



Wrocław, 31.10.2024 r.

prof. dr hab. inż. Alicja Kucharska
Katedra Technologii Owoców, Warzyw
i Nutraceutyków Roślinnych
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. Chełmońskiego 39
51-630 Wrocław

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Elizy Korkus

**„Związki lipidowe zawarte w owocach rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.)
jako ligandy receptorów sprzężonych z białkiem G zaangażowanych w utrzymanie
homeostazy glukozy”**

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Elizy Korkus została wykonana pod kierunkiem dr hab. Edyty Gendaszewskiej-Darmach, prof. uczelni z Instytutu Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS 16, 2018/31/B/NZ9/02433: „Wyjaśnienie kontrowersyjnej roli kwasu palmitooleinowego w dietoprofilaktyce zaburzeń homeostazy węglowodanów i lipidów” pod kierownictwem dr hab. Edyty Gendaszewskiej-Darmach, prof. uczelni.

Podstawę formalno-prawną wykonania recenzji stanowi Uchwała nr 100/2024 podjęta przez Radę do spraw Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia w dniu 9 lipca 2024 r. oraz pismo Dziekana Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej z dnia 5 września 2024 r.



Podstawowe dane o kandydatce

Pani mgr inż. Eliza Korkus (nazwisko rodowe Cichońska) uzyskała tytuł zawodowy magister na kierunku biotechnologia, w specjalności biotechnologia molekularna i biochemia techniczna na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej 13 września 2018 roku.

Po ukończeniu studiów doktoranckich została zatrudniona w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej na stanowisku asystenta badawczo-dydaktycznego.

Doktorantka w piśmie do prof. Andrzeja Marcinek, Przewodniczącego Rady do spraw Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia z dnia 2 lipca 2024 roku oświadczyła, że (cytuje): „*nie ubiegałam się o nadanie stopnia doktora w latach poprzednich w dyscyplinie Technologia żywności i żywienia*”.

Temat

Cukrzyca jest chorobą zagrażającą w coraz większym stopniu milionom ludzi na całym świecie. Jest określana jako choroba cywilizacyjna zagrażająca ludziom w każdym wieku i niestety obserwuje się stały wzrost liczby chorych lub nią zagrożonych. Wielu naukowców zajmuje się zagadnieniami dotyczącymi cukrzycy. Jest jednak wiele niewiadomych dotyczących przyczyny jej rozwoju, mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy glukozy, jak również skutecznych zaleceń profilaktycznych związanych, np. z odżywianiem. Dlatego podjęcie tematu związanego z oceną wpływu związków lipidowych owoców rokitnika na homeostazę glukozy w modelu mysich i ludzkich komórek β trzustki oraz komórek enteroendokrynych jelita uznaję za uzasadnione oraz naukowo i społecznie ważne.

Układ rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma typowy układ dla opracowania monograficznego.



Na pierwszych stronach rozprawy Doktorantka przedstawiła spis 7 artykułów, w których zostały opisane szerokie badania prowadzone przez zespół naukowców z różnych jednostek naukowych, w skład którego wchodzi także Doktorantka. Autorka podaje, że w artykułach tych są zamieszczone wyniki przedstawione w przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej, ale także wyniki badań innych badaczy, stąd nie stanowią one cyklu powiązanych artykułów Doktorantki. Do pracy nie załączono oświadczeń współautorów. W związku z powyższym niniejsza recenzja odnosi się tylko do wyników badań prowadzonych przez Doktorantkę przedstawionych w ocenianej rozprawie doktorskiej.

Rozprawa doktorska mgr inż. Eliza Korkus liczy 194 stron maszynopisu w tym 11 tabel i 79 rysunków. Zawiera rozbudowany spis treści, streszczenie w języku polski i angielskim oraz 10 rozdziałów takich jak: wstęp teoretyczny, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, wykaz stosowanych skrótów, spis tabel, spis rysunków, literatura. Mam zastrzeżenie do rozdziału 6. Wnioski, gdyż nie zawiera on wypunktowanych wniosków, tylko dwustronicowe podsumowanie pracy. W rozdziale Literatura natomiast znajduje się obszerny spis, który niestety nie jest ponumerowany. Z wyliczeń recenzenta wynika, że spis zawiera 262 pozycje. W większości są to najbardziej aktualne artykuły z ostatnich lat.

Tekst wraz z tabelami i rycinami jest przygotowany bardzo starannie, choć recenzent odnotował nieliczne błędy, jak np. używanie podobnej do angielskiej składni, np. „Podczas rozwoju insulinooporności w tkance tłuszczowej, hamowanie procesu lipolizy za pośrednictwem insuliny jest zmniejszone, co skutkuje zwiększeniem ilości krążących FFA.” (str. 18) czy stawianie kropek na końcu podpisów tabel i rysunków, co w języku polskim jest błędem, w przeciwieństwie do j. angielskiego.

Reasumując uważam, że przedstawiona rozprawa od strony formalnej spełnia wymogi pracy doktorskiej.

Ocena merytoryczna

Pierwszy rozdział dysertacji zawiera **wstęp** teoretyczny obszernie wprowadzający w temat badań. Autorka w czterech podrozdziałach przedstawiła szczegółowe informacje dotyczące:



patogenezy zespołu metabolicznego i jego następstw, kontroli homeostazy glukozy przez hormony trzustkowe, funkcji insuliny w narządach docelowych, wybranych czynników wpływających na wydzielanie insuliny z komórek β trzustki. Dodatkowo w dwóch podrozdziałach zamieściła informacje dotyczące kwasu palmitooleinowego i jego cech prozdrowotnych oraz rokitnika zwyczajnego jako bogatego źródła związków bioaktywnych. Wstęp zawiera wszystkie niezbędne informacje dotyczące tematyki badanych zagadnień przedstawione w logicznej formie, co świadczy o wysokiej wiedzy teoretycznej Doktorantki.

Cel

Doktorantka sformułowała główny cel naukowy prowadzonych badań jako „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 β trzustki oraz komórek enteroendokrynych jelita.”. Dodatkowo przedstawiła 7 celów szczegółowych, które usystematyzowały prace badawcze podjęte przez Doktorantkę. Cele pracy zostały przedstawione w sposób jasny i logiczny stanowiąc uzasadnienie podjętych badań, jednak brakuje w tym miejscu poprawnie sformułowanych założeń pracy i postawionej hipotezy; można się ich tylko domyślać.

Metodyka

W rozdziale **Materialy i metody** Doktorantka szczegółowo przedstawiła materiał badawczy, antagonistów receptorów GPCR i linie komórkowe (dwie linie komórek β trzustki (mysie komórki MIN6 i ludzkie komórki EndoC- β H1) oraz dwie linie enteroendokrynych komórek jelita (mysie GLUTag i ludzkie NCI-H716)). Dodatkowo wypunktowała odczynniki, testy, bufory oraz aparaturę wykorzystaną do badań.

Materiał badawczy stanowiły: oleosomy pozyskane z pięciu odmian rokitnika oraz oleje z mięszu owoców odmiany ‘Luczystaja’ otrzymane różnymi metodami, tj. przez tłoczenie na zimno, ekstrakcję CO₂ w warunkach nadkrytycznych, ekstrakcję heksanem i acetonem metodą Soxhleta, ekstrakcję heksanem z dodatkowym oczyszczaniem węglem aktywnym, estry etylowe kwasów tłuszczowych rokitnika otrzymane po ekstrakcji heksanem. Wymienione oleje były



badane zarówno przed jak i po lipolizie imitującej proces trawienia zachodzący w przewodzie pokarmowym człowieka. Doktorantka zakupiła i wykorzystała do badań także wzorcowe kwasy tłuszczowe i monoacyloglicerole charakterystyczne dla oleju z rokitnika po lipolizie. Dodatkowo badaniom poddała zsyntetyzowane trzy lizofosfatydylocholiny (LPC) zawierające w pozycji sn-1 łańcuchy acylowe izomerów *cis* i *trans* kwasu palmitooleinowego oraz kwasu palmitynowego.

Oleosomy oraz oleje przygotowane zostały na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie przez zespół naukowców współpracujący z Doktorantką, natomiast lizofosfatydylocholiny zawierające zróżnicowane reszty kwasów tłuszczowych – w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Rozdział zawiera także opis badań prowadzonych przez Doktorantkę w ramach pracy doktorskiej. Zakres tych opisów jest wystarczający do stwierdzenia, że Doktorantka dobrze opanowała warsztat badawczy i nabyła doświadczenie w prowadzeniu badań na liniach komórkowych w warunkach *in vitro*.

Wyniki i dyskusja

Doktorantka swoje badania rozpoczęła od określenia przeżywalności (po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji), a następnie monitorowania przepuszczalności błony komórkowej komórek β trzustki linii mysiej MIN6 oraz ludzkiej EndoC- β H1 pod wpływem oleosomów, olejów, wolnych kwasów tłuszczowych, monoacylogliceroli oraz lizofosfatydylocholin. Przeżywalność Doktorantka przedstawiła na czytelnych wykresach i wyznaczyła nietoksyczne stężenia badanych próbek do dalszych badań. Wyjaśniła cel eksperymentów dotyczących przepuszczalności błony, które przeprowadziła, aby upewnić się, że kolejne doświadczenia nie nastąpią w wyniku przerwania ciągłości błony. Po zastosowaniu stężenia 5 μ M dla lizofosfatydylocholin oraz 25 μ M dla pozostałych próbek wyniki wykazały, że po trzypięciominutowej inkubacji nie następowała znacząca perforacja błony komórek β trzustki w badanych warunkach eksperymentalnych. Autorka, po tych wstępnych badaniach oceniła zdolności badanych próbek do indukowania sekrecji insuliny w komórkach β trzustki badanych linii. Następnie oceniła aktywację receptorów GPCR (GPR40, GPR55, GPR119 i GPR120) zaangażowanych w utrzymanie homeostazy glukozy. Oznaczyła



poziom ekspresji receptorów w komórkach MIN6 oraz EndoC- β H1 i zbadała rolę receptorów GPCR w sekrecji insuliny wywołanej przez trawione oleje, kwasy tłuszczone, monoacyloglicerole i lizofosfatydylocholinę w komórkach wybranych linii. Monitorowała także poziom jonów wapnia wewnątrz komórek pod wpływem badanych frakcji pochodzących z materiału roślinnego oraz czystych związków oraz poziomu cyklicznego AMP (cAMP) w komórkach pod wpływem kwasów tłuszczowych i lizofosfatydylocholin (LPC). W ostatnim etapie badań Doktorantka przeprowadziła doświadczenia na enteroendokrynnych komórkach jelita wytwarzających hormon glukagonopodobnego peptydu 1 (GLP-1) wykorzystując mysie komórki GLUTag oraz ludzkie NCI-H716. Rozpoczęła ten etap badań od określenia przeżywalności komórek pod wpływem olejów z rokitnika przez i po ich trawieniu oraz pod wpływem izomerów *cis* i *trans* kwasu palmitooleinowego, a następnie oceniła zdolność indukowania wydzielania GLP-1 w badanych komórkach. Doktorantka poddała wyniki analizie statystycznej co umożliwiło przeprowadzenie właściwej ich interpretacji. Na podstawie opisanych wyników Doktorantka sprawnie przeprowadziła dyskusję dotyczącą aktywności insulintropowej oleosomów i olejów pochodzących z rokitnika oraz lizofosfatydylocholin zawierających resztę acylową pochodzącą od dwóch izomerów kwasu palmitooleinowego (POA). Przeanalizowała szlaki sygnałowe aktywowane pod wpływem izomerów *cis* i *trans* POA oraz działanie oleju i izomerów POA na komórki jelita. W dyskusji Autorka powołuje się na szeroką literaturę, w tym na artykuły zespołu, z którym Doktorantka publikowała wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej. Autorka wzbogaciła ten rozdział także w dyskusję wyników identyfikacji bioaktywnych związków zawartych w oleju z rokitnika otrzymanych przez zespół z Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Dyskusja wyników zamieszczonych w niniejszej rozprawie dowodzi, że zamierzony cel recenzowanej pracy został osiągnięty. Wyniki te zostały już opublikowane we współautorskich publikacjach, co oczywiście podnosi wartość rozprawy doktorskiej.

W rozdziale Wnioski Doktorantka przedstawiła **podsumowanie** znajdujące uzasadnienie w wynikach przeprowadzonych badań stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Do najważniejszych osiągnięć w ramach przedłożonej do oceny pracy doktorskiej zaliczam:



- udowodnienie, iż izomery *cis* i *trans* kwasu palmitooleinowego stymulują wydzielanie insuliny i działają przez receptory GPCR sprzężonych z białkiem G: GPR40, GPR55, GPR119 i GPR120. Aktywują jednak różne szlaki sekrecji insuliny: izomer *trans* skutecznie aktywuje GPCR zarówno poprzez białka Gq, jak i Gs, zwiększając odpowiednio wewnątrzkomórkowe stężenia Ca^{2+} i cAMP, podczas gdy izomer *cis* działa tylko przez Gq.
- wykazanie, że niska cytotoksyczność oraz potencjał insulinotropowy izomeru *trans*-POA daje możliwość wzbogacania żywności i suplementacji w celu przeciwdziałania cukrzycy i innym chorobom.
- wykazanie, że lizofosfatydylocholino z resztami acylowymi pochodzącymi od izomerów POA indukowały sekrecję insuliny na podobnym poziomie i odkryto preferencję wiązania tPOA-LPC do GPR119. Izomery POA-LPC aktywowały wydzielanie insuliny inicjując kaskadę Gs.
- udowodnienie, że olej z owoców rokitnika zwyczajnego wykazuje potencjał insulinotropowy, a jego właściwości przeciwcukrzycowe są związane z aktywnością FFA działających jako ligandy dla GPCR trzustki.

Rozprawa doktorska dowodzi, że **Doktorantka ma szeroką wiedzę z zakresu badań biologicznych i potrafi samodzielnie rozwiązać problem naukowy** oraz analizować, interpretować i opracować otrzymane wyniki. **Rozprawa** zawiera elementy nowości naukowej i **stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**. Cel pracy został osiągnięty. Badania Doktorantki mają zarówno aspekt poznawczy, jak i aplikacyjny.

Stwierdzam zatem, że **rozprawa doktorska 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” **spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w świetle obowiązujących przepisów**. W związku z tym, wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Elizy Korkus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Elizy Korkus