

Dr hab. Adam Jurgoński, prof. IRZiBŻ PAN

Olsztyn, dnia 24.10.2024

Zespół Biologicznych Funkcji Żywności

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności

Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

[a.jurgonski@pan.olsztyn.pl](mailto:a.jurgonski@pan.olsztyn.pl)

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**mgr inż. Elizy Korkus**

pt. „Związki lipidowe zawarte w owocach rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.) jako ligandy receptorów sprzężonych z białkiem G zaangażowanych w utrzymanie homeostazy glukozy” wykonanej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem dr hab. Edyty Gendaszewskiej-Darmach, prof. uczelni

*Niniejszą recenzję wykonano w odpowiedzi na Uchwałę nr 100/2024 Rady do Spraw Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia z dnia 9 lipca 2024 r. oraz na podstawie przepisów Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, zwanej dalej Ustawą (Dz.U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.). Recenzję sporządzono w oparciu o otrzymaną w dniu 3.09.2024 r. rozprawę doktorską niniejszej kandydatki do stopnia doktora zwanej dalej Kandydatką.*

### **Wybór i znaczenie tematu**

Utrzymanie homeostazy glukozy we krwi jest bardzo ważnym i złożonym procesem fizjologicznym, którego zaburzenia mogą prowadzić do rozwoju cukrzycy typu 2, charakteryzującej się opornością tkanek na insulinę i względnym niedoborem tego hormonu. Cukrzyca typu 2 wiąże się z występowaniem otyłości, a podstawą jej zapobiegania jest zbilansowana pod względem kalorycznym i odżywczym dieta, która może także dostarczać związki biologicznie aktywne korzystne dla naszego zdrowia. Wtórny sposobem radzenia sobie z cukrzycą typu 2 są różnego rodzaju leki przeciwcukrzycowe, których przyjmowanie jest jednak powiązane z mniejszymi lub większymi skutkami ubocznymi. Interesującymi i relatywnie niedawno wprowadzonymi na rynek lekami przeciwcukrzycowymi są analogi glukagonopodobnego peptydu 1 (GLP-1) o dodatkowych właściwościach odchudzających, które m.in. nasilają stymulowany glukozą proces wydzielania insuliny. Na poziomie komórkowym wydzielanie insuliny stymulowane glukozą jest procesem bardzo złożonym, w którym, oprócz kluczowej roli przezłonowych transporterów glukozy,

uczestniczą także receptory sprzężone z białkiem G, aktywując specyficzne szlaki sygnałowe wewnątrz komórek  $\beta$  wysp trzustkowych. Wśród nich wyróżniamy receptory będące przedmiotem niniejszej rozprawy, które m.in. mają zdolność wiązania wolnych kwasów tłuszczowych.

Jednym z podstawowych źródeł kwasów tłuszczowych i innych lipidów w diecie są oleje roślinne, wśród których olej z miąższu owoców rokitnika zwyczajnego jest relatywnie mniej popularny. Olej ten zawiera jednak wyjątkowo dużą ilość jednonienasyconego kwasu palmitooleinowego (średnio 30% wszystkich kwasów; 16:1 *n-7*), któremu przypisuje się właściwości poprawiające metabolizm glukozy. Co istotne, kwas palmitooleinowy jest obecny w naturze zazwyczaj w niewielkich ilościach w postaci jednej z dwóch izomerycznych form, *cis* lub *trans*, co dodatkowo komplikuje zidentyfikowanie jego rzeczywistej bioaktywności. Na tym tle podjęte przez mgr inż. Elżbę Korkus badania dotyczące roli oleju rokitnikowego, izomerów kwasu palmitooleinowego oraz jego pochodnych w regulacji homeostazy glukozy za pośrednictwem receptorów sprzężonych z białkiem G są ciekawe i uzasadnione.

### **Formalna ocena rozprawy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest obszernym, wyodrębnionym i opisanym na 194 stronach opracowaniem, którego wyniki pochodzą z wieloautorskich publikacji naukowych (publikacji nie załączono). Została napisana bazując na wynikach zawartych w 6 oryginalnych artykułach naukowych, opublikowanych na przestrzeni ostatnich 4 lat w wartościowych czasopismach z zakresu nauk o żywności i żywieniu i nauk chemicznych (*Food Chem.* 2021, *NFS J.* 2022 i 2023, *Food Funct.* 2023, *ACS Med. Chem. Lett.* 2024, *Sci. Rep.* 2024), a także jednej monografii z 2020 roku. W rozprawie nie zwarto żadnych pisemnych zgód ani oświadczeń określających wkład poszczególnych autorów w jej powstanie, co komplikuje nieco ocenę indywidualnego wkładu Kandydatki do stopnia doktora w tym zakresie. W różnych rozdziałach można jednak doszukać się informacji nt. tego jakie badania zostały wykonane przez większość współautorów. Dodatkowo Kandydatka jest pierwszym autorem w aż czterech spośród siedmiu zadeklarowanych publikacji, w tym dotyczących zdecydowanej większości doświadczeń *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych. Biorąc powyższe informacje pod uwagę przyjmuję, że kluczowa część rozprawy odnosząca się właśnie do tych doświadczeń jest indywidualnym wkładem Kandydatki. Część zasadnicza rozprawy zawiera charakterystyczne i oczekiwane w tego typu opracowaniach rozdziały, we właściwej kolejności i proporcjach, w tym trzypięciostopniowe streszczenia w języku polskim i angielskim (zgodnie z art. 187, ust. 4 Ustawy). W rozprawie znajduje się w sumie 11 tabel oraz aż 79 rycin, na których przedstawiono w sposób przejrzysty m.in. uzyskane przez Kandydatkę wyniki oraz schematy komórkowych szlaków sygnałowych. Zamieszczono także 6-

stronicowy wykaz skrótowców, spisy tabel i rycin oraz piśmiennictwo, w którym znajduje się lista około 266 nieponumerowanych pozycji, głównie anglojęzycznych, opublikowanych na przestrzeni ostatnich 15 lat (blisko w 70%). Tytuł jest zwięzły i zgodny z treścią rozprawy, chociaż brak w nim informacji o izomerach kwasu palmitooleinowego i ich pochodnych, które są bardzo istotnym i z pewnego punktu widzenia wartym wyodrębnienia zagadnieniem. Na szczególne podkreślenie zasługuje staranne zredagowanie rozprawy, brak błędów stylistycznych i przystępny sposób w jaki Kandydatka opisuje często dość skomplikowane zagadnienia związane z podjętym tematem. Trzy drobne uwagi o charakterze redakcyjnym przekazuję w nawiasach do wiadomości (str. 40: pleonazm w zdaniu „FFA stymulują GSIS w sposób zależny od glukozy”; wyniki, str. 82: „Lipidy pochodzące z owoców rokitnika mogą gromadzić się w organellach zwanych oleosomami”; rys. 79. literówka w zdaniu „...zawierającymi w pozycji sn-1 łańcuchy acylowe izomerów cis i trans kwasu palmitooleinowego na podstawie uzyskanych wyników”).

### **Merytoryczna ocena rozprawy**

Swoją rozprawę Kandydatka rozpoczyna obszernym wstępem teoretycznym, w którym dokonuje m.in. przeglądu dotychczasowej wiedzy na temat patogenezы zaburzeń metabolicznych zależnych od diety, skupiając się głównie na cukrzycy typu 2. Następnie opisuje mechanizmy odpowiedzialne za kontrolę homeostazy glukozy podkreślając kluczową rolę insuliny w tym procesie, a także opisując czynniki wpływające na wydzielanie tego hormonu przez komórki  $\beta$ . Charakteryzuje także kwas palmitooleinowy wskazując na dostępną literaturę dot. jego biologicznej aktywności, a także na owoce rokitnika będące źródłem różnorodnych składników pokarmowych i olejów, przytaczając przy tym dotychczas rozpoznane właściwości prozdrowotne oleju z mięszu tych owoców. W ujęciu zaproponowanym przez Kandydatkę, przegląd piśmiennictwa jest napisany w sposób klarowny, na podstawie odpowiednio dobranej literatury i opatrzony licznymi rycinami, co ułatwia rozeznanie się w opisywanym stanie wiedzy. Można z niego także wywnioskować, jakie przesłanki skłoniły Kandydatkę do podjęcia części niniejszych badań. Ważne stwierdzenia częściowo uzasadniające podjęcie badań w opisanym zakresie pojawiają się także w pozostałych rozdziałach, szczególnie w opisie uzyskanych wyników i dyskusji. Kandydatka nie zdecydowała się jednak na wydzielenie krótkiego rozdziału sumującego najważniejsze przesłanki do podjęcia badań, trudno jest się także doszukać w rozprawie jednoznacznie postawionej hipotezy badawczej. Co prawda, hipoteza nie zawsze jest szczególnie pomocna, np. w pracach dotyczących zagadnień ściśle technologicznych, jednak w badaniach, które dotyczą mechanizmów funkcjonowania organizmów żywych, jej postawienie jest ważne i oczekiwane.

W rozdziale trzecim przedstawiono główny cel, który brzmi następująco: „...zbadanie roli izomerów *cis* i *trans* kwasu palmitooleinowego oraz olejów z mięszu owoców rokitnika

zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.) otrzymanych różnymi metodami ekstrakcji w regulacji homeostazy glukozy z wykorzystaniem mysich i ludzkich modelowych komórek  $\beta$  trzustki oraz komórek enteroendokrynych jelita”. Kandydatka wymienia także 7 celów szczegółowych, które nawiązują bezpośrednio do celu głównego i odnoszą się do kwestii ściśle związanych z funkcjonowaniem wybranych komórek organizmu i metabolizmem glukozy. W rozprawie za merytorycznie uzasadnione przez Kandydatkę uznaję badania dot. oleju rokitnikowego samego w sobie i jego składników istotnych w kontekście regulacji homeostazy glukozy, w tym pochodnych tych składników (kwasów tłuszczowych, monoacylogliceroli i lizofosfatydylocholin). Szczególnie dobrze uzasadnione są badania dotyczące rozpoznania różnic w biologicznej aktywności izomerów kwasu palmitooleinowego. W ogóle nieuzasadnione jest natomiast zastosowanie w sumie aż pięciu sposobów ekstrakcji lub oczyszczania badanego oleju w kontekście regulacji homeostazy glukozy. Merytorycznego uzasadnienia w tym kontekście brakuje ponadto do zastosowania oleosomów oraz wykorzystania owoców pięciu odmian rokitnika w celu ich pozyskania. Proszę w związku z tym Kandydatkę o dokonanie stosownych uzasadnień podczas publicznej obrony.

Aby zrealizować postawione cele Kandydatka przeprowadziła szereg doświadczeń *in vitro* na mysich i ludzkich liniach komórek  $\beta$  trzustki (odpowiednio MIN6 i EndoC- $\beta$ H1) lub komórek enteroendokrynych jelita (odpowiednio GLUTag i NCI-H716), zdolnych do wydzielania odpowiednio insuliny lub GLP-1. Na wyróżnienie zasługuje przemyślany i ciekawy schemat doświadczeń *in vitro*, a także ich zasadniczo właściwe wykonanie z uwzględnieniem wielu istotnych z merytorycznego punktu widzenia czynników, poparte szczegółowym opisem w rozdziale „Materiał i metody” oraz w następujących po nim rozdziałach. W doświadczeniach m.in. 1) słusznie wzięto pod uwagę proces trawienia lipidów w jelicie cienkim (wcześniej oleje i oleosomy dodatkowo poddano lipolizie *in vitro*); 2) Poza badanym olejem i oleosomami wykorzystano także ich najważniejsze oczyszczone kwasy tłuszczowe oraz lipidowe pochodne (monoacyloglicerole, lizofosfatydylocholino) w celu określenia roli poszczególnych związków i ich mieszaniny (efekt synergistyczny) w stymulowanym glukozą wydzielaniu insuliny; 3) Słusznie wzięto pod uwagę pozafizjologiczne czynniki mogące wpływać na uwalnianie insuliny *in vitro*, w tym cytotoksyczność badanych preparatów i możliwość naruszania przez nie integralności błon komórkowych; 4) W sposób merytorycznie uzasadniony skupiono się na wewnątrzkomórkowej mobilizacji jonów wapnia jako na kluczowym elemencie stymulującym wydzielanie insuliny w odpowiedzi na glukozę, a także uwzględniono dodatkową ścieżkę sygnałową związaną z produkcją cyklicznego monofosforanu adenozyne; 5) Zastosowano szereg grup kontrolnych, w tym pozytywnych i negatywnych (syntetyczni agoniści i antagoniści receptorów, blokery kanałów itp.), co przyczyniło się m.in. do wiarygodnego określenia roli aż czterech receptorów związanych z białkiem G (GPR40, GPR55,

GPR119 oraz GPR120) w stymulacji sekrecji insuliny pod wpływem badanych czynników; 6) Wykluczono w sposób eksperymentalny możliwość udziału GLP-1 w mechanizmie zwiększania stymulowanego glukozą wydzielania insuliny poprzez badane preparaty (tzw. efekt inkretynowy). Do metodyki związanej bezpośrednio z przeprowadzonymi doświadczeniami *in vitro* mam następujące drobne uwagi: 1) W rozprawie nie znalazłem merytorycznego uzasadnienia zastosowania niskiego i wysokiego stężenia glukozy na poziomie odpowiednio 2 i 20 mmol/L buforu roboczego (czy i w jaki sposób nawiązują te stężenia do fizjologicznych warunków?); 2) Nie określono jednoznacznie w jakim materiale oznaczano ilościowo insulinę i GLP-1 (czy było to medium hodowlane?); 3) Do oznaczania insuliny wykorzystano mysie przeciwciała, nie sprecyzowano jednak przeciwko jakiej insulinie zostały one wytworzone (ludzkiej? Jednej z dwóch mysich?); 4) Zabrakło podania sposobu wyliczenia pola powierzchni pod krzywą, za pomocą którego przedstawiono całkowite wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia (ss. 117-118). Oceniając metodykę podkreślam duży wysiłek, jaki włożono w przeprowadzenie badań, które zostały bardzo szeroko zakrojone i oparte także o wielośrodkową współpracę, m.in. z uwagi na potrzebę pozyskania badanych olejów i oleosomów oraz zsyntetyzowania niedostępnych handlowo preparatów (lizofosfatydylocholin zawierających izomery kw. palmitooleinowego). W tym kontekście z wyrozumiałością przyjmuję inne niedociągnięcia w opisie metodyki badań, do których zaliczam: 1) Brak poparcia literaturą metodyki pozyskiwania oleosomów; 2) Brak opisu sposobu oczyszczania oleju rokitnikowego na węglu aktywnym i syntezy estrów etylowych kwasów tłuszczowych; 3) Brak szczegółów dot. sposobu oznaczania kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej. Uważam, że w rozprawie będącej samodzielnym i wyodrębnionym opracowaniem warto zamieszczać bardziej wyczerpujące opisy metodyki badań wraz z odpowiednimi odnośnikami do piśmiennictwa.

Wyniki opisano właściwie bez rozpisywania się nad różnicami pomiędzy indywidualnymi grupami, popierając wszystko odpowiednio dobraną analizą statystyczną. Wyjątek stanowią 2 zdania, w których Kandydatka opisuje, że uzyskane wyniki cyt. „...wyraźnie korelują...” (s. 116) lub też rozpoczyna zdanie od stwierdzenia, że cyt. „W celu zbadania korelacji...” (s. 126), chociaż w rozprawie współczynniki korelacji nie były w ogóle wyliczane. Pomimo dużej ilości uzyskanych wyników są one opisane w sposób usystematyzowany i czytelny. Odosobniony wyjątek stanowi jeden z podrozdziałów zatytułowany „Sekrecja insuliny w komórkach MIN6 i EndoC-βH1 pod wpływem związków kontrolnych” (4.1.3.1), w którym, pomimo zawartej w tytule i wstępie informacji o dwóch badanych liniach komórkowych, zamieszczono wyniki dotyczące tylko jednej linii (MIN6). Warto natomiast w tym miejscu docenić pracę Kandydatki włożoną w przeprowadzenie

licznych doświadczeń, analizę uzyskanych danych i przedstawienie wyników w formie zgrabnych wykresów.

W 29-stronicowym rozdziale „Dyskusja” Kandydatka wykorzystuje swoją rozległą wiedzę z zakresu fizjologii komórki dokonując zasadniczo w sposób kompetentny i naukowo dojrzały interpretacji badań własnych na tle dostępnej literatury. Dyskusja jest przeprowadzona ciekawie, szczególnie z uwagi na liczne dodatkowe wyniki, których Kandydatka nie podaje w rozprawie jako własnych. W tym kontekście przedstawia profil kwasów tłuszczowych oleju pozyskanego różnymi sposobami z odmiany Luczystaja oraz z oleosomów kilku odmian, w tym także odmiany Luczystaja. Niestety w dyskusji, ani w innych częściach rozprawy, nie doszukałem się uzasadnienia, co do wyboru akurat tej konkretnej odmiany jako zasadniczego źródła oleju do doświadczeń *in vitro*, dlatego proszę o ustosunkowanie się do tej kwestii podczas publicznej obrony. Kandydatka charakteryzuje także bardziej szczegółowo oleosomy jako takie, uzupełniając podstawowe informacje na ich temat, które nie znalazły się we wstępnym przeglądzie piśmiennictwa. Obrazuje powyższe zagadnienie rycinami struktury oleosomów oraz sposobu ich pozyskiwania i wyglądu pod mikroskopem, uzupełniając skromne informacje zawarte na ten temat w metodyce. Kandydatka opisuje także i bardzo ładnie przedstawia na trójwymiarowych schematach wyniki z dokowania molekularnego izomerów kwasu palmitooleinowego i ich pochodnych (lizofosfatydylocholin) w miejscach wiążących receptorów, które były przedmiotem badań. Warto docenić, że podkreśla kluczową rolę innych badaczy w uzyskaniu wyników opisywanych w dyskusji, wymieniając ich z imienia i nazwiska. Kandydatka nie ustosunkowuje się natomiast do dyskusyjnego ze ściśle żywieniowego punktu widzenia wykorzystywania linii komórkowych do badań właściwości składników diety, które zazwyczaj są złożoną mieszaniną wielu substancji. W przypadku olejów roślinnych w ogóle, a oleju rokitnikowego szczególnie, poza kwasami tłuszczowymi i ich pochodnymi, jest przecież szereg innych związków, w tym tokoferoli, karotenoidów, steroli itp., które mogą oddziaływać bezpośrednio na linie komórkowe. Poza słusznym uwzględnieniem fizjologicznego etapu trawienia lipidów w przewodzie pokarmowym, w kontekście związków zawartych w olejach warto by ponadto nawiązać także do innych procesów metabolicznych zachodzących w organizmie, np. w wątrobie (tzw. efekt pierwszego przejścia). Kandydatka wskazuje natomiast jednoznacznie na uwolnione w wyniku trawienia kwasy tłuszczowe, ewentualnie ich pochodne, jako na kluczowe składniki odpowiedzialne za właściwości badanych olejów i oleosomów, w tym także za ich zwiększoną cytotoksyczność, co potwierdza stosując oczyszczone kwasy tłuszczowe. W trakcie publicznej obrony proszę jednak Kandydatkę o próbę szerszego podejścia do tego tematu i omówienia także innych czynników, które mogły mieć jakikolwiek wpływ na przeżywalność badanych komórek. Czynnikiem takimi mogły być na przykład sole kwasów

żółciowych lub lipaza, które wykorzystano do procesu trawienia olejów i oleosomów, a które najwyraźniej były także obecne w strawionych preparatach. Wiadomo ponadto, że oleosomy zawierają śladowe ilości enzymów roślinnych zmniejszających ich stabilność w czasie (De Chirico i wsp., doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126355), co także mogło wpływać na przeżywalność badanych linii komórkowych.

Na zakończenie rozprawy Kandydatka w rozdziale „Wnioski” w sposób syntetyczny podsumowuje najważniejsze spostrzeżenia z badań własnych i badań współautorów. Formułuje przy tym rzeczywiste wnioski nawiązujące bezpośrednio do postawionego celu badawczego, chociaż część wniosków odnosi się także do wyników, które nie zostały zamieszczone w rozprawie jako własne. Niemniej jednak ustalenie w rozprawie roli kwasów tłuszczowych oleju rokitnikowego i ich pochodnych w aktywacji badanych receptorów (GPR40, GPR55, GPR119 oraz GPR120) i w zwiększaniu za pośrednictwem tych receptorów wydzielania insuliny stymulowanego glukozą uważam za interesujące i odkrywcze. Równie ważnym i bardzo ciekawym osiągnięciem naukowym Kandydatki jest zwrócenie uwagi na nieco odmienny, wewnątrzkomórkowy mechanizm aktywowania sekrecji insuliny za pomocą izomerów *cis* i *trans* kwasu palmitooleinowego i ich lizofosfatydylocholinowych pochodnych, który został ładnie zilustrowany na ostatnim w kolejności schemacie rozprawy.

### **Podsumowanie i wnioski końcowe**

Reasumując stwierdzam, że mgr inż. Eliza Korkus w sposób oryginalny pogłębiła wiedzę nt. roli oleju z miąższu owoców rokitnika zwyczajnego i mechanizmów działania izomerów kwasu palmitooleinowego w regulacji homeostazy glukozy z wykorzystaniem modelowych komórek  $\beta$  trzustki. Wykazała się przy tym ogólną wiedzą teoretyczną, m.in. w zakresie chemii i technologii żywności, a uzyskane wyniki są bardzo ciekawe w kontekście poszukiwania nowych składników diety zapobiegających i wspomagających leczenie cukrzycy typu 2. Lektura rozprawy doktorskiej mgr inż. Elizy Korkus przekonała mnie, że potrafi ona prawidłowo zaplanować i przeprowadzić doświadczenia *in vitro* na liniach komórkowych, a następnie zinterpretować uzyskane wyniki i wyciągnąć adekwatne wnioski. Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom (zgodnie z art. 187, ust. 1-2 Ustawy) i wnoszę do Rady do Spraw Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr inż. Elizy Korkus do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Adam Janęgórski