

Kraków 25-05-2019



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Ocena rozprawy doktorskiej

"Ocena wpływu WPC-80 na proces krzepnięcia krwi w modelu zakrzepicy  
szczurów"

wykonanej przez mgr lek. Annę Tokajuk  
na Wydziale Nauk o Zdrowiu  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Inspiracją do podjęcia badań naukowych przez doktorantkę **lek. med. Annę Tokajuk** była teza, opierająca się na koncepcji wywodzącej się już ze starożytności (Hipokratesa *Niech pożywienie będzie lekarstwem a lekarstwo pożywieniem*), że pożywienie nie tylko wpływa na dobrostan człowieka, ale przyczynia się do jego zdrowia lub choroby. Na przełomie XVIII i XIX wieku, francuski gastronom i filozof Jean Anthelme Brillat-Savarin, w swoim traktacie *Fizjologia smaku (Physiologie du goût, ou méditations de gastronomie transcendante)* napisał: *powiedz mi co jesz, a powiem ci kim jesteś*. Te słowa sprawdzają się z pewnością w kontekście badań nad fizjologią człowieka, począwszy od psychologii behawioralnej, a skończywszy na medycynie.

Żywność może być wykorzystywana jako środek wspomagający terapię, co współcześnie przerodziło się w koncepcję *żywności funkcjonalnej*. Rozwinięcie tej koncepcji, w oparciu o wiedzę z medycyny, farmakologii i fizjologii, przyczyniło się do wytyczenia nowych kierunków badań nad poznaniem mechanizmów, które są zaangażowane w regulację procesów metabolicznych uwarunkowanych dietą i wpływających na zdrowie.

Izolowane białka serwatkowe, a w tym koncentraty serwatki o różnym stężeniu białek, w przypadku badań prowadzonych do pracy doktorskiej doktorantki **lek. med. Anny Tokajuk**, były to koncentraty o udziale 80% białka serwatkowego (WPC-80, Mlekovita), są stosowane w różnych dietach funkcjonalnych, leczniczo w alergiach pokarmowych niemowląt, wspomagająco u osób obciążonych dużym wysiłkiem fizycznym (sportowcy). Zbadanie w pracy doktorskiej roli przeciwzakrzepowej i wspomagającej funkcję śródbłonna naczyniowego koncentratu WPC-80 było pomysłem nowatorskim, popartym wnikliwie przedstawioną analizą wyników dostępnych badań wskazujących na rolę peptydów pochodzenia serwatkowego ( $\alpha$ - $\beta$ -laktorfina, laktokinina i NOP-47) w regulacji aktywności enzymów, m. in. konwertazy angiotensyny (ACE) i syntazy tlenku azotu (NOS). Tym bardziej, że u sportowców zdarzają się powikłania zakrzepowo-zatorowe (ŻZ) na skutek urazów i intensywnego treningu.

Badanie aktywności przeciwzakrzepowej i naczynioprotekcyjnej przeprowadzono na modelu zakrzepicy żyłnej szczura (in vivo) i modelu izolowanej

Instytut Fizyki  
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Lucja Stepień  
dr hab. n. med. prof. UJ  
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40  
bezp. 12 664 47 62  
ul. Łojasiewicza 11  
30-348 Kraków

aorty szczura (ex vivo). Badania wykonano na samcach szczurów rasy Wistar-Crl:WI (Han), model zakrzepicy uzyskano poprzez podwiązanie żyły głównej dolnej na 1 godzinę (porównaniu do warunków kontrolnych), po czym wykonano preparatykę aorty głównej i wykonano podstawowe badania funkcji skurczowo-rozkurczowej śródbłonna z klasycznymi inhibitorami NOS (L-NAME), COX (indometacyna) i nieselektywnym blokerem kanałów potasowych zależnych od wapnia (TEA). Preparat WPC-80 był podawany zwierzętom dożołądkowo w 2 dawkach 0,3 lub 0,5 g/kg masy ciała przez 7, 14 lub 21 dni. Poza badaniami czynnościowymi aorty wykonano analizę immunohistochemiczną i mikroskopową naczyń (vWF), badania laboratoryjne czynności układu krzepnięcia (TT, aPTT, INR), stężenia fibrynogenu i liczby płytek. Brak niestety parametrów określających funkcje fibrynolityczne, takich jak PAI, uPA, czy podstawowe D-dimery.

Rozprawa doktorska ma charakter zastawu złożonych 3 publikacji, w tym 2 publikacji doświadczalnych i jednej pracy przeglądowej o łącznym współczynniku oddziaływania IF 5,662. Publikacja zatytułowana *Dysfunction of aorta is prevented by whey protein concentrate-80 in venous thrombosis-induced rats*, ukazała się w prestiżowym czasopiśmie *Journal of Functional Foods* (IF=3,144, MNISW =45,0), gdzie doktorantka jest pierwszym autorem, a udział własny autorki określony w załączonych oświadczeniach wynosi 62%. Pozostałe 2 publikacje: doświadczalna *Whey protein concentrate limits venous thrombosis in rats (Appl Physiol Nutr Metab)* i przeglądowa *Terapeutyczne właściwości białek serwatkowe w wybranych patologich* (praca zbiorowa w *Holistyczny wymiar współczesnej medycyny*) stanowią po 70% udziału autorki, także pierwsze autorstwo w tych pracach.

Układ pracy stanowią rozdziały zawierające odpowiednio: wykaz publikacji, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, omówienie prac, złączone publikacji, podsumowania, wnioski, streszczenie spis piśmiennictwa i złączone informacje o charakterze udziału współautorów z oświadczeniami.

Wstęp jest krótki, treściwy i merytoryczny. Jednak doktorantka nie uniknęła w nim pułapki powtórzeń tych samych informacji zawartych w złączonych publikacjach. Brakuje mi we wstępie informacji na temat epidemiologii ŻChZZ w Polsce i statystyk dotyczących skuteczności leczenia. Jeśli chodzi o czynniki ryzyka, to jednym z podstawowych czynników jest wrodzona lub nabyta predyspozycja określona mianem trombofilii, to powinno być wyjaśnione. Brakuje też choćby niewielkiego fragmentu na temat dysfunkcji śródbłonna w ŻChZZ.

Cel pracy jasny i zdefiniowany ogólnie. Poparty został celami szczegółowymi, które zostały zrealizowane w postaci zadań wykonanych przez doktorantkę w pracach doświadczalnych.

Metodyka badań dobrana odpowiednio do wyznaczonego celu. Badania wykonano na modelu zwierzęcym, co jest niewątpliwie ogromną zaletą pracy. Moje uznanie wzbudziła szczególnie metoda dożołądkowego skarmiania



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Instytut Fizyki  
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień  
dr hab. n. med. prof. UJ  
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40  
bezp. 12 664 47 62  
ul. Łojasiewicza 11  
30-348 Kraków

szczurów preparatem WPC-80. Załączono również szczegółowa charakterystykę stosowanego preparatu, pod kątem zawartości aminokwasów, białek, ale także ilościową zawartością kwasów tłuszczowych w preparacie, które mają niewątpliwą rolę w metabolizmie prostanoidów i leukotrienów. Wykonane badania i analizy zrobiono prawidłowo, choć brakuje mi w nich na przykład badań oceny funkcji układu fibrynolizy, tak ważnego przy ocenie ryzyka ŻChZZ, oraz oceny stężenia produktów rozpadu fibryny. Ocenę funkcji fibrynolitycznych dopełnia analiza masy wytworzonego skrzepu. Byłoby bardzo ciekawe, gdyby udało się ocenić wpływ diety wysokobiałkowej na stężenie D-dimerów, co do tej pory w badaniach klinicznych i epidemiologicznych nie zostało zrobione. Jedyna praca jaka się do tej pory ukazała to wynik badania MOLI-SANI (na ponad 17 tys. uczestników) opublikowanego czasopiśmie *Haematologica* (2017 Feb; 102(2): e61–e64.) w którym pokazano, że dieta śródziemnomorska sprzyja obniżeniu stężenia D-dimerów w krwi w populacji ogólnej.

Wyniki uzyskane przez doktorantkę, z jednej strony zaskakują poprzez tak wymierny efekt poprawiający rozkurczową czynność aorty w odpowiedzi na fenylefrynę, w modelu indukowanej ŻŻ u szczura i braku tego efektu „protekcijnego” i szczurów kontrolnych. Co jednak nie dziwi, w porównaniu do morfologii naczyń u szczurów skarmianych WPC-80; budowa naczyń była prawidłowa a wywołane ŻŻ zmiany dotyczyły funkcji naczyń (reaktywność vWF). W tym kontekście wynik zwiększonej immunoreaktywności dla kanałów potasowych (KCNN4) wydaje się być trudny do interpretacji.

Wyniki badań oceny funkcji układu krzepnięcia nie pokazały jednoznacznej i istotnie statystycznej zmiany w czasach krzepnięcia, co nie zaskakuje. Wszak rolą skomplikowanego systemu czynników układu hemostazy jest utrzymanie równowagi zapobiegającej zarówno nadmiernemu wykrzepianiu jak i nadmiernym krwawieniom. Stąd wykonanie oznaczeń stężeń produktów rozpadu fibryny, lub innych parametrów fibrynolizy byłoby dopełnieniem opisu tego zjawiska. Brakuje też w dyskusji ustosunkowania się do tego. Dopełnieniem oceny hemostazy jest na pewno analiza masy uformowanego skrzepu. W swoich badaniach doktorantka zaobserwowała znaczący spadek masy skrzepu u szczurów skarmianych preparatem WPC-80 w każdej dawce i każdym punkcie czasowym. Zaskoczeniem dla mnie jako badacza hemostazy było istotne statystycznie obniżenie liczby płytek krwi u szczurów skarmianych WPC-80 w stosunku do kontroli. Zjawisko to dotyczyło zwierząt z ŻŻ jak i bez ŻŻ, i tylko w grupie zwierząt skarmianych najwyższą dawką preparatu w ilości 0,5g/kg masy ciała. Czyżby to był jakiś związek z podażą białka? Czy może jakiś inny mechanizm? Dobrze byłoby ocenić funkcję nerek po 3 tygodniowym okresie diety, czy nadal była zachowana w normie? Innym niewyjaśnionym dla mnie zagadnieniem, które zapewne wymagałoby dalszych badań jest odpowiedź na pytanie, czy dieta z udziałem WPC-80 powoduje wzrost stężenia peptydów o działaniu naczynioprotekcyjnym w krwi, takich jak  $\alpha$ - i  $\beta$ -laktorfina czy laktokinina?

Całość przedstawionych wyników rozprawy doktorskiej dopełnia podsumowanie.



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Instytut Fizyki  
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Lucja Stępień  
dr hab. n. med. prof. UJ  
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40  
bezp. 12 664 47 62  
ul. Łojasiewicza 11  
30-348 Kraków

Wnioski uzyskane w wyniku badań przeprowadzonych przez doktorantkę **lek. med. Annę Tokajuk** konkludują najważniejsze osiągnięcie zaprezentowane w rozprawie, że koncentrat białek serwatkowych WPC-80 ma działanie protekcyjne na śródbłonek naczyniowy oraz wykazuje działanie przeciwzakrzepowe.

Poza osiągnięciem naukowym jakim jest rozprawa doktorska, doktorantka jest współautorem 6 prac nie włączonych do rozprawy doktorskiej o łącznym współczynniku oddziaływania  $IF=7,02$  oraz jednego streszczenie zjazdowego.

W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie doktorantki **lek. med. Anny Tokajuk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych, dyscyplina medycyna, w myśl obowiązującej ustawy.

Dr hab. n. med. Ewa Łucja Stępień



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Instytut Fizyki  
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień  
dr hab. n. med. prof. UJ  
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40  
bezp. 12 664 47 62  
ul. Łojasiewicza 11  
30-348 Kraków