

Łódź, dn. 27.11.2021

Prof. dr hab. n. med. Urszula Lewandowska
Zakład Biochemii
Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Wydział Lekarski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Niny Pietrzyk

"Wpływ składników owoców *Viburnum opulus* na metabolizm lipidów – badania in vitro"

wykonanej w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem dr hab. inż. Anny Podśdek (promotor) oraz dr inż. Małgorzaty Zakłos-Szyda (promotor pomocniczy).

Otyłość stanowi główny czynnik ryzyka chorób przewlekłych i metabolicznych (np. cukrzyca typu 2, niealkoholowe stłuszczenie wątroby), chorób sercowo-naczyniowych (nadciśnienie, zawał mięśnia sercowego i udar), chorób układu mięśniowo-szkieletowego (choroba zwyrodnieniowa stawów), choroby Alzheimera, depresji i niektórych rodzajów nowotworów (np. piersi, jajników, prostaty, wątroby, nerek i okrężnicy). Jednak farmakologiczne leczenie zaburzeń metabolicznych związanych z gospodarką lipidową jest obarczone licznymi efektami ubocznymi. Dlatego też w ostatnich latach rośnie liczba badań ukierunkowanych na wykorzystanie naturalnych fitozwiązków (m.in. związków fenolowych) w prewencji chorób metabolicznych.

Są to związki o dużym zróżnicowaniu strukturalnym, a w konsekwencji o bardzo szerokim spektrum właściwości biologicznych (m.in. antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej). Mogą one wpływać na homeostazę lipidów poprzez hamowanie aktywności enzymów lipolitycznych, zmniejszenie akumulacji lipidów i wychwytu wolnych kwasów tłuszczowych, oddziaływanie na potencjał mitochondrialny i syntezę ATP. Wzrasta również zainteresowanie ekstraktami bogatymi w związki fenolowe jako naturalnymi środkami

prewencyjnymi, wynikające z ich uzupełniających się aktywności i oddziaływań synergistycznych.

Rośliną bogatą w związki fenolowe i stanowiącą obecnie obiekt badań naukowych pod kątem prozdrowotnych aktywności biologicznych jest kalina koralowa (*Viburnum opulus* L.). Kalina należy do rodziny pizmaczkowatych (Adoxaceae) i powszechnie rośnie w Europie, w centralnej Rosji oraz w niektórych regionach Afryki Północnej i Azji Północnej. W Europie Wschodniej owoce kaliny wykorzystywane są do wytwarzania dżemów, konfitur i nalewek, zaś w Turcji produkowany jest z nich fermentowany niealkoholowy napój o właściwościach prozdrowotnych. Dostępne piśmiennictwo wskazuje, że aktywność biologiczna owoców *V. opulus* wynika z jej bogatego składu, w ramach którego można wymienić związki fenolowe, w tym flawonoidy, antocyjany oraz proantocyjanidyny, a także witaminę C, karotenoidy oraz irydoidy. Jednocześnie w doniesieniach literaturowych brakuje wystarczających danych dotyczących składu chemicznego oraz zmienności tego składu w zależności od rodzaju ekstraktu czy sposobu jego otrzymywania. Dotychczas tylko nieliczne badania *in vitro* potwierdzają właściwości przeciwotyłościowe oraz przeciwcukrzycowe owoców kaliny koralowej.

Biorąc pod uwagę powyższe z pełnym przekonaniem uważam, że podjęty przez Doktorantkę temat rozprawy jest bardzo ciekawy i zasadny w świetle trendów obowiązujących w badaniach dotyczących poszukiwania leku pochodzenia roślinnego. Cel pracy oraz szczegółowe zadania badawcze zostały sformułowane w sposób jasny i nie budzący żadnych wątpliwości merytorycznych. Celem zasadniczym pracy doktorskiej Pani mgr inż. Niny Pietrzyk było określenie aktywności antyoksydacyjnej składników owoców kaliny koralowej, a także zbadanie ich wpływu na komórki hepatocytów (HepG2) i komórki mioblastów (L6) pod kątem cytoprotekcyjnego działania w zakresie akumulacji lipidów, pobierania glukozy, potencjału mitochondrialnego i poziomu białek zaangażowanych w metabolizm lipidów oraz szlak receptora insulinowego.

Materiał badawczy stanowiły cztery preparaty otrzymane ze świeżych owoców kaliny koralowej, takie jak świeży sok (FJ), sok oczyszczony metodą ekstrakcji w fazie stałej, bogaty w związki fenolowe (PJ) oraz dwa preparaty z wytloków uzyskane po ich sukcesywnej ekstrakcji mieszaniną metanol:aceton:woda (MAE) oraz 70% acetonem (AE).

W strukturze pracy wyodrębniono część teoretyczną liczącą 41 stron oraz metodologiczną i empiryczną, które wraz z dyskusją i podsumowaniem zawarte są na 136 stronach. Wstęp teoretyczny jest spójny, logiczny w formie i bardzo bogaty w treść, stanowiąc bardzo dobre wprowadzenie do przeprowadzonych badań. Przedstawiono w nim zagadnienia dotyczące złożoności gospodarki lipidów oraz węglowodanów w wątrobie i mięśniach, takie jak: magazynowanie i transport komórkowy lipidów, utlenianie kwasów tłuszczowych, wychwytywanie glukozy w komórkach mięśni szkieletowych, glikoliza i synteza glikogenu, glikogenoliza i glukoneogeneza, lipogeneza i jej udział w generowaniu syndromu metabolicznego (MS, ang. *metabolic syndrome*), rola kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK, ang. *AMP-activated protein kinase*) w regulacji metabolizmu lipidów i glukozy, a także farmakoterapię otyłości i niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NASH, ang. *nonalcoholic steatohepatitis*) oraz znaczenie ekstraktów i związków roślinnych w metabolizmie lipidów. Tekst uzupełnia 14 poglądowych schematów i 2 tabele.

Rozdział metodologiczny zawierający opis materiałów i badań stosowanych w pracy jest wystarczający do interpretacji uzyskanych wyników. Stwierdzam, że Doktorantka jest doświadczonym eksperymentatorem, bardzo dobrze znającym nowoczesne techniki badawcze z zakresu chemii, biochemii, biologii molekularnej i badań funkcjonalnych oraz obrazowych komórki. W pracy zastosowano m.in. system ultrasprawnej chromatografii ciekłej (UPLC, ang. *Ultra-Performance Liquid Chromatography*) UPLC ACQUITY sprzężonej z kwadropolarną spektrometrią mas Q/TOS-MS do identyfikacji i ilościowej analizy związków fenolowych *Viburnum opulus*, technikę Western blotting do oznaczania ekspresji białek z uwzględnieniem statusu ich ufosforylowania, mikroskopię fluorescencyjną do oceny zmian potencjału błony mitochondrialnej komórek, wychwytywanie wolnych kwasów tłuszczowych, pobierania glukozy przez komórki oraz stopnia akumulacji wewnątrzkomórkowej lipidów.

Część empiryczna pracy jest rzetelnie opracowana. Wyniki badań własnych Doktorantka bardzo dobrze udokumentowała na 49 rysunkach i w 11 tabelach, omawiając poszczególne zależności i analizowane parametry. Świadczą one o ogromie pracy włożonej w wykonanie badań eksperymentalnych i przedstawienie wyników w przejrzystej formie, pozwalającej na ich łatwe przestudiowanie.

Ostrożnie przeprowadzona dyskusja na tle wyników innych autorów świadczy o dużej wiedzy nabytej przez Panią mgr inż. Ninę Pietrzyk z zakresu biologii molekularnej, biochemii i projektowania innowacyjnych strategii terapeutycznych oraz o odpowiedzialności badawczej Doktorantki.

Do istotnych wyników otrzymanych przez Doktorantkę było zidentyfikowanie w preparatach z owoców kaliny koralowej, 40 związków fenolowych, wśród których pochodne kwasów hydroksycynamonowych stanowiły ich dominującą grupę. Kwas chlorogenowy bez wątplenia jest ilościowo głównym związkiem fenolowym badanych preparatów stanowiąc 65-80% puli wszystkich związków fenolowych. Podkreślić w tym miejscu należy, iż prawidłowa identyfikacja tego rodzaju związków nie jest zadaniem najłatwiejszym i pokazuje to doświadczenie i wiedzę Doktorantki w tym zakresie. W dalszej części badań Doktorantka dokonała analizy aktywności antyoksydacyjnej preparatów, wykazując ich wysoki potencjał przeciwutleniający, korelujący oczywiście z całkowitą zawartością związków fenolowych. Najwyższą pojemność antyoksydacyjną wykazał oczyszczony sok (PJ), podczas gdy świeży sok (FJ) najniższą, odpowiednio 7810,29 i 103,5 $\mu\text{moli TE/g}$ preparatu.

Kluczowym elementem przedłożonej pracy doktorskiej była również analiza poziomu białek zaangażowanych w metabolizm lipidów. Badania nad poziomem białek AMPK α , ACC, SREBP-1c i ich fosforylowanych form (pAMPK α , pACC, pSREBP-1c) oraz FAS w komórkach HepG2 inkubowanych z preparatami owoców *V. opulus* wskazały na ich zdolność do zwiększania poziomu białka AMPK, jak i jego formy aktywnej pAMPK α (Thr172). Wskazuje to, że związki fenolowe *V. opulus* mogą modulować metabolizm lipidów w stanie hiperlipidemii poprzez hamowanie aktywności i poziomu białek SREBP-1c i ACC. Stąd wniosek, że działanie związków fenolowych *V. opulus* pro wadzące do obniżania akumulacji lipidów wynika z aktywacji komórkowej AMPK.

Kolejnym etapem prac było potwierdzenie aktywności preparatów z owoców kaliny wobec komórek HepG2 w warunkach zaindukowanej steatozy. W generowaniu insulinooporności uczestniczy fosfataza PTP-1B, znana jako negatywny regulator kaskady przeniesienia sygnału insuliny na drodze defosforylacji pIRS-1, i która stanowi nowy cel terapeutyczny w cukrzycy typu 2 i otyłości. Badania nad aktywnością preparatów *V. opulus* wskazały na zdolność obniżenia poziomu PTP-1B w komórkach HepG2 inkubowanych z oczyszczonym sokiem i ekstraktami z wytlóków. Efekty te obserwowano również w

warunkach indukowanego stłuszczenia FFA, co w konsekwencji skutkowało zwiększeniem fosforylacji białka IRS, a w przypadku ko-inkubacji z PJ – zwiększonym wychwytem glukozy i zawartością glikogenu przy jednoczesnym zmniejszeniu uwalniania glukozy przez komórki hepatocytów.

Można wnioskować, że zdolność składników fenolowych owoców *V. opulus* 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.

Przedstawione w przedłożonej dysertacji badania są pierwszymi wskazującymi na zdolność związków fenolowych owoców kaliny koralowej do modulowania poziomu białek zaangażowanych w metabolizm lipidów i powiązany z nim metabolizm węglowodanów w komórkach HepG2 w warunkach indukowanej steatozy. Ponadto, otrzymane wyniki dały podstawę do zaproponowania mechanizmu będącego pod kontrolą związków fenolowych *V. opulus* w komórkach hepatocytów. Zaproponowany mechanizm aktywności związków fenolowych związany ze szlakiem AMPK/SREBP-1c/ACC odpowiada za zmniejszenie akumulacji lipidów w komórkach HepG2, poprawę wychwytu glukozy, zwiększenie potencjału mitochondrialnego z jednoczesnym obniżeniem stresu oksydacyjnego (Rys.74). Daje zatem działanie biologiczne, pożądane z punktu cytoprotekcji komórek wątroby w stanie stłuszczenia, charakterystycznego dla zaburzeń metabolicznych związanych z NAFLD, MS i otyłością.

Należy mieć na uwadze fakt, że aktywność biologiczna roślinnych metabolitów wtórnych *in vivo* jest determinowana głównie ich biodostępnością, dlatego też uważam, że bardzo ważnym wynikiem uzyskanym przez Doktorantkę było wykazanie wpływu trawienia *in vitro* na aktywność związków fenolowych *Viburnum opulus*. W procesie symulowanego trawienia *in vitro* preparatów FJ i PJ, przedstawione wyniki wskazują na istotny wpływ procesu trawienia na przemiany związków fenolowych obecnych w preparatach soku. Zidentyfikowane flawanole stanowiące 19,52% i 16,30% całkowitej zawartości związków fenolowych w preparatach FJ i PJ zostały całkowicie zdegradowane. Towarzystwo temu pojawienie się nowych, niezidentyfikowanych wcześniej w wyjściowych preparatach pochodnych flawan-3-oli w obu frakcjach potrawiennych.

Podsumowując, spośród badanych preparatów, oczyszczony sok (PJ) wykazał najsilniejszą aktywność w zmniejszaniu akumulacji lipidów w komórkach HepG2 oraz L6 w

warunkach indukowanego stłuszczenia przez FFA, co wiązało się jednocześnie ze zmniejszeniem ich wychwytu.

Kluczową w kontekście oceny synergizmu związków fenolowych była ocena aktywności biologicznych uzyskanych frakcji z PJ i porównanie jej do aktywności wyjściowego preparatu oczyszczonego soku. Ponadto, wyniki zawarte w pracy dostarczają dowodów na to, że bogaty profil związków fenolowych owoców *V. opulus* wykazuje działanie synergistyczne w zakresie lipotoksyczności komórek HepG2 i L6 oraz ma wysoki potencjał jako uzupełniająca, profilaktyczna terapia w zapobieganiu hiperlipidemii i powikłaniom związanym z zaburzonym metabolizmem lipidów.

Wyniki badań uzyskane w trakcie realizacji ocenianego doktoratu i zamieszczone w recenzowanej rozprawie zostały częściowo opublikowane w 6 pracach w czasopismach z listy filadelfijskiej: *Molecules* (MNiSW:100; IF = 4,411), *Journal of Functional Foods* (MNiSW: 100 pkt; IF = 4,451), *International Journal of Molecular Sciences* (MNiSW: 140 pkt; IF = 5,923), *Nutrients* (MNiSW: 140 pkt; IF = 5,717), *Antioxidants* (MNiSW: 100 pkt; IF = 6,312), *Antioxidants* (MNiSW: 100 pkt; IF = 6,312). Przytoczone IF (sumaryczny 33,126) i punktacja MNiSW (suma punktów 680) wskazują na bardzo wysoki poziom badań naukowych. W dwóch pracach Pani mgr inż. Nina Pietrzyk jest pierwszym autorem. O dużej aktywności naukowej Doktorantki świadczy również jej udział w 4 konferencjach naukowych, z czego w 3 jest pierwszym autorem (wystąpienie ustne).

Wszystkie rozdziały dysertacji stanowią spójną całość, do pracy dołączony jest wykaz skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozprawa przygotowana jest z niezwykłą starannością, napisana jest precyzyjnym i przystępnym językiem. Jedyne co mogłabym zasugerować, to unikanie stwierdzeń „nie manifestowała zmian apoptotycznych”, gdzie „manifestowała” zastąpiłabym wyrazem „wskazywała”. Ponadto, na niektórych rysunkach (np.: 67, 69 i 70) są niepoprawnie oznaczone (względem słupków na wykresie) stężenia kwasów tłuszczowych (OA i PA). Komentarze te w żaden sposób nie umniejszają mojej niezwykle pozytywnej opinii.

Podczas czytania przedłożonej rozprawy nasunęły mi się następujące pytania, które chciałbym zaadresować do Doktorantki z prośbą o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony:

1. Dlaczego we wnioskach końcowych Doktorantka twierdzi, że „zdolność związków fenolowych owoców *V. opulus* do hamowania stłuszczenia komórek HepG2 poprzez szlak AMPK może prowadzić do zwiększonej wrażliwości komórek na działanie insuliny, a także na zintensyfikowanie transportu glukozy....”, skoro wyniki badań w pracy wskazują, że badane ekstrakty nie miały wpływu na ekspresji białka GLUT4?
2. Dlaczego proces symulowanego trawienia preparatu PJ każdorazowo obniżył jego aktywność o blisko połowę?
3. Które z otrzymanych wyników (i dlaczego) nad badaniem aktywności preparatów z owoców *V. opulus* według Doktorantki mają wysoką wartość aplikacyjną w stosunku do pacjentów cukrzycowych?

W podsumowaniu oceny pracy stwierdzam, że jest ona znaczącym osiągnięciem Doktorantki i jej Promotora oraz Promotora Pomocniczego zrealizowanym z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych. Przedstawione w rozprawie wyniki, dotyczące wpływu preparatów uzyskanych z owoców *V. opulus* na metabolizm lipidów w zakresie ich cytoprotekcyjnego działania względem indukowanego stłuszczenia komórek hepatocytów linii HepG2 oraz komórek mioblastów linii L6, są oryginalne i bardzo wartościowe zarówno pod względem poznawczym, jak również aplikacyjnym i mogą stanowić ważny punkt wyjścia do dalszych badań. Dowodzi także opanowania przez Doktorantkę bogatego warsztatu metodycznego i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz rozwiązywania problemów naukowych.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska 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 wnioskuję do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Niny Pietrzyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Urszula Lewandowska

Łódź, dn. 27.11.2021

Prof. dr hab. n. med. Urszula Lewandowska
Zakład Biochemii
Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Wydział Lekarski

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE

rozprawy doktorskiej mgr inż. Niny Pietrzyk

*"Wpływ składników owoców Viburnum opulus na metabolizm lipidów
– badania in vitro"*

Ze względu na fakt, że:

1. podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne z punktu widzenia metodologicznego i aplikacyjnego,
2. cele pracy zostały zrealizowane, a osiągnięte oryginalne wyniki mają charakter poznawczy i stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny,

wniosuję do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Niny Pietrzyk.

Urszula Lewandowska

