

Prof dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek
Politechnika Gdańska
Katedra Chemii, Technologii
i Biotechnologii Żywności

ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk
tel: 58 347 17 23
fax: 58 347 22 48
e-mail: agnieszka.bartoszek@pg.edu.pl



Gdańsk, 29 listopada 2021

Ocena rozprawy doktorskiej
mgr inż. Domniki Kajszcak

pt. **“Bioaktywne związki kaliny koralowej i ich potencjał prozdrowotny”**

Bioaktywne fitozwiązki występujące w roślinach jadalnych stały się w XXI wieku obiektem zainteresowania już nie tylko nauk o żywności i żywieniu, ale także nauk o zdrowiu. Przyczyniło się do tego z jednej strony wskazanie stresu oksydacyjnego i reaktywnych form tlenu jako czynników sprzyjających rozwojowi nieinfekcyjnych chorób przewlekłych, często określanym mianem “cywilizacyjnych”, a z drugiej udokumentowanie przeciwutleniających właściwości wielu roślinnych wtórnych metabolitów. Rola przeciwutleniaczy w różnych aspektach funkcjonowania ludzkiego organizmu zwróciła uwagę badaczy pod koniec ubiegłego wieku i nadal cieszy się niesłabnącym zainteresowaniem, choć z czasem szkodliwość stresu oksydacyjnego została zastąpiona koniecznością zachowania homeostazy redoksowej organizmu. Rosnące zrozumienie fizjologicznego znaczenia reaktywnych form tlenu w dobrostanie człowieka spowodowało, że antyoksydanty w żywności z substancji istotnych tylko technologicznie, np. w ochronie przed utlenieniem nienasyconych kwasów tłuszczowych w przemyśle tłuszczowym, stały się substancjami postrzeganymi jako ważne zdrowotnie regulatory wspomnianej homeostazy redoksowej. Badania nad przeciwutleniaczami pochodzenia roślinnego jednocześnie pokazały ich wielokierunkowe działanie biologiczne, już nie tylko powiązane z ich redoksoowymi własnościami. Ta nowa rola przeciwutleniaczy budzi żywe zainteresowanie przemysłu żywnościowego, w tym producentów żywności funkcjonalnej i suplementów diety, oraz farmaceutycznego. Zapotrzebowanie przemysłu na bioaktywne związki fitochemiczne zapoczątkowało też poszukiwania nowych źródeł roślinnych antyoksydantów, któremu to

celowi mogą służyć także badania dotyczące kaliny koralowej przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej Pani mgr inż. Dominiki Kajszczyk.

Praca doktorska została zrealizowana na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Promotor pracy, dr hab. inż. Anna Podsędek, jest znaną specjalistką w dziedzinie analityki substancji fitochemicznych i oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej substancji pochodzenia roślinnego. Celem podjętych badań było oznaczenie składu i zawartości pierwotnych i wtórnych metabolitów, ze szczególnym uwzględnieniem związków polifenolowych, i powiązanie oznaczeń chemicznych z potencjalnym zdrowotnym działaniem ekstraktów z owoców, kwiatów i kory kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.). Doktorantka wykorzystwała do tego celu dostępne handlowo susze, co umożliwiła szybkie przeniesienie wyników badań do praktycznego wykorzystania, a skupiła się na aktywnościach przeciwcukrzycowych i przeciwotyłościowych - bołaczce dla rosnącej lawinowo części społeczeństwa.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera 215 stron. Na dysertację składają się następujące rozdziały: Wstęp teoretyczny (9 bloków tematycznych), Cel pracy, Część eksperymentalna obejmująca Materiały i Metody, Wyniki badań i ich omówienie, Dyskusja i Wnioski końcowe oraz listę cytowanych publikacji obejmującą 287 pozycji (rozdział Literatura). Ponadto na początku pracy umieszczono dorobek publikacyjny Doktorantki, bardzo znaczący jak na wczesny etap kariery naukowej, a na końcu spisy używanych skrótów, tabel i rysunków.

Część teoretyczna rozprawy jest bardzo wyczerpującym przeglądem literatury dotyczącej kaliny koralowej. Zawiera ona trzy główne wątki ściśle powiązane z tematyką pracy. Pierwszy to opis botaniczny kaliny koralowej i jej praktyczne wykorzystanie na świecie. Przedmiotem drugiego jest skład chemiczny różnych części tej rośliny, ze szczególnym uwzględnieniem składu bioaktywnych fitozwiązków oraz potencjału antyoksydacyjnego. Trzeci wątek obejmuje przegląd literatury dotyczącej działania chemoprewencyjnego kaliny koralowej wskazujący na jej użyteczność w profilaktyce cukrzycy, przeciwdziałaniu otyłości, aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwzapalnej, a także potencjanego wspomaganie w kontroli chorób sercowo-naczyniowych i nowotworowych. Wszystkie wspomniane tematy są omówione na poziomie rozszerzonym, wyczerpująco, ale też wskazując na braki w obecnej wiedzy, a kompetencje Doktorantki budzą szacunek dla ugruntowanej znajomości przedmiotu badań i umiejętności klarownego opisu często złożonych zjawisk. Z obowiązku recenzenta zwrócę tylko uwagę na niekonsekwentną prezentację wzorów strukturalnych głównych składników bioaktywnych (Rysunek 5), gdzie fragmenty sacharydowe zostały przez Doktorantkę narysowane w 5-ciu wariantach graficznych, co szczególnie dla niechemików może być trudne do rozszyfrowania. Drugie potknięcie, to też niekonsekwencja, tym razem w nazewnictwie chemicznym prostej grupy lipidów, a mianowicie triacylogliceroli. Pojawił się tu pewien bałagan: niepotrzebnie

wymiennie stosowana jest nazwa trójglicerydy (np. str. 37) i triacyloglicerole (np. rys. 7, str. 37), ale także triacyloglicerydy (str. 21), a na str. 38 znalazły się jednocześnie triacyloglicerole, triglicerydy i "akumulacja triacyloglicerolu". To bardzo ważne, by przestrzegać prawidłowego nazewnictwa chemicznego, już bez dodatkowych ingerencji jest ono wystarczająco trudne, a błędnie zastosowane po prostu wprowadza w błąd.

Cel pracy został bardzo precyzyjnie przedstawiony. Zrozumiałe jest, że zamiar Doktorantki to charakteryzacja chemiczna ekstraktów z handlowo dostępnych suszy różnych części morfologicznych kaliny koralowej (owoce, kwiaty, kora) i odniesienie składu do potencjalnego działania biologicznego. Aktywności śledzone to działanie przeciwutleniające, przeciwcukrzycowe i przeciwołyściowe oceniane na podstawie testów w modelach bezkomórkowych, czyli metodami chemicznymi i biochemicznymi, także po poddaniu wybranych ekstraktów symulowanemu trawieniu w sztucznym układzie pokarmowym. Od razu dodam w tym miejscu, że wszystkie założone badania i cele zostały zrealizowane dostarczając nowej wiedzy i zwracając uwagę na niewykorzystany potencjał chemoprewencyjny kaliny koralowej.

Kolejny rozdział poświęcony jest omówieniu procedur eksperymentalnych, bardzo licznych, bowiem zakres prac przewidzianych przez Doktorantkę bez przesady można nazwać imponującym. Ten rozdział jest bardzo szczegółowo napisany, z łatwością można by było powtórzyć przeprowadzone pomiary, wykorzystać opisy metod do analizy frakcji polifenoli czy innych metabolitów lub oceny uwzględnionych aktywności dla dowolnych ekstraktów roślinnych. Opisy metod zawierają wszystkie szczegóły ważne dla powtórzenia oznaczeń przez inną osobę. Ten rozdział także niejako pośrednio dostarcza informacji nie tylko o zakresie wykonanych oznaczeń, ale też ich rzetelności i kompetencjach Doktorantki. W moim przypadku, jeszcze przed przystąpieniem do zapoznania się z częścią wynikową pracy, Doktorantka już na tej podstawie zapewniła sobie bardzo duży kredyt zaufania. Ale Recenzent ma ten obowiązek skłonić autora dysertacji do ponownego spojrzenia na swoje dokonania. W przypadku metod i co za tym idzie interpretacji uzyskiwanych wyników mam dwie wątpliwości. Pierwsza to metoda Folina-Ciocalteu jako pozwalająca na oznaczenie całkowitej zawartości związków fenolowych. To szeroko choć dość bezkrytycznie stosowane podejście można uznać za w miarę wiarygodne dla roztworów nie zawierających takich substancji jak białka i inne związki azotowe czy witamina C (tej akurat nie stwierdzono w badanych ekstraktach), bo one również reagują z kompleksem wolframowo-fenolowym do niebiesko zabarwionych pochodnych. Czy w przypadku zaawansowanych analiz związków fenolowych jak te prowadzone w ramach omawianych badań ma w ogóle sens zastosowanie wspomnianego zgrubnego testu? Jakie korzyści dostrzega tu Doktorantka? Drugi przypadek gdzie interpretacja wyników musi być bardziej krytyczna to test ORAC. Tu podstawą oceny aktywności przeciwutleniającej jest natężenie emisji fal o długości 520 nm. Jest to jednak długość fali absorpcji dla czerwonych substancji (np. antocyjanów, ale też innych barwnych

substancji), które absorbując światło emitowane wpływają na wynik oceny aktywności przeciwutleniającej w sposób zależny od ich stężenia. Czy to zjawisko nie było przyczyną, że wyniki uzyskane testem ORAC dla ekstraktu owoców kaliny koralowej (np. Tabela 18 i szeregi na str. 107)) były niezgodne z pozostałymi zastosowanymi metodami oceny potencjału antyoksydacyjnego badanych ekstraktów?

Rozdziały rozprawy poświęcone prezentacji i omówieniu wyników (Rozdział 4) są przygotowane niezwykle starannie. Wyniki zebrane w tabelach i zilustrowane na wykresach z łatwością można prześledzić. Staranność Doktorantki jest tu najwyższej próby. Zgodnie z logiką przed przystąpieniem do omówienia badań nas bioaktywnościami omówiony został bardzo szczegółowo skład przygotowanych ekstraktów ze wspomnianych suszy kaliny koralowej (Podrozdziały 4.1 i 4.2). Trochę mnie zaskoczyło, że po tym omówieniu pojawił się podrozdział porównujący wpływ różnych podejść ekstrakcyjnych na wyniki oznaczeń. Spodziewałabym się tych informacji w pierwszej kolejności. Muszę podkreślić ogrom pracy analitycznej i wysoką jakość uzyskanych wyników, to znakomita podstawa do dalszych rozważań korelujących chemię z biologią. Dodatkowymi, opisanymi w dalszych częściach pracy, doświadczeniami również wykorzystującymi metody analityczne jest ocena wpływu trawienia w symulowanym *in vitro* układzie pokarmowym na skład substancji bioaktywnych w wybranych ekstraktach. Są to bardzo ważne obserwacje wskazujące na kluczowe znaczenie procesów trawienia dla potencjalnego działania biologicznego pokarmów roślinnych. Doktorantka o tym nie wspomina w rozprawie, ale czy może są znane prace, które pokazują jak obecność rzeczywistego pokarmu angażującego enzymy trawienne wpływa na przemiany bioaktywnych fitozwiązków, których stężenie w treści pokarmowej jest dużo niższe od podstawowych substancji odżywczych. Czy może mają w takich warunkach większe szanse na uniknięcie degradacji?

Przechodząc do badań biochemicznych, Doktorantka wykorzystała szereg oznaczeń, przede wszystkim nad wpływem badanych ekstraktów i wzorcowych substancji, w tym leków, na aktywność enzymów kluczowych w metabolizmie polisacharydów i triacylogliceroli. Uważa się, że hamowanie ich aktywności w jelicie spowalnia przyswajanie glukozy i kwasów tłuszczowych opóźniając przyswajanie, co może przyczyniać się do zmniejszenia zagrożenia cukrzycą i otyłością. Sposób przeprowadzenia tych oznaczeń i ocena stopnia inhibicji procesów enzymatycznych może być uznany za prawidłowo przeprowadzony i wskazuje na wyjątkowo obiecującą aktywność prewencyjną badanych ekstraktów z kaliny koralowej. To co jednak budzi wątpliwości to sposób określenia typu inhibicji z wykorzystaniem modyfikacji modelu Michaelisa-Menten przez Linweavera i Burka. Równanie Michaelisa zostało wyprowadzone na podstawie założenia, że substrat i enzym w pierwszym etapie reakcji enzymatycznej tworzą kompleks enzym-substrat. A zatem ważna jest liczba cząsteczek substratu a nie ich masa. Stąd też we wszystkich przeliczeniach stosowane musi być stężenie molowe, a nie wagowe. Wskazuje na to nawet symbol $[S]$ dla

przeliczeniach stosowane musi być stężenie molowe, a nie wagowe. Wskazuje na to nawet symbol [S] dla stężenia substratu - nawias kwadratowy jest zarezerwowany do oznaczania stężenia molowego. Być może taka korekta nie wpłynie na końcowe wnioski, ale wszystkie załączone w rozprawie wykresy Linweavera-Burka wymagają przeliczenia. Generalnie, przy oznaczeniach enzymatycznych bezpieczniej jest trzymać się stężeń molowych o ile to tylko możliwe. Jest to jedyne większe potknięcie Doktorantki, którego na pewno w przyszłości już będzie unikać, a które pozwoliło recenzentowi się wykazać. Poza tym przedstawiona praca jest na bardzo wysokim poziomie merytorycznym, niezwykle obszerna i wnikliwa, a także starannie przygotowana pod względem redakcyjnym. Usterki językowe są przy tak dużych opracowaniach nieuniknione. Ze względu na wieloletnie doświadczenie edytorskie trudno mi ich nie zauważać, ale w tym przypadku mogę jedynie polemizować z "formowaniem końcowych produktów glikacji" i zachęcałabym do stosowania alternatywnych określeń "tworzenie" czy "powstawanie" też zresztą występujących w rozprawie. Jestem pełna uznania.

Podsumowując, recenzowana praca zarówno pod względem koncepcji, wykorzystanego warsztatu badawczego, uzyskanych wyników dostarcza zarówno całkiem nowych, jak i uzupełniających obecny stan wiedzy pogłębionych, rzetelnych informacji na temat składu kaliny koralowej i zawartości substancji o conajmniej wstępnie zweryfikowanym potencjale prozdrowotnym. Przeprowadzone badania wskazują, że kalina koralowa mogłaby stanowić źródło substancji znacząco podnoszących jakość zdrowotną żywności lub suplementów diety, może także preparatów zielarskich i farmaceutycznych.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa pt. "Bioaktywne związki kaliny koralowej i ich potencjał prozdrowotny" spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia, przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule Naukowym w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. nr 65, poz 595) z późniejszymi zmianami (Dz. U./z 2017 r., poz 1789) i przedstawiam Radzie ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Dominiki Kajszcak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, doceniając zakres i analityczną wartość pracy, wysoką jakość oznaczeń biochemicznych oraz fakt, że obiektem był stosunkowo mało zbadany materiał roślinny, który dzięki uzyskanej wiedzy jest być może bliższy wykorzystania w chemoprewencji chorób metabolicznych, a także wzięwszy pod uwagę dorobek publikacyjny Doktorantki wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Dominiki Kajszcak.

Agnieszka Pastorek

Prof dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek
Politechnika Gdańska
Katedra Chemii, Technologii
i Biotechnologii Żywności

ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk
tel: 58 347 17 23
fax: 58 347 22 48
e-mail: agnieszka.bartoszek@pg.edu.pl



Gdańsk, 29 listopada 2021

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

mgr inż. Dominiki Kajszcak

pt. "Bioaktywne związki kaliny koralowej i ich potencjał prozdrowotny"

Przedstawiona do recenzji rozprawa pt. "Bioaktywne związki kaliny koralowej i ich potencjał prozdrowotny" nie tylko spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, ale znacząco wykracza poza podstawowe oczekiwania, dlatego przedstawiam Radzie ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr inż. Dominiki Kajszcak. Wysoko oceniam zakres i analityczną wartość pracy, jakość oznaczeń biochemicznych oraz fakt, że obiektem był stosunkowo mało zbadany materiał roślinny, który dzięki uzyskanej wiedzy jest być może bliższy wykorzystania w chemoprewencji chorób metabolicznych. Dodatkowym argumentem jest bardzo znaczący dorobek publikacyjny Doktorantki. Dlatego uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Dominiki Kajszcak zasługuje na wyróżnienie.

