5 tabel i 7 rycin.

W wstępie Autorka w bardzo przystępny, ale bardzo szczegółowy sposób wprowadza czytelnika w temat zespołu metabolicznego, opisując jego kryteria rozpoznawcze, patofizjologię oraz zmiany zachodzące w układzie sercowo-naczyniowym obserwowane tym zespołem. Dodatkowo Autorka opisuje rolę związków polifenolowych w zespole metabolicznym oraz potencjał biologiczny związków polifenolowych uzyskiwanych ze skórek *Punica granatum* L. . Ze wstępu rozprawy w sposób jasny i oczywisty wynikają postawione przez Autorkę cele pracy.

Pierwsza praca z cyklu, która została opublikowana w 2022 roku na łamach czasopisma *Biology*, jest analizą baz bibliograficznych PubMed oraz ScienceDirect pod kątem występowania prac opisujących model zwierzęcy zespołu metabolicznego oraz wpływu biologicznego polifenoli na zespół metaboliczny. We wstępie Autorka w wyczerpujący sposób zajmuje się opisaniem zespołu metabolicznego jako poważnego problemu klinicznego współczesnego świata, wykazując się znaczną wiedzą zarówno w zakresie patofizjologii, jak i diagnostyki. Następnie Doktorantka dokładnie charakteryzuje modele zwierzęce używane do badania zespołu metabolicznego, również wykazując bardzo dużą wiedzę z tego tematu. Na koniec Autorka z dużą swobodą przedstawia całą listę związków polifenolowych obecnych w powszechnie używanych produktach jak czerwone wino, zielona herbata, kakao, owoc granatu i innych, opisując dokładnie jaki efekt metaboliczny i w jakim mechanizmie wywołują poszczególne substancje. Uwagę recenzenta zwróciła rzetelność analizy dużej ilości danych, bo aż 695 prac odnalezionych w bazach danych, czytelne przedstawienie uzyskanych wyników oraz wyraźna znajomość omawianego tematu.

Druga praca z cyklu, która została opublikowana w 2023 roku na łamach czasopisma *Journal of Veterinary Research* opisuje skład i zawartość polifenoli z ekstraktu otrzymywanego ze skórek *Punica granatum L.* oraz ich użycie vs. placebo w modelu zwierzęcym zespołu metabolicznego (szczury Zucker Diabetic Fatty) oraz w grupie kontrolnej. W trakcie 8 tygodni badania ekstrakt ze skórek *Punica granatum L.* podawano w dawce 100 mg/kg mc. oraz 200 mg/kg mc. Doktorantka nie obserwowała istotnych różnic w końcowej masie badanych osobników, profilu lipidowym oraz glikemicznym. Zaobserwowała natomiast tendencję do obniżenia tendencji do przyrostu masy ciała. W grupie predysponowanej do zespołu metabolicznego obserwowała niższą częstotliwość rytmu serca, większą objętość końcowo-rozkurczową lewej komory oraz poprawę frakcji skracania włókien środkowych lewej komory. Wyniki badania wskazują na bezpieczeństwo stosowanego ekstraktu ze skórek *Punica granatum L.* oraz możliwość jego korzystnego działania w zespole metabolicznym.

Trzecią publikacją z cyklu jest opublikowana w 2023 na łamach czasopisma *Antioxidants* praca będąca kontynuacją poprzedniego badania. Zwierzęta biorące udział w eksperymencie zostały poddane eutanazji i do dalszej analizy pobrano próbki krwi, mięśnia sercowego oraz fragmenty aorty. Autorka oceniała wpływ podawanych we wcześniejszej części badania polifenoli na stężenie wybranych biomarkerów stresu oksydacyjnego, biomarkerów niewydolności serca. Dodatkowo analizie histologicznej poddano pobrane próbki tkanek. Autorka zaobserwowała, że suplementacja ekstraktu ze skórek granatowca wiązała się z zależnym od dawki wzrostem stężenia grup tiolowych w homogenatach z mięśnia sercowego. Aplikacja 100 mg/kg mc. w porównaniu do 200 mg/kg mc. ekstraktu ze skórek granatowca wiązała się z istotną redukcją całkowitego stanu oksydacyjnego. Aktywność katalazy i transferazy-S glutationu były znamienne wyższe w grupie szczurów

predysponowanych do zespołu metabolicznego w odpowiedzi na niższą dawkę podawanego ekstraktu w porównaniu do grupy kontrolnej, podobnej tendencji nie obserwowano u szczurów otrzymujących wyższą dawkę ekstraktu ze skórek granatowca. Autorka nie zaobserwowała żadnego wpływu podawanego ekstraktu na poziom aktywności reduktazy glutationu, dysmutazy ponadtlenkowej, stężenie dialdehydu manolowego, jak również troponiny sercowej typu I, galektyny-3. Ocena histologiczna nie ujawniła toksycznego wpływu stosowanego ekstraktu. W bardzo interesującej dyskusji Autorka sprawnie omawia uzyskane przez siebie wyniki oraz w sposób bardzo przemyślany dyskutuje z wynikami innych publikacji z tego tematu. Wskazuje to na zdolność Autorki do, tak niezbędnego u każdego naukowca, krytycznego odniesienia się nie tylko do własnych wyników, ale również do prac opublikowanych w najbardziej renomowanych czasopismach. Tego czego zabrakło w dyskusji to może próby nieco dogłębnierzego wytłumaczenia: dlaczego wyższa dawka ekstraktu ze skórek granatowca nie wykazywała podobnie, korzystnych efektów jak niższa dawka. Logicznym wnioskiem z pracy jest wykazanie korzystnego wpływu związków polifenolowych ze skórek *Punica granatum* L. na potencjał oksydacyjno-redukcyjny miocardium.

Recenzowane prace w całości odpowiadają na cele badawcze postawione sobie przez Doktorantkę.

Pomimo wysokiej oceny przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej nasuwa się jeszcze kilka uwag i komentarzy:

1. W drugiej publikacji Autorka nie odnotowała wpływu stosowanego ekstraktu ze skórek granatowca na profil lipidowy i glikemiczny w badanych grupach. Moim zdaniem może to wynikać z podstawowego założenia eksperymentu – Autorka suplementując wysoko kaloryczną dietę promowała nadmierny przyrost masy ciała a w rezultacie potencjalny rozwój zespołu metabolicznego. Jedną z podstawowych interwencji w przypadku otyłości i zespołu metabolicznego jest zastosowanie diety niskokalorycznej i redukcja masy ciała a nie włączanie do leczenia preparatów mających wpłynąć na składowe zespołu metabolicznego. Pytanie czy Autorka nie rozważałaby powtórzenia eksperymentu i o jego potencjalnych wynikach, w następującym schemacie: promocja otyłości i zespołu metabolicznego a następnie, wdrożenie diety niskokalorycznej wraz z suplementacją badanego ekstraktu ze skórek granatowca vs. grupa kontrolna.
2. W trzeciej publikacji, komentarz co do schematu badania jest taki sam jak powyżej, uważam za bardzo interesujące powtórzenie badania wg zaproponowanego schematu. Dodatkowo zastanawiam się nad celowością badania poziomu cTNI oraz GAL-3, są to markery uszkodzenia komórek mięśniowych serca a ich poziom wzrasta w zaawansowanej niewydolności serca i innych

stanach doprowadzających do uszkodzenia miokardium. Z zespołem metabolicznym i otyłości ciężka objawowa niewydolność serca z obniżoną frakcją wyrzutową lewej komory zdarza się, ale raczej w przypadkach ekstremalnych otyłościach po wielu latach trwania choroby. W modelu, który stworzyła doktorantka spodziewałbym się raczej dyskretnych zaburzeń funkcji rozkurczowej lewej komory, zwłaszcza, że w 2 publikacji doktorantka opisuje prawidłową funkcję skurczową lewej komory u badanych zwierząt a nawet jej poprawę w grupie predysponowanej do zespołu metabolicznego. Mam, wobec tego pytanie do Doktorantki czy rozważała ocenę funkcji rozkurczowej w badanej grupie.

3. Na koniec kilka uwag, które nie mają charakteru merytorycznej krytyki, ale raczej charakter edytorski. Autorka nie ustrzegła się przed niewielkimi literówkami we wstępie swojej rozprawy doktorskiej np.: na stronie 14 czytamy „mediatorów” zamiast „mediatorów”, na tej samej stronie „istotę zespołu metabolicznego jest” zamiast „istotą zespołu metabolicznego jest” i kilka innych rozsypanych po całym wstępie. Czy też w streszczeniach publikacji np. w publikacji pierwszej słowo „falvonols” zamiast „flavonols” – (ktoś kto chciałby powtórzyć wyszukanie baz danych w identyczny sposób otrzymałby zapewne inne wyniki niż Autorka). Czy też błąd w nazwie czasopisma, w którym Autorka opublikowała swoją 2 publikację – „Journal of Veterinary Research” zamiast „Journal of Veterinary Research”.

Uwagi te w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej, obecność takich drobnych, ale łatwo zauważalnych i prostych od korekcji błędów psuje nieco odbiór całości, tak jak jeden fałszywy akord psuje odbiór pięknej symfonii.

Przedstawione powyżej uwagi i komentarze nie pomniejszają i nie podważają dużej wartości cyklu publikacji. W mojej ocenie jest to bardzo wartościowa rozprawa z oryginalnymi i unikatowymi wynikami. Badanie to wnosi istotny wkład do ciągle trudnego i aktualnego problemu postępowania w zespole metabolicznym.

Przedstawiona mi do recezji rozprawa doktorska spełnia wymagania ustawowe (art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce ustawy (jt. Dz.U.2023.742 ze zm.)) w związku z czym wnoszę do Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie lekarz weterynarii, lekarz medycyny Joanny Niewiadomskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z wyrazami szacunku

Tomasz Witkowski

