



UNIwersytet Rolniczy
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Technologii Żywności
Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki

Dr hab. inż. Aneta Koronowicz, prof. URK
Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Kraków, 26.11.2024 r.

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Marii Zielińskiej-Wasielica

pt. " Potencjał biologiczny ekstraktów z owoców czarnego bzu (*Sambucus nigra L.*) i czarnej porzeczki (*Ribes nigrum L.*) w odniesieniu do otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych - badania in vitro",

wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,

Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu,

pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Anny Olejnik

Podstawę prawną wykonania recenzji stanowi pismo Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Pana prof. dr hab. Pawła Cyplika (z dnia 23.10.2024 r.), zgodnie z Uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia podjętą w dniu 25.15.2023 roku.

Rozprawa doktorska Pani **mgr inż. Joanny Marii Zielińskiej-Wasielica** zatytułowana „Potencjał biologiczny ekstraktów z owoców czarnego bzu (*Sambucus nigra L.*) i czarnej porzeczki (*Ribes nigrum L.*) w odniesieniu do otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych - badania in vitro” została przygotowana w postaci monografii liczącej ogółem 187 stron. Praca dotyczy niezwykle istotnej i aktualnej problematyki otyłości oraz związanych z nią zaburzeń metabolicznych. Autorka podjęła próbę oceny bioaktywności ekstraktów z owoców czarnego bzu i czarnej porzeczki w kontekście ich wpływu na procesy związane z otyłością. Temat jest istotny naukowo i społecznie, co podkreśla potrzebę dalszych badań w tej dziedzinie.

Struktura i układ pracy

Dysertacja cechuje się prawidłową strukturą, typową dla standardów empirycznej rozprawy naukowej.

Rozdział 1: Przegląd literatury wprowadza w tematykę otyłości, charakterystykę czarnego bzu i czarnej porzeczki, oraz ich potencjał biologiczny.

Rozdział 2: Hipotezy badawcze i cele pracy są jasno sformułowane, co wskazuje na świadome zaplanowanie badań.

Rozdział 3: Materiały i metody badań są opisane szczegółowo, co umożliwia ich replikację.

Rozdział 4: Wyniki badań są zaprezentowane w sposób klarowny, wsparte 45 wykresami i 6 tabelami.

Rozdział 5: Dyskusja stanowi pogłębioną analizę uzyskanych wyników w kontekście literatury przedmiotu.

Rozdział 6: Wnioski są zwięzłe i trafnie podsumowują najważniejsze ustalenia

Rozdział 7. Spis bibliograficzny obejmuje 168 pozycji piśmiennictwa, związanych z tematem podjętej rozprawy doktorskiej.

Przegląd literatury

Autorka dokonała szczegółowego przeglądu literatury dotyczącej mechanizmów adipogenezy, roli białej tkanki tłuszczowej w zdrowiu metabolicznym oraz właściwości biologicznych badanych owoców. Przytoczone źródła są aktualne i obejmują zarówno klasyczne opracowania, jak i najnowsze badania. Można jednak zasugerować szersze uwzględnienie badań klinicznych dotyczących zastosowania naturalnych ekstraktów w leczeniu otyłości.

Hipotezy badawcze i Cele pracy

W pracy sformułowano 7 hipotez badawczych (cyt) „**H1.** Związki polifenolowe zawarte w owocach czarnego bzu i czarnej porzeczki charakteryzują się biodostępnością na poziomie wystarczającym do wywołania efektów prozdrowotnych o istotnym znaczeniu dla prewencji i terapii otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych; **H2.** Ekstrakty z czarnego bzu i czarnej porzeczki wykazują wysoki potencjał antyoksydacyjny, który może prowadzić do ograniczenia poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach tłuszczowych; **H3.** Ekstrakty z owoców czarnego bzu i czarnej porzeczki wpływają na proces adipogenezy i lipogenezy oraz na metabolizm lipidów w komórkach tłuszczowych; **H4.** Ekstrakty z owoców czarnego bzu i czarnej porzeczki modulują ekspresję leptyny i adiponektyny, przez co mogą wspierać homeostazę metaboliczną oraz redukować insulinooporność; **H5.** Ekstrakty z czarnego bzu i czarnej porzeczki mogą osłabiać insulinooporność i poprawiać wychwyt glukozy w adipocytach; **H6.** Ekstrakty z czarnego bzu i czarnej porzeczki mają zdolność do ograniczania absorpcji tłuszczów i węglowodanów poprzez hamowanie aktywności enzymów trawiennych; **H7.**

Ekstrakty z owoców czarnego bzu i czarnej porzeczki wykazują właściwości przeciwzapalne poprzez modulowanie produkcji cytokin i mediatorów prozapalnych, co może wpływać na łagodzenie przewlekłego stanu zapalnego związanego z otyłością.

Hipotezy badawcze są powiązane z celami pracy a ich weryfikacja za pomocą eksperymentów pozwala na kompleksową ocenę biologicznego potencjału ekstraktów. Każdy cel badawczy odnosi się do konkretnego aspektu działania ekstraktów, co nadaje pracy spójność i przejrzystość

Główny cel badań (cyt.) „*analiza potencjału biologicznego ekstraktów z owoców czarnego bzu i czarnej porzeczki w odniesieniu do otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych*” został zrealizowany w oparciu o następujące cele szczegółowe tj. (cyt.) „**C1.** *Charakterystyka profilu polifenoli w ekstraktach z owoców czarnego bzu i czarnej porzeczki oraz ocena ich potencjalnej biodostępności; C2.* *Analiza wpływu ekstraktów na proces adipogenezy i lipogenezy z zastosowaniem preadipocytów różnicujących w dojrzałe komórki tłuszczowe; C3.* *Analiza działania ekstraktów na dojrzałe adipocyty z uwzględnieniem ich wpływu na gromadzenie lipidów, poziom reaktywnych form tlenu, produkcję adipokin, wychwyt glukozy i wrażliwość na insulinę oraz stan zapalny; C4.* *Ocena przeciwzapalnej aktywności ekstraktów w modelu makrofagów aktywowanych do odpowiedzi zapalnej; C5.* *Ocena zdolności ekstraktów do ograniczania aktywności enzymów trawiennych*”.

Metody badawcze

Badania zostały zrealizowane w ramach projektu nr 2015/19/B/NZ9/01054 w konkursie OPUS 10 finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w latach 2016 - 2020”.

Zastosowana metodologia jest szczegółowo opisana i adekwatna do postawionych hipotez badawczych. Autorka do realizacji założeń pracy użyła modele badawcze *in vitro*, w tym: 1) preadipocyty różnicujące w komórki tłuszczowe, 2) dojrzałe adipocyty insulinooporne oraz w stanie zapalnym, 3) makrofagi RAW 264.7 aktywowane do odpowiedzi zapalnej. Badania obejmowały analizę ekspresji genów oraz białek kluczowych dla procesów adipogenezy, lipogenezy, lipolizy i stanu zapalnego, co umożliwiło kompleksową ocenę wpływu ekstraktów na badane procesy. Wykorzystanie technik takich jak analiza ekspresji genów (qPCR) oraz ocena właściwości antyoksydacyjnych i enzymatycznych potwierdza wysoką jakość warsztatu badawczego.

Wyniki badań

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób szczegółowy i spójny; zaprezentowane w postaci 45 rycin i 6 wykresów. Kluczowe obserwacje obejmują:

- Hamowanie adipogenezy i lipogenezy- ekstrakty skutecznie obniżały ekspresję genów związanych z adipogenezą (*Pparγ*, *C/ebpa* i *Srebp1*) oraz genów odpowiedzialnych za lipogenezę (*Fabp4/aP2*, *Lpl*, *Fas*), co doprowadziło do ograniczenia akumulacji lipidów w adipocytach.
- Działanie przeciwzapalne- ekstrakty redukowały ekspresję prozapalnych cytokin oraz mediatorów stanu zapalnego (IL-6, TNF- α , MCP-1, *Ptgs2*, *iNos*), a także obniżały aktywację NF κ B w makrofagach i adipocytach hipertroficznym.
- Wpływ na wychwyt glukozy- poprawa wychwytu glukozy przez adipocyty insulinooporne, szczególnie w przypadku ekstraktu z czarnego bzu, była związana ze wzrostem ekspresji mRNA transportera glukozy (*Glut-4*).
- Potencjał antyoksydacyjny- obniżenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) poprzez hamowanie ekspresji oksydazy NADPH (*NOX4*) i wzmacnianie ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej (*SOD2*) i peroksydazy glutationowej (*GPx*).
- Inhibicja enzymów trawiennych- ekstrakty hamowały aktywność kluczowych enzymów trawiennych (α -amylaza, α -glukozydaza, i lipaza trzustkowa).

Interpretacja wyników jest przejrzysta i dobrze odnosi się do aktualnej literatury. Wartościowym aspektem pracy jest wskazanie różnic w mechanizmach działania ekstraktów z czarnego bzu i czarnej porzeczki.

Dyskusja i podsumowanie

Rozdział „Dyskusja” w pracy doktorskiej jest kluczowym elementem pracy, w którym Doktorantka łączy wyniki swoich badań z dostępnymi w literaturze wynikami innych autorów, interpretując je w kontekście dotychczasowej wiedzy na temat otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych. W tej części pracy Autorka wykazuje umiejętność krytycznej analizy uzyskanych wyników, w pełni odnosząc je do hipotez postawionych na początku badań. Rozdział jest mocny pod względem integracji wyników z mechanizmami molekularnymi i patofizjologicznymi otyłości.

W dyskusji zawarte są też przesłanki dotyczące możliwych mechanizmów działania bioaktywnych składników czarnego bzu i czarnej porzeczki. Omówiono potencjalne działanie polifenoli i innych bioaktywnych związków obecnych w tych roślinach, które mogą wyjaśniać ich zdolność do regulowania adipogenezy, redukcji stresu oksydacyjnego i modulacji odpowiedzi zapalnej. Jednak warto zaznaczyć, że niektóre z proponowanych mechanizmów mogłyby być bardziej rozwinięte. Można by wskazać więcej konkretnych szlaków molekularnych, w tym roli specyficznych receptorów, enzymów i białek, które mogą być zaangażowane w obserwowane efekty. Rozszerzenie tej części pracy o bardziej szczegółowe spekulacje na temat mechanizmów molekularnych, przy użyciu literatury dotyczącej bioaktywności związków roślinnych, mogłoby wzbogacić tę sekcję.

Wnioski

W pracy zawarto 8 wniosków, które wynikają z analizy wyników i stanowią odpowiedź na postawione cele pracy. Wnioski są kompleksowe, wieloaspektowe i w pełni odpowiadają na pytania postawione na początku pracy. Wskazują na wielokierunkowe działanie ekstraktów i podkreślają ich potencjał jako składników wspomagających terapię otyłości. Ponadto podkreślenie praktycznego aspektu badań zwiększa naukową i aplikacyjną wartość pracy.

Bibliografia

Bibliografia obejmuje obszerny zestaw źródeł, co świadczy o szerokiej kwerendzie literaturowej przeprowadzonej przez Autorkę rozprawy. Większość cytowanych prac pochodzi z renomowanych czasopism naukowych, takich jak *Nature*, *Journal of Nutrition*, czy *Obesity Reviews*. Zawarto również odniesienia do raportów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) oraz innych źródeł o wysokim poziomie wiarygodności. Znaczna część źródeł pochodzi z ostatniej dekady (2013–2023), co świadczy o uwzględnieniu najnowszych badań i trendów naukowych. Cytowanie klasycznych prac (np. z lat 1990–2010) jest odpowiednie i uzasadnione tam, gdzie odniesienia do podstawowych mechanizmów biologicznych lub metodologii są niezbędne.

Mocne strony pracy

- Nowatorstwo - praca wnosi istotny wkład do wiedzy o potencjale terapeutycznym ekstraktów roślinnych w kontekście otyłości i zaburzeń metabolicznych.
- Rzetelność naukowa - badania zostały przeprowadzone z użyciem nowoczesnych technik i na modelach *in vitro* dobrze odzwierciedlających procesy zachodzące w ludzkim organizmie.
- Kompleksowe podejście – badania obejmują szeroką ocenę wpływu ekstraktów z czarnego bzu i czarnej porzeczki na procesy anti-adipogenne, przeciwzapalne i antyoksydacyjne.
- Praktyczne implikacje- wyniki sugerują, że ekstrakty mogą znaleźć zastosowanie w terapii otyłości, co jest istotne z punktu widzenia zdrowia publicznego.

Słabe strony pracy

- Chociaż praca przedstawia dane ilościowe, brakuje głębszej analizy porównawczej między ekstraktami z czarnego bzu a czarnej porzeczki w poszczególnych modelach.
- W części dyskusyjnej można byłoby bardziej szczegółowo odnieść się do ograniczeń badania i perspektyw dalszych prac.

Podsumowanie i rekomendacje

Wyniki badań przedstawione w rozprawie doktorskiej stanowią istotny wkład dla rozwoju

dyscypliny naukowej technologia żywności i żywienia, szczególnie w zakresie zastosowania naturalnych związków bioaktywnych w prewencji i leczeniu otyłości. Pani mgr inż. Joanna Zielińska-Wasielica wykazała się wysokim poziomem umiejętności badawczych, rzetelnością naukową oraz zdolnością do krytycznej analizy wyników. Praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, a jej wyniki mają znaczenie nie tylko teoretyczne, ale także potencjalnie praktyczne. Na tej podstawie stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska pt. „*Potencjał biologiczny ekstraktów z owoców czarnego bzu (*Sambucus nigra* L.) i czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) w odniesieniu do otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych - badania *in vitro*”*” spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz Przepisach wprowadzających ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2018 poz. 1669).

Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Zielińskiej-Wasielica do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie biorąc pod uwagę aktualność badań, metodologiczną wartość rozprawy oraz jej wysoki poziom naukowy i merytoryczny wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

dr hab. inż. Aneta Koronowicz, prof. URK

Krytyczne uwagi

1. Zakres badań *in vitro*

Praca opiera się wyłącznie na modelach *in vitro* oraz na wykorzystaniu ekstraktów z badanego materiału roślinnego. Jest to standardowe podejście w badaniach eksploracyjnych, ale ma swoje ograniczenia w odniesieniu do fizjologicznych procesów zachodzących w organizmie.

Pytanie: Czy rozważano rozszerzenie badań na liniach komórkowych 3T3-L1, RAW 264.7. ale w warunkach bardziej zbliżonych do fizjologicznych tj. po trawieniu *in vitro* i wchłanianiu? tym bardziej, że wyznaczono współczynnik przenikalności P_{app} . Ponadto czy rozważano użycie do takiego badania owoców zamiast ekstraktów z owoców?

2. Różnice między ekstraktami czarnego bzu i czarnej porzeczki

W pracy brak szczegółowej analizy różnic między mechanizmami działania ekstraktów z czarnego bzu i czarnej porzeczki. Choć oba ekstrakty wykazują podobne właściwości biologiczne, zidentyfikowane różnice w ich aktywności nie zostały dostatecznie omówione.

Pytanie: *Czym kierowano się przy doborze owoców do badania oraz czy możliwe jest zastosowanie mieszanki ekstraktów, która mogłaby wzmacniać ich działanie biologiczne?*

3. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wspomniana w metodologii, jednak w jej przedstawieniu są obszary, które można ulepszyć:

- Brak szczegółowych informacji o zastosowanych testach statystycznych w odniesieniu do każdego zestawu wyników i weryfikacji ich założeń

Pytanie: *Czy przed zastosowaniem testów parametrycznych przeprowadzono testy sprawdzające normalność rozkładu oraz homogeniczność wariancji. Nie wspomniano, jak postępowano w przypadku, gdy założenia testów parametrycznych nie były spełnione.*

- Wykresy przedstawiają wyniki bez podania informacji o liczbie próbek (n).

4. Test MTT

W pracy doktorskiej test MTT został opisany jako metoda oceny żywotności, proliferacji i cytotoksyczności komórek. Chociaż test jest szeroko stosowany w badaniach biologicznych to warto zwrócić uwagę na pewne aspekty, które wymagają doprecyzowania.

Pytanie: *Czy test był używany do oceny żywotności, cytotoksyczności, czy proliferacji i w jaki sposób interpretowano uzyskane wyniki? Czy i jakie są ograniczenia tej metody, szczególnie w odniesieniu do interpretacji wyników?*

Uzasadnienie wyróżnienia rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Zielińskiej-Wasielicy pt. „*Potencjał biologiczny ekstraktów z owoców czarnego bzu (Sambucus nigra L.) i czarnej porzeczki (Ribes nigrum L.) w odniesieniu do otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych – badania in vitro*”.

1. Znaczenie tematu

- Praca podejmuje aktualny i ważny problem otyłości oraz jej metabolicznych konsekwencji, będących jednym z największych wyzwań zdrowia publicznego.
- Wykorzystanie naturalnych ekstraktów z czarnego bzu i czarnej porzeczki jako potencjalnych narzędzi w prewencji i terapii otyłości stanowi istotny wkład w rozwój nauk o żywności i żywieniu.
- Badania nad biologiczną aktywnością ekstraktów roślinnych w kontekście mechanizmów molekularnych otwierają nowe kierunki w poszukiwaniu skutecznych metod wspomagających leczenie otyłości.

2. Wysoki poziom metodologiczny

Praca wyróżnia się zastosowaniem szerokiego zakresu zaawansowanych metod badawczych, takich jak:

- analiza składu chemicznego ekstraktów metodą HPLC-DAD-ESI-MS, umożliwiającą dokładną identyfikację bioaktywnych związków fenolowych.
- eksperymenty na liniach komórkowych 3T3-L1 i RAW 264.7, które są uznawanymi modelami badania adipogenezy i zapalenia.
- ocena ekspresji genów metodą Real-Time PCR, co pozwoliło na identyfikację mechanizmów molekularnych działania ekstraktów.
- zastosowanie symulowanego trawienia żołądkowo-jelitowego oraz oceny biodostępności składników aktywnych w modelu Caco-2, podkreśla kompleksowość podejścia do problematyki badawczej.

3. Spójność i wysoki poziom merytoryczny

- Praca wyróżnia się logiczną strukturą i klarownością wywodu naukowego. Każdy rozdział jest dobrze osadzony w literaturze i spójnie prowadzi do wniosków, które odpowiadają na postawione pytania badawcze.
- Dyskusja wyników świadczy o głębokiej znajomości tematu, zdolności do krytycznej analizy oraz umiejętności interpretacji danych w kontekście aktualnej wiedzy naukowej.

4. Praktyczne znaczenie pracy

- Badania przedstawione w pracy mają istotne znaczenie aplikacyjne. Wskazują na potencjał ekstraktów z czarnego bzu i czarnej porzeczki jako naturalnych składników diety, które mogą wspierać walkę z otyłością i jej metabolicznymi konsekwencjami.
- Praca stanowi podstawę do dalszych badań, w tym eksperymentów in vivo i badań klinicznych, które mogą prowadzić do rozwoju nowych produktów o właściwościach prozdrowotnych.

5. Dojrzałość naukowa

- Autorka wykazała się umiejętnością integrowania interdyscyplinarnej wiedzy z zakresu biotechnologii, biologii komórki i nauk o żywieniu.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Zielińskiej-Wasielicy wyróżnia się holistycznym podejściem do tematu, wysokim poziomem metodologicznym oraz znaczącym potencjałem praktycznym. Wyniki badań mają realne znaczenie dla nauki oraz zastosowań przemysłowych i zdrowotnych.

W związku z powyższym, uzasadnione jest wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Zielińskiej-Wasielicy.