

Warszawa, dn. 13.10.2023r.

dr hab. Małgorzata Wroniak, prof. SGGW
Zakład Technologii Tłuszczów i Koncentratów Spożywczych
Katedra Technologii i Oceny Żywności
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marii Magdaleny Kasprzak
pt. **"Cytotoksyczność stigmasterolu, estrów stigmasterolu i produktów ich termiczno-
oksydacyjnej degradacji w badaniach *in vitro*"**
wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
oraz w Katedrze Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Anny Olejnik
oraz prof. dr hab. Magdaleny Rudzińskiej

Podstawą sporządzenia recenzji jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 28 września 2023 r. Recenzję wykonano zgodnie z wytycznymi określonymi w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

Rozprawa doktorska mgr inż. Marii Magdaleny Kasprzak skupia się na identyfikacji i ilościowym oznaczeniu produktów termiczno-oksydacyjnych przemian stigmasterolu i jego estrów z kwasem linolowym i oleinowym. W badaniach *in vitro* oceniono poziom ich cytotoksyczności i genotoksyczności dla ludzkich prawidłowych komórek układu pokarmowego. Oznaczono potencjał mutageny i promutageny analizowanych związków z zastosowaniem zmutowanych szczepów bakterii i enzymów frakcji mikrosomalnej. Analizowano również ich wpływ na integralność i funkcjonalność bariery jelitowej.

Powszechnie wiadomo, że sterole roślinne są cennymi składnikami żywności, towarzyszą lipidom pochodzenia roślinnego. Fitosterole i ich estry są wykorzystywane jako funkcjonalne dodatki do żywności ze względu na ich właściwości obniżania poziomu cholesterolu we krwi. Skuteczną, a zarazem bezpieczną dawkę tych związków w diecie ustalono na poziomie 3 g/dzień. Stigmasterol zyskuje coraz większe zainteresowanie konsumentów i producentów żywności funkcjonalnej z uwagi na szereg właściwości prozdrowotnych o istotnym znaczeniu dla prewencji wielu chorób. Badania *in vivo* wykazały, że stigmasterol ma zdolność modulowania metabolizmu cholesterolu skutecznie obniżając

poziom cholesterolu całkowitego i frakcji LDL oraz stężenia triglicerydów w osoczu. Wykazano również jego działanie przeciwnotworowe, potencjał leczniczy w chorobie zwyrodnieniowej stawów, działanie przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, neuroprotektoryjne, przeciwutleniające, przeciwcukrzycowe, immunomodulujące. Oprócz korzystnych właściwości biologicznych fitosteroli, opisywane są również potencjalne negatywne skutki działania na organizm człowieka. Okazuje się, że żywność po obróbce termicznej może stanowić źródło produktów termicznej degradacji fitosteroli, w tym pochodnych utleniania oraz związków niskocząsteczkowych, takich jak substancje lotne i oligomery o słabo udokumentowanej biodostępności i bezpieczeństwie dla organizmu. W literaturze niewiele jest doniesień naukowych o bioaktywności pochodnych fitosteroli generowanych podczas obróbki termicznej i przechowywania żywności. Z uwagi na rosnące spożycie steroli, zapewnienie ich bezpieczeństwa zdrowotnego jest bardzo ważnym wyzwaniem dla producentów żywności. Przedstawiana do recenzji praca stanowi zatem odpowiedź na potrzebę badań nad działaniem fitosteroli w organizmie człowieka w aspekcie ich bezpośredniego wpływu na komórki i tkanki układu pokarmowego oraz bezpieczeństwa toksykologicznego. Uważam zatem wybór tematu i zakresu badań niniejszej pracy za trafny i bardzo aktualny, szczególnie w dobie dbania o wysoką jakość i bezpieczeństwo żywności.

Warto podkreślić, że praca została wykonana w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki nr 2015/17/B/NZ9/01535 w konkursie Opus 9 w latach 2016-2020.

Ocena układu rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma charakter eksperymentalny. Rozprawa ma 126 stron i obejmuje 8 rozdziałów w typowym (dla tego typu prac) układzie: streszczenie (w języku polskim i angielskim) (4 strony), wprowadzenie z przeglądem literatury (19 stron), cel pracy i zakres badań (3 strony), materiały i metodyka badań (19 stron), wyniki badań i dyskusja (50 stron), podsumowanie (5 stron), wnioski (2 strony), spis literatury (14 stron) i załączniki: spis tabel i rysunków (4 strony), dorobek naukowy (1 strony). W treści pracy zawarty jest 31 rysunków oraz 11 tabel. Do przygotowania pracy Autorka wykorzystowała 144 pozycje literaturowe. Piśmiennictwo jest głównie anglojęzyczne, a prace pochodzące z ostatniej dekady stanowią 60%. Praca przygotowana jest bardzo starannie, napisana jest poprawnym językiem, zdarzają się tylko nieliczne błędy edytorskie. Uzyskane wyniki badań poddane zostały analizie statystycznej i poprawnie zaprezentowane w czytelnych i starannie przygotowanych tabelach i rycinach. Układ pracy, podział na rozdziały jest prawidłowy i typowy. Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania formalne stawiane pracom dyplomowym na stopień doktora.

Ocena przeglądu literatury

Cześć literaturowa, ujęta została na 19 stronach w 5 podrozdziałach. Autorka najpierw scharakteryzowała fitosterole, ich biodostępność, metabolizm i bezpieczeństwo. Następnie skupiła się na omówieniu stigmasterolu i jego aktywności biologicznej. A na koniec po krótko przedstawiła produkty przemian oksydacyjnych fitosteroli. Podsumowując stwierdzam, że opracowanie literaturowe, zostało dobrze zaplanowane i przygotowane. Do jego przygotowania wykorzystano liczne aktualne piśmiennictwo naukowe. Szkoda jednak, że nie wspomniano w tym rozdziale o liczności dostępnych badań *in vitro*, *in vivo* i klinicznych dotyczących cytotoksyczności czy mutagenności oksysteroli na przestrzeni ostatnich lat, pokazujących popularność tego tematu i w jakim obszarze brakuje doniesień literaturowych. Przydałaby się również krótka charakterystyka tradycyjnych i nowoczesnych metod badawczych (wykorzystanych również w pracy) a określających działanie cytotoksyczne, genotoksyczne, czy mutagenne różnych związków.

W odniesieniu do tej części pracy mam kilka pytań: Proszę wyjaśnić, czym się kierowano wybierając jako materiał do badań akurat stigmasterol? który przecież nie jest najpopularniejszym z przedstawicieli tej grupy związków? Czym wyróżnia się ten związek i jego pochodne? Dlaczego nie β -sitosterol? Aktywność biologiczna którego ze steroli jest największa? Jaki udział w diecie wśród fitosteroli ogółem ma stigmasterol?

Ocena celu pracy

Celowość przedsięwziętych badań Autorka przedstawiła i uzasadniła w rozdziale „Cel pracy i zakres badań”. Sprecyzowano tu główny cel pracy, którym była identyfikacja produktów termiczno-oksydacyjnych przemian stigmasterolu i jego estrów oraz analiza ich cytotoksyczności, genotoksyczności i mutagenności. Dalej natomiast podano cele szczegółowe m.in. synteza estrów stigmasterolu z kwasem linolowym i oleinowym oraz ich obróbka termiczna w warunkach tlenowych, charakterystyka chemiczna stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu oraz identyfikacja produktów przemian termiczno-oksydacyjnych, analiza cytotoksyczności i genotoksyczności stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu oraz produktów ich termiczno-oksydacyjnych przemian w odniesieniu do ludzkich prawidłowych komórek nabłonka jelitowego i wątroby, ocena wpływu stigmasterolu, jego estrów i produktów ich przemian termiczno-oksydacyjnych na integralność i funkcjonalność nabłonka jelitowego *in vitro* oraz analiza aktywności mutagennej i promutagennej stigmasterolu, jego estrów i produktów powstających podczas obróbki termiczno-oksydacyjnej.

W pracy przedstawiono sześć hipotez badawczych. W mojej opinii cel i zadania badawcze zostały prawidłowo określone i w pełni odpowiadają tematowi rozprawy.

Ocena metod badawczych

Część doświadczalna pracy obejmuje rozdział „Materiał i metody”, w którym podano charakterystykę użytych związków, a następnie opisano metody analityczne i statystyczne. Przedstawiony przez Doktorantkę czytelny schemat organizacji doświadczeń z podziałem na trzy etapy wskazuje na konsekwencję w podejmowaniu kolejnych badań, które są powiązane z wynikami przeprowadzonych wcześniej eksperymentów. W analizowanych próbkach (stigmasterolu i jego estrów przed i po ogrzewaniu w 60°C i 180°C w warunkach tlenowych) oznaczono m.in. zawartość stigmasterolu, zawartość kwasów tłuszczowych, produktów degradacji stigmasterolu i jego estrów, oligomerów. Szczególnie interesujące są zastosowane liczne i nowoczesne testy dotyczące określenia cytotoksyczności stigmasterolu i jego estrów (w różnych stężeniach od 1,25 do 40 µg/ml) dla komórek układu pokarmowego *in vitro*, określenia genotoksyczności, potencjału mutagennego i promutagennego, oznaczenie reaktywnych form tlenu, aktywności kaspaz-3/7, cyklu komórkowego, czy określenie wpływu stigmasterolu i estrów stigmasterolu na nabłonek jelitowy Caco-2. Poszczególne procedury postępowania, metody i testy zostały szczegółowo opisane. Zakres przeprowadzonych analiz wydaje mi się bardzo szeroki i oryginalny. Podsumowując stwierdzam, że przedstawiony w pracy materiał do badań i metody badań są odpowiednie, zostały dobrze dobrane i wyczerpująco scharakteryzowane.

W odniesieniu do tej części pracy mam kilka pytań: Jak bardzo pracochłonne były przeprowadzone hodowle komórek, tkanek oraz testy cytotoksyczności, genotoksyczności i mutagenności? Jaki był koszt tych analiz? Czy w toku badań natrafiono na jakies trudności analityczne?

Ocena omówienia wyników i dyskusji

Najobszerniejszą część pracy stanowi rozdział „Wyniki badań i dyskusja”, który podzielono na 10 podrozdziałów. Każdy z nich przedstawia wyniki odpowiadające realizacji postawionych wcześniej celów szczegółowych pracy. Tj. m.in. określenie wpływu obróbki termicznej na stopień degradacji stigmasterolu, na tworzenie oksypochodnych i oligomerów, a następnie określenie ich cytotoksyczności, genotoksyczności i mutagenności. Stwierdzam, że otrzymane w toku badań wyniki zostały poprawnie zaprezentowane w 11 tabelach i na 31 rysunkach, z uwzględnieniem analizy statystycznej (Anova). Szeroki zakres badań i przeprowadzonych analiz pozwolił Autorce na uzyskanie szerokiego spektrum wyników, co

stanowi solidną podstawę do szczegółowej charakterystyki wolnego stigmasterolu i jego estrów a także produktów jego termicznej degradacji. Należy tu podkreślić, że jest niewiele doniesień dotyczących badania bioaktywności pochodnych steroli powstających podczas ogrzewania, smażenia i przechowywania żywności, a szczególnie ich wpływu na komórki układu pokarmowego i toksyczności dla organizmu człowieka, zatem uzyskane wyniki stanowią ważny wkład do literatury naukowej w tym zakresie. W mojej opinii wartość merytoryczna pracy jest wysoka, uważam, że uzyskane wyniki są oryginalne, zostały wyczerpująco omówione i przedyskutowane z dostępną literaturą naukową dotyczącą tematu. Rozwiązano bardzo istotny problem badawczy określenie toksyczności produktów degradacji stigmasterolu na układ pokarmowy w badaniach *in vitro*.

W odniesieniu do tej części pracy proszę o odpowiedź na pytania: 1) Z czego wynika niejednoznaczność otrzymanywnych wyników prezentowanych w literaturze? Czy winne są stosowane testy? Jakie czynniki wpływają na wiarygodność, poprawność, powtarzalność wyników badań prowadzonych *in vitro*, *in vivo* i klinicznych. Czy są jakieś wyniki badań klinicznych lub przedklinicznych dotyczących wpływu innych fitosteroli i ich produktów utlenionych pochodnych na organizm człowieka, szczególnie układ pokarmowy?

Ocena podsumowania i wniosków

W rozdziale "Wnioski" na 2 stronach Autorka przedstawiła dziesięć bardzo zwięzłych stwierdzeń i wniosków, wynikających bezpośrednio z przeprowadzonych badań. Autorka wykazała, że ogrzewanie stigmasterolu oraz jego estrów w temperaturze 180°C generuje największą ilość produktów degradacji i oksypochodnych. Stwierdziła, że estry stigmasterolu są bardziej stabilne podczas obróbki termiczno-oksydacyjnej niż stigmasterol niezestryfikowany, a wolny stigmasterol charakteryzuje się znacznie większą cytotoxycznoscia niż stigmasterol zestryfikowany. Estrы stigmasterolu charakteryzują się znacznie mniejszą cytotoxycznoscia dla komórek nabłonka jelita cienkiego i grubego oraz wątroby niż wolny stigmasterol. Potencjał cytotoxyczny wolnego stigmasterolu ulega obniżeniu na skutek ogrzewania w temperaturze 180°C, co prawdopodobnie jest związane z termiczną degradacją cząsteczki stigmasterolu. Stigmasterol i jego estrы z kwasem linolowym i oleinowym, niezależnie od obróbki termiczno-oksydacyjnej, nie wykazują działania genotoksyčnego, mutagennego czy promutagennego. W efekcie chronicznego narażenia komórek jelitowych na linolan stigmasterolu może dochodzić do zaburzenia integralności nabłonka jelitowego i osłabienia ekspresji genów kodujących białkowe składniki połączeń międzykomórkowych w nabłonku. Natomiast oleinian stigmasterolu nie wykazuje negatywnego wpływu na barierę jelitową; nie wpływa na integralność, przesiąkliwość

i ścisłość połączeń międzykomórkowych w nabłonku jelitowym. Ogólnie rzecz biorąc w pracy wykazano, że stigmasterol i związki stigmasterolu oraz produkty ich przemian termiczno-oksydacyjnych mogą wywoływać niekorzystne efekty zdrowotne. Stwierdzono, że badania toksykologiczne powinny być kontynuowane, aby dostarczyć dowodów na bezpieczeństwo i prozdrowotne działanie stigmasterolu i jego pochodnych oraz żywności funkcjonalnej zawierającej te związki. Zaprezentowane wnioski odnoszą się do celu pracy i postawionych celów szczegółowych oraz wskazują na pełną realizację zaplanowanych badań.

Podsumowując stwierdzam, że zaplanowane przez Doktorantkę bardzo obszerne badania zostały konsekwentnie zrealizowane, cel pracy został osiągnięty, a zadania badawcze wykonane. Postawione hipotezy zostały zweryfikowane. Otrzymane liczne wyniki badań, oznaczeń i licznych testów zostały poddane odpowiedniej analizie statystycznej, zostały starannie zaprezentowane, skrupulatnie omówione i poddane dyskusji z literaturą. Na ich podstawie sformułowano poprawne podsumowanie i wnioski. Badania dostarczają wartościowych informacji teoretycznych dotyczących przemian fitosteroli w czasie ogrzewania i przechowywania żywności, w tym szczególnie z zakresu cytotoxycywności, genotoksywności, mutagenności produktów termiczno-oksydacyjnych przemian stigmasterolu i jego estrów z kwasem linolowym i oleinowym. Należy jasno podkreślić, że przedstawione w recenzji uwagi i spostrzeżenia miały na celu doskonalenie warsztatu naukowo-badawczego Autorki.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr inż. Marii Magdaleny Kasprzak stanowi interesujące i innowacyjne opracowanie naukowe. Praca przyczynia się do poszerzenia wiedzy z zakresu nauk o żywności i żywieniu, jest oryginalnym ujęciem podjętego problemu. Praca została zrealizowana przy pomocy bardzo dobrze dobranych, nowoczesnych, instrumentalnych technik badawczych, dowodzi, że Autorka opanowała warsztat badawczy, potrafi stawiać i rozwiązywać problemy badawcze, co pozwala na samodzielne prowadzenie badań naukowych, a dodatkowo wskazuje na szeroką wiedzę teoretyczną w reprezentowanym temacie.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca Pani Marii Magdaleny Kasprzak pt. "Cytotoxycywność stigmasterolu, estrów stigmasterolu i produktów ich termiczno-oksydacyjnej degradacji w badaniach *in vitro*" spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wytycznymi określonymi w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. z 2020 r. poz. 85

z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Wroniak