

Prof. dr hab. inż. Iwona Konopka
Katedra Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Niny Pietrzyk

**pt. „Wpływ składników owoców *Viburnum opulus* na metabolizm lipidów –
badania *in vitro*”**

**wykonanej pod kierunkiem promotora - dr hab. inż. Anny Podsędek
oraz promotora pomocniczego - dr inż. Małgorzaty Zakłós-Szyda
z Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej**

Podstawa prawna

Recenzję przygotowano na zlecenie Pani dr hab. inż. Anny Diowkszej, prof. uczelni, Dziekana Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, po wyznaczeniu mojej osoby na recenzenta przez Radę ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia (Uchwała nr 57/2021). Przewód doktorski został wszczęty 16.04.2019 r., na podstawie Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) oraz rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. (w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu naukowego (Dz.U. z 2018 r. poz. 261) i przeprowadzany jest w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie technologia żywności i żywienia (art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669).

Ocena formalna rozprawy

Pani mgr inż. Nina Pietrzyk przedstawiła rozprawę doktorską w formie monografii. Rozprawa liczy łącznie 222 strony, w tym wstęp teoretyczny przedstawiono na 40 stronach, część doświadczalną na 27 stronach, wyniki badań na 70 stronach, a ich dyskusję na 31 stronach. Dodatkowo rozprawa zawiera streszczenia (łącznie 6 stron streszczenia w języku polskim i angielskim), cel pracy (2 strony), podsumowanie i wnioski końcowe

(3 strony), wykaz stosowanych skrótów (4 strony), spis tabel (2 strony), spis rysunków (5 stron) oraz podziękowania, wykaz opublikowanych prac, zawierających część wyników ocenianej rozprawy, wykaz referatów na konferencjach oraz stronę tytułową w języku polskim. Doktorantka opracowała łącznie 18 tabel oraz 76 rysunków. Do przygotowania uzasadnienia tematu badań, wyboru metod analitycznych oraz dyskusji wyników badań wykorzystwała imponującą liczbę 440 źródeł naukowych, w tym 303 zacytowane publikacje powstały w ostatnich 10 latach oraz 32 publikacje z lat 2020 i 2021. Tekst i dokumentacja pracy są starannie przygotowane (stwierdzono tylko nieliczne błędy edycyjne, np. masy cząsteczkowe na stronach 105, 117, 118). Formalną zaletą pracy są w szczególności czytelne schematy procesów/proponowanych modyfikacji szlaków metabolicznych przygotowane w programie BioRender.

W kontekście oceny formalnej stwierdzam, że rozprawa ma prawidłową strukturę oraz proporcje rozdziałów dla pracy w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Praca doktorska została wykonana w ramach dofinansowania projektu „Nowego programu studiów doktoranckich na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej” POWER.03.02.00-00-I023/16 Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój, NCBiR oraz w ramach grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki OPUS 2016/23/B/NZ9/03629, pod kierownictwem dr hab. inż. Anny Podsędek.

Ocena istotności tematu badań w dyscyplinie technologia żywności i żywienia

Doktorantka podjęła się trudu oszacowania zdolności przygotowanych samodzielnie preparatów z owoców kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) do ograniczania niekorzystnych skutków nadwagi i otyłości. Otyłość jest uznana za jedną z chorób cywilizacyjnych XXI wieku. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) mówi o epidemii - na świecie co roku z powodu chorób powiązanych z otyłością i nadwagą umiera kilka milionów ludzi. Eksperti szacują, że w roku 2025 co czwarta osoba na świecie (2,7 mld ludzi) może cierpieć z powodu nadwagi lub otyłości (<https://www.gov.pl/web/wsse-warszawa/24-pazdziernika--dzien-walki-z-otyloscia>).

Nadmierną masę ciała w Polsce ma aktualnie 65,7% mężczyzn i 45,9% kobiet, a otyłość występuje u 15,4% mężczyzn i 15,2% kobiet, natomiast otyłość olbrzymia (BMI 40,0 kg/m² lub więcej) u 0,5% mężczyzn i 0,4% kobiet (<https://www.gov.pl/web/zdrowie/program-kompleksowej-opieki-medycznej-dla-chorych-na-otylosc-olbrzymia-leczona-chirurgicznie>).

Sprawą poważnie zainteresowało się w Polsce Ministerstwo Zdrowia, gdyż 12 sierpnia 2021 r. ogłoszono rozporządzenie w sprawie programu pilotażowego dotyczącego kompleksowej opieki specjalistycznej nad osobami leczonymi z powodu otyłości olbrzymiej KOS-BAR (Dz.U. 2021 poz. 1622). Z programu realizowanego w 15 placówkach ochrony zdrowia skorzystać będą mogły osoby od 18 roku życia, których wskaźnik BMI wynosi 35 lub więcej.

WHO uznała otyłość za najgroźniejszą chorobę przewlekłą. Nieleczona prowadzi do rozwoju chorób układu krążenia, cukrzycy typu 2, niealkoholowego stłuszczenia wątroby, zespołu metabolicznego, zaburzeń hormonalnych, zwiększa ryzyko zachorowań na niektóre nowotwory (trzustki, nerek, jelita grubego, prostaty czy raka piersi). Jest przyczyną zwyrodnienia całego układu kostno-stawowego czy nadciśnienia i miażdżycy. U osoby

z poważną nadwagą wzrasta także ryzyko wystąpienia udaru mózgu oraz zawału serca (<https://www.hindawi.com/journals/jobc/2020/6134362/>). Chociaż czynniki genetyczne są istotną składową ryzyka, to jednak główną przyczyną narastania problemu nadwagi i otyłości jest dodatni bilans energetyczny przyjmowanych i wydatkowanych kalorii. Sprzyja temu wysokokaloryczna, rafinowana żywność, zasobna w cukry proste i tłuszcze z kwasami nasyconymi i jednonienasyconymi. Negatywne skutki takiej diety potęguje ograniczona aktywność fizyczna.

W kontekście tak ważnych zdrowotnie i społecznie skutków otyłości i nadwagi każde działanie profilaktyczne, ograniczające możliwość progresji choroby i zakres jej skutków jest ważne naukowo. Tego ambitnego zadania podjęła się w swojej rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Nina Pietrzyk. Tematyka badań wpisuje się w zakres dyscypliny technologia żywności i żywienia, ale Doktorantka wykorzystała w części doświadczalnej również zaawansowane narzędzia analityczne z zakresu biologii molekularnej i komórkowej.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej

We **wstępie teoretycznym** Doktorantka dokonała starannego opisu epidemiologii i patogenezy problemu otyłości, przedstawiła dane naukowe nt. gospodarki lipidami pochodzącymi z diety w wątrobie i mięśniach (transport komórkowy, utlenianie kwasów tłuszczowych) oraz interakcyjny wpływ glukozy (wychwyt glukozy, procesy glikolizy i syntezy glikogenu oraz glikogenolizy i glukoneogenezy). W tej części rozprawy Pani mgr inż. Nina Pietrzyk omówiła również mechanizm lipogenezy *de novo* w komórkach wątroby, w tym czynniki regulatorowe procesu lipogenezy, wpływ procesu lipogenezy w generowaniu syndromu metabolicznego i rolę kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) w regulacji metabolizmu lipidów i glukozy. Doktorantka przedstawiła ponadto informacje na temat roli tkanki tłuszczowej w rozwoju lipotoksyczności. Tę część rozprawy kończy przedstawienie możliwości leczenia farmakologicznego otyłości i NAFLD oraz wykorzystanie ekstraktów i związków pochodzenia roślinnego z owoców, korzeni i liści, w tym szczególnie frakcji polifenolowej, do zmian w metabolizmie lipidów. Dla wybranych grup surowców przedstawiła charakterystyczne dla nich związki fenolowe, takie jak kwasy fenolowe, flawonoidy (w tym flawanole, flawonole, flawony, flawanony i antocyjany), stilbeny, lignany i polimery tanin oraz przedstawiła zasadność stosowania linii komórkowych do badania zmian metabolizmu komórkowego pod wpływem związków fenolowych. Doktorantka jest w tym zakresie świadoma, że badania na liniach komórkowych mają jednak swoje ograniczenia, gdyż nie uwzględniają biodostępności składników z ekstraktów roślinnych, ich biotransformacji ani wpływu mikroflory jelitowej na ich metabolizm.

Za **cel pracy** Doktorantka przyjęła, cyt. „określenie wpływu preparatów uzyskanych z owoców *V. opulus* L. na metabolizm lipidów w zakresie ich cytoprotekcyjnego działania względem indukowanego stłuszczenia komórek hepatocytów linii HepG2 oraz komórek mioblastów linii L6. Celem powiązania potencjalnej aktywności biologicznej preparatów istotne było określenie składu jakościowego i ilościowego związków fenolowych w stosowanych preparatach”. Cel został jasno określony i zrealizowany w postaci 8 zadań

szczegółowych. W tym punkcie pracy proponowałabym inną kolejność zadań szczegółowych, identyczną z zastosowaną w omówieniu wyników.

W **części doświadczalnej** rozprawy Doktorantka szczegółowo opisała zastosowane materiały (pochodzenie owoców kaliny koralowej, linii ludzkich hepatocytów HepG2 i szczurzych mioblastów L6), odczynniki i materiały do analiz SDS-PAGE, Western blottingu, symulowanego trawienia, analizy UPLC-PDA-Q/TOF MS, złoża i kolumny chromatograficzne, zastosowane komercyjne testy, aparaturę oraz wykorzystane do badań i przygotowania rozprawy programy komputerowe oraz narzędzie do sporządzania ilustracji naukowych BioRender. W kolejnych punktach przedstawiony jest opis wszystkich zastosowanych metodyk badawczych, począwszy od sposobu otrzymania czterech preparatów kaliny (sok świeży, preparat soku oczyszczonego, dwa ekstrakty z wytlóków), etapu frakcjonowania preparatu soku oczyszczonego na kolumnie Sephadex LH-20 na pięć frakcji, symulowanego trawienia soku świeżego i preparatu soku oczyszczonego (kolejne dwie frakcje, tzw. IN i OUT dla każdego preparatu po zastosowaniu membrany celulozowej o wielkości odcięcia 12 kDa). Doktorantka wyczerpująco opisała wszystkie zastosowane techniki analityczne, w tym chromatograficzne UPLC-PDA-Q/TOF MS, test ORAC, procedury hodowli HepG2 i L6 oraz ich zastosowanie do oceny cytotoksyczności przez preparaty kaliny, test CAA do określenia aktywności antyoksydacyjnej w układzie biologicznym, wykorzystanie czerwieni nilowej (Nile red) do określenia akumulacji lipidów, barwnika DAPI do obserwacji jąder komórkowych, testu wychwytu wolnych kwasów tłuszczowych, testu wewnątrzkomórkowego poziomu ATP, oceny potencjału błony mitochondrialnej z użyciem barwnika JC-1, oceny stopnia permeabilizacji błony komórkowej, oznaczenia pobierania i uwalniania glukozy i poziomu glikogenu. Bardzo ważnym narzędziem badawczym były analizy poziomu wybranych białek komórek, takich jak AMPK, pAMPK, SREBP-1c, pSREBP-1c, ACC, pACC, FAS (białka związane z metabolizmem lipidów) oraz PTP-1B, IRS-1, pIRS-1, GLUT4 (białka kaskady receptora insulinowego). Część doświadczalną kończy opis metod statystycznych, jednak Doktorantka nie podała, z jakiego korzystała oprogramowania. W tym miejscu mam wątpliwość dotyczącą zastosowanego w analizie wariancji testu *post-hoc* - czy był to test Bonferroniego (str. 86 pracy), czy jednak test Duncana (str. 86 pracy i tabele 5-7, 13-14, 16). Dodatkowo proszę o wyjaśnienia dotyczące rys. 20. Czy zastosowany zakres stężeń albuminy wołowej (BSA) nie generował zakłóceń pomiarowych (ostatecznie wyników stężenia białka). Proszę o taką dyskusję w aspekcie praw absorpcji, zwłaszcza ograniczeń dla pomiarów absorbancji roztworów stężonych i rozcieńczonych.

Główną część pracy stanowi **omówienie wyników**. Na początku Doktorantka szczegółowo porównała skład polifenoli czterech podstawowych preparatów *V. opulus* L. i wykazała, że dominującą frakcją są kwasy hydroksycynamonowe (od 71,08 do 79,23% sumy polifenoli) oraz flawanole (17,55-27,44%). Oprócz tych dwóch grup występowały jeszcze barwne antocyjany i flawanole. Suma polifenoli między preparatami bardzo się różniła, stanowiąc 11,7 mg/g w soku świeżym do 892 mg/g w soku świeżym oczyszczonego. Łącznie w otrzymanych preparatach zidentyfikowano 40 związków polifenolowych, z dominacją kwasu chlorogenowego wśród HCA, procyanidyny B1, (+)-katechiny, procyanidyny B2 oraz procyanidyny C1 wśród flawanoli, 3-O-glukozydu cyjanidyny wśród antocyjanów oraz pochodnych kwercetyny wśród flawonoli. Test pojemności antyoksydacyjnej ORAC

wykazał bardzo duże różnice między preparatami: 103, 2093, 2389 i 7810 $\mu\text{M TE/g}$, odpowiednio dla soku świeżego, ekstraktu acetonowego, ekstraktu metanolowo-acetonowego z wytlóków i soku oczyszczonego, skorelowane na poziomie $r=0.981$ z zawartością ogółu polifenoli. W kolejnym etapie Doktorantka wyznaczyła cytotoksyczność wszystkich preparatów wobec HepG2 i L6 i określiła parametr IC_0 , czyli maksymalne stężenia niecytotoksyczne, które zastosowała w kolejnych etapach badań. Wszystkie opisane w części metodycznej badania na obu liniach komórkowych naturalnych i poddanych stłuszczeniu w warunkach ko-inkubacji z kwasem palmitynowym, kwasem oleinowym lub z ich mieszaniną przeprowadziła z użyciem czterech pierwotnych preparatów z kaliny. Frakcje rozdzielone na złożu Sephadex LH-20 oraz frakcje OUT soku świeżego i oczyszczonego po trawieniu *in vitro* oceniła także pod kątem ich wpływu na poziom RFT, akumulację lipidów, wychwytywanie FFA i glukozy. We wszystkich badanych przypadkach najsilniejszy pozytywny efekt wywierał preparat soku oczyszczonego, który był koncentratem polifenoli. Preparat ten najbardziej obniżał poziom RFT, akumulację lipidów i wychwytywanie FFA, podwyższał wychwytywanie glukozy, poziom ATP (tylko dla L6) i potencjał błony mitochondrialnej, poziom glikogenu i spadek glukozy w linii HepG2. Preparat ten bardzo silnie modulował poziom większości badanych białek (wyjątek stanowiły IRS-1 i GLUT4 związane z receptorem insulinowym). Co ciekawe, świeży sok działał bardzo podobnie na ekspresję tych białek. Podczas publicznej obrony proszę Doktorantkę o dyskusję tego wyniku.

W rozdziale **dyskusja wyników** Doktorantka sprawnie korzystała z licznych źródeł naukowych, porównując zarówno składy preparatów, pojemność antyoksydacyjną, jak i aktywności funkcjonalne w badanych liniach komórkowych. Zaproponowała m.in., że związki fenolowe kaliny koralowej działają podobnie do metforminy (leku stosowanego w leczeniu niealkoholowego stłuszczenia wątroby). Wykazała, na podstawie badań własnych oraz przeglądu literatury, że działanie związków fenolowych *V. opulus* L., prowadzące do obniżania akumulacji lipidów, wynika z aktywacji komórkowej AMPK. Zdolność składników fenolowych owoców *V. opulus* L. do hamowania stłuszczenia komórek HepG2 poprzez szlak AMPK może prowadzić do zwiększonej wrażliwości komórek na działanie insuliny, a także na zintensyfikowanie transportu glukozy i procesu glikoneogenezy. Doktorantka uprawdopodobniła zatem, że uzyskany efekt jest skutkiem zmniejszenia poziomu białek SREBP-1c, ACC i FAS. Podobne mechanizmy działania polifenoli *V. opulus* L. zaobserwowała dla linii mioblastów L6. W tym przypadku Doktorantka również wykazała, że wysoka aktywność preparatów *V. opulus* L. wynika między innymi ze zdolności do hamowania akumulacji lipidów, co w komórkach hepatocytów modulowane jest na drodze uruchomienia szlaku AMPK/SREBP-1c/ACC pod kontrolą kinazy LKB-1 i poziomu AMP/ATP lub ADP/ATP. Ponadto związki fenolowe kaliny koralowej mogą hamować indukowaną stłuszczeniem insulinooporność komórek hepatocytów wynikającą ze stanu hiperlipidemii poprzez wzmocnienie transdukcji sygnału szlaku IR. Istotna jest także ich zdolność do modulowania pobierania glukozy zarówno w komórkach mioblastów, jak i hepatocytów, z jednoczesną poprawą funkcjonowania mitochondriów i obniżonym stresem oksydacyjnym.

Ostatnią część rozprawy stanowi rozdział **Podsumowanie i wnioski końcowe**. Uznaję za ważny zabieg metodyczny, że wyniki wszystkich badań zostały podsumowane

w końcowej tabeli zbiorczej (Tabela 18), która syntetyzuje wszystkie aktywności *V. opulus* L. preparatów względem badanych parametrów obu linii komórkowych i ekspresji wszystkich analizowanych białek. Niestety, ta część rozprawy jest jej najsłabszą stroną. Zdaniem recenzenta, to bardziej ciąg dalszy dyskusji niż syntetyczne podsumowanie, wyciągnięcie kluczowych wniosków oraz wskazanie dalszych kierunków badań. Proszę o dyskusję w tej sprawie.

Dodatkowe tematy do dyskusji:

- 1) Czy na podstawie przeprowadzonych badań i przeglądu literatury można przesądzić, który protekcyjny efekt preparatów kaliny koralowej jest dominujący - czy ten wynikający z wpływu na enzymy szlaków metabolicznych lipidów oraz związanych z insulinoopornością, czy też ten związany z potencjalnym wpływem na hamowanie enzymów trawiennych, w tym głównie lipazy trzustkowej?
- 2) Czy w preparatach kaliny koralowej nie występowały glikozydy saponin oraz wiburniny, typowe dla tych owoców? Te związki mają słaby efekt toksyczny, dopiero owoce po przemrożeniu lub po obróbce cieplnej tracą tę szkodliwość,
- 3) Prawdopodobnie irydoidy (opulozydy) są typowym składnikiem owoców kaliny koralowej; czy otrzymane preparaty mogły ich nie zawierać?
- 4) Wyniki badań wskazują na silniejszy efekt preparatów nietrawionych. Czy można je stosować i w jakiej postaci jako suplementy diety?
- 5) Jak jest zdanie Doktorantki nt. podawania wartości liczbowych z tak dużą dokładnością, np. 7810,29 (Tabela 7). Proszę o Pani zdanie nt. tzw. cyfr znaczących.

Wnioski końcowe

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Niny Pietrzyk spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i **wniosuję do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Olsztyn, 19.11.2021 r.



Prof. dr hab. inż. Iwona Konopka
Katedra Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wniosek

o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Niny Pietrzyk

**pt. „Wpływ składników owoców *Viburnum opulus* na metabolizm lipidów –
badania *in vitro*”**

Z uwagi na znaczenie tematu badań, jego złożoność i interdyscyplinarność, biegłość Doktorantki w wykorzystaniu zaawansowanych technik badawczych (techniki chromatograficzne, techniki biologii molekularnej i komórkowej) oraz wnikliwą dyskusję **wniosuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej**, którą miałam przyjemność oceniać.

Olsztyn, 19.11.2021 r.

