



Poznań, 26.10.2023 r.

**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

Promotor: prof. UPP dr hab. Anna Olejnik

Promotor: prof. dr hab. Magdalena Rudzińska

Podstawa recenzji - uchwała nr 3/XXXIV/2023 Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 28-09-2023

Fitosterole są głównymi składnikami błony komórkowej roślin i - jako grupa związków- dzielą się na sterole i stanole roślinne oraz ich estry. Jednym z fitoestrolu będącym przedmiotem recenzowanej pracy doktorskiej jest stigmasterol, który należy do klasy tetracyklicznych triterpenów. Powszechnie wiadomo, że posiada on wielokierunkowe działanie prozdrowotne. Stigmasterol wykazuje nie tylko właściwości przeciwhipercholesterolomiczne, ale także m.in. neuroprotektoryjne, przeciwbakteryjne, czy przeciwnowotworowe. Pomimo plejotropowego, prozdrowotnego działania stigmasterolu, w literaturze naukowej pojawia się coraz więcej danych na temat możliwych szkodliwych skutków zdrowotnych. Sugeruje się, że są one związane z autoutlenianiem fitosteroli, prowadzącym do powstawania produktów utleniania zwanych oksyfitosterolami. Procesy utleniania fitosteroli, podczas których powstają oksypochodne, zachodzą podczas przechowywania żywności oraz obróbki wysokotemperaturowej tj. smażenie i pieczenie. Obecnie niewiele jest dostępnych danych literaturowych na temat cytotoksycznego działania pochodnych stigmasterolu powstających podczas obróbki termicznej i długoterminowego

przechowywania. Ze względu na rosnące zainteresowanie stigmasterolem zarówno wśród konsumentów, jak i producentów żywności funkcjonalnej, zasadnym jest podejmowanie kompleksowych badań dotyczących oceny aktywności biologicznej i bezpieczeństwa fitoestrioli. W świetle powyższych danych chciałabym podkreślić aktualność i trafność wyboru tematyki rozprawy doktorskiej i celu pracy.

Przedstawiony do recenzji manuskrypt posiada klasyczny układ, typowy dla rozpraw doktorskich. Struktura pracy została podzielona na sześć głównych rozdziałów, w skład których wchodzi: (1) wprowadzenie, (2) cel pracy, (3) materiały i metodyka badań, (4) wyniki i dyskusja, (5) podsumowanie oraz (6) wnioski. Na początku rozprawy Doktorantka zawarła streszczenie w języku polskim i angielskim, na końcu pracy - wykorzystane dane źródłowe, spis przedstawianych tabel, wykresów i rycin oraz dorobek naukowy.

Wstęp pracy został podzielony na 13 podrozdziałów. W pierwszej części rozdziału, Autorka opisuje grupę fitoestrioli, ich biodostępność, metabolizm oraz bezpieczeństwo toksykologiczne. Następnie przybliżona została tematyka dotycząca bioaktywności stigmasterolu. Ostatni podrozdział wstępu został poświęcony charakterystyce produktów jego przemian termiczno-oksydacyjnych, co z mojego punktu widzenia, stanowi cenne uzupełnienie omawianej tematyki i utwierdza czytelnika co do zasadności podjętego tematu rozprawy doktorskiej.

Cel pracy został sformułowany prawidłowo i w całości oddaje on treść oraz założenia rozprawy. Autorka bardzo trafnie sformułowała także cele szczegółowe. Bardzo pomocne dla czytelnika jest również graficzne przedstawienie schematu badań zilustrowane na ryc. 3, str. 23.

Kolejny rozdział pracy doktorskiej stanowi Materiały i metodyka badań. W pierwszym podrozdziale Doktorantka opisała warunki obróbki termicznej, jakim podlegały stigmasterol oraz jego estry, linolan i oleinian. Ponadto przedstawiono strukturę badanych związków. Kolejne podrozdziały dotyczą metodologii badań; tutaj wartym podkreślenia jest bardzo bogaty warsztat metodyczny. Doktorantka posłużyła się aż 15 metodami, które umożliwiły weryfikację postawionych przez nią hipotez badawczych. Metody opisane są starannie, w sposób możliwy do odtworzenia. Metodyka ujęta w pracy doktorskiej wskazuje na biegłe posługiwanie się przez Panią mgr inż. Marię Magdalenę Kasprzak nie tylko zaawansowanymi technikami fizyko-chemicznymi, ale również metodami z zakresu biologii molekularnej, jak i komórkowej. Podsumowując, uważam, że metodyka wykorzystana do realizacji ocenianej pracy doktorskiej stanowi gwarancję uzyskania w pełni wiarygodnych wyników.

Rozdział Wyniki badań i dyskusja został podzielony na dziesięć obszernych podrozdziałów. Wyniki są przedstawione w formie czytelnych wykresów, tabel i zdjęć. Pierwsze podrozdziały dotyczą wpływu obróbki termiczno-oksydacyjnej na stopień degradacji stigmasterolu i estrów stigmasterolu, tworzenie oksypochodnych. W pracy doktorskiej zaobserwowano istotny wpływ stopnia nienasycenia kwasu tłuszczowego w estrach na poziom redukcji stigmasterolu, potwierdzając wpływ na jego stabilność. Podczas ogrzewania stigmasterolu oraz jego estrów wykazano siedem produktów oksydacji termicznej stigmasterolu. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach ocenianej rozprawy jednoznacznie wskazują, że estryfikacja stigmasterolu ogranicza tworzenie jego oksypochodnych podczas przechowywania i obróbki wysokotemperaturowej. Wyniki tych analiz korelują z ilością oligomerów, których najwięcej zidentyfikowano w ogrzewanej próbce stigmasterolu, a najmniej w próbce oleinianu stigmasterolu. W kolejnym podrozdziale, Doktorantka omówiła *wyniki analiz cytotoksyczności stigmasterolu oraz jego estrów*. W tym miejscu chciałabym podkreślić wagę danych dotyczących właściwości cytotoksycznych badanych związków, które uzyskano aż w trzech liniach komórkowych (ludzkie komórki prawidłowe izolowane z nabłonka jelita cienkiego - FHs 74 Int, nabłonka jelita grubego - CCD 841 CoN oraz wątroby - THLE-2) za pomocą trzech różnych metod. Proliferację, żywotność komórek i ich aktywność metaboliczną określano za pomocą testu MTT, populację komórek żywych i martwych z użyciem skojarzonego testu MT-FMC, a syntezę DNA za pomocą testu BrdU. Wyniki tych badań wykazały, że stigmasterol oraz produkty jego termicznej degradacji posiadają zależne od dawki działanie hamujące wzrost wszystkich trzech linii komórkowych izolowanych z różnych tkanek. Zaobserwowano stosunkowo silne działanie cytotoksyczne wolnego stigmasterolu; zakres wartości właściwej dawki cytotoksycznej  $EC_{50}$ , która powodowała obniżenie żywotności komórek o 50% wynosił od 2,63 do 2,95  $\mu\text{g/ml}$ . Wyniki testu MTT, które wykazały zależność żywotność - dawka, zostały potwierdzone za pomocą testu MT-FMC. Doktorantka odnotowała wyraźną korelację pomiędzy obniżoną żywotnością komórek a podwyższoną liczbą komórek martwych pod wpływem wolnego stigmasterolu. Zaobserwowano również, że jego wyższe stężenia znacząco hamują syntezę DNA w komórkach błony śluzowej okrężnicy, wywierając silne działanie antyproliferacyjne. W tej części pracy Doktorantka uzyskała bardzo ciekawe wyniki pokazujące, że termiczna i oksydacyjna obróbka stigmasterolu, prowadzona w temperaturze 180 °C przez 8 godzin, prowadzi do zredukowania jego toksyczności, co Autorka uzasadnia znaczną degradacją cząsteczki (80%). Ponadto obróbka wysokotemperaturowa doprowadziła do zwiększonego wytwarzania oksypochodnych odpowiedzialnych za zwiększoną reaktywność oksydacyjną.

i zdolność stigmasterolu do podwyższenia wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach CCD 841 CoN. W konsekwencji, Doktorantka sugeruje, że zwiększenie ilości RFT mogło spowodować indukcję apoptozy i podwyższenie aktywności kaspaz wykonawczych (kaspaz-3/7). W mojej ocenie Kandydatka bardzo skrupulatnie omówiła przytoczone powyżej wyniki i poddała dyskusji z literaturą. Moją uwagę zwróciły jednakże wyniki uzyskane dla estrów (zwłaszcza oleinowego) stigmasterolu, które nie wykazały działania cytotoksycznego w porównaniu do związku macierzystego. Zaobserwowano jednak w komórkach śluzówki indukcję apoptozy (wzrost aktywności kaspaz-3/7) przy jednoczesnym braku działania prooksydacyjnego; poziom RFT nie uległ zmianie. Czy Doktorantka może odnieść się do uzyskanych wyników? Jakie dalsze analizy można wykonać w celu wyjaśnienia zaobserwowanego działania proapoptotycznego? W następnych podrozdziałach Autorka opisała wyniki badań dotyczących potencjalnego działania genotoksycznego, mutagennego oraz promutagennego stigmasterolu i jego estrów, które z pewnością uzupełniają obraz ich aktywności biologicznej i bezpieczeństwa toksykologicznego. Obliczone przez Doktorantkę indeksy mutagenności ( $<2$ ) nie wskazywały jednoznacznie na aktywność mutagenną czy promutagenną stigmasterolu. Wyniki cytometrii przepływowej pokazujące, że komórki błony śluzowej okrężnicy były blokowane w fazie komórkowej G<sub>2</sub>/M cyklu komórkowego korespondują ze wspomnianymi przeze mnie wcześniej wynikami dotyczącymi działania proapoptotycznego czy prooksydacyjnego stigmasterolu i jego estrów. Bardzo istotną częścią pracy doktorskiej są badania przeprowadzone w modelu nabłonka jelitowego *in vitro*, które wykazały, że w efekcie 24-godzinnej lub przewlekłej ekspozycji na stigmasterol ogrzewany w 180 °C, dochodzi do obniżenia integralności nabłonka jelitowego i zwiększenia jego przepuszczalności. Wyniki te z pewnością stanowią podstawę do kontynuacji prowadzonych badań w zakresie bezpieczeństwa stigmasterolu i jego pochodnych, a przede wszystkim żywności funkcjonalnej zawierającej te związki. W tym miejscu chciałabym jednak prosić Doktorantkę o podjęcie próby wyjaśnienia podwyższonej ekspresji genów kodujących białkowe składniki połączeń międzykomórkowych w nabłonku, które determinują szczelność bariery jelitowej pomimo zwiększenia przepuszczalności nabłonka. Wydaje mi się, że cennym uzupełnieniem tych badań byłaby analiza poziomu białka, ponieważ dostępnych jest wiele danych literaturowych wykazujących, że ekspresja transkryptu nie koreluje z poziomem białka. Uwagi te oczywiście nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną recenzowanej pracy.

Podsumowując, w rozdziale Wyniki badań i dyskusja Doktorantka podejmuje w sposób bardzo przemyślany i usystematyzowany polemikę z dostępnymi danymi literaturowymi,

które zostały opublikowane przez innych autorów z zagranicznych i polskich ośrodków naukowych. Sposób prowadzenia dyskusji przez mgr inż. Marię Magdaleny Kasprzak świadczy o Jej dobrej znajomości zagadnienia oraz dowodzi dużej zdolności do analizowania wyników z przeprowadzonych badań. Wszystkie te elementy wskazują jednoznacznie na dużą dojrzałość naukową Doktorantki. Na koniec chciałabym podkreślić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska napisana jest niezwykle starannym językiem, co także wskazuje na dojrzałość Doktorantki w prowadzeniu dyskusji i polemiki naukowej.

Przeprowadzenie wielu badań oraz ich dobrze udokumentowane wyniki pozwoliły Autorce na postawienie dziesięciu poprawnie sformułowanych wniosków, które odpowiadają wcześniejszym założeniom i celom szczegółowym przedstawionym w pracy.

W podsumowaniu, należy stwierdzić, iż Doktorantka wykazała się dużą samodzielnością naukową i umiejętnością wyciągania z przeprowadzonych analiz poprawnych wniosków. Pragnę również podkreślić, że praca doktorska charakteryzuje się trafnością i aktualnością wyboru tematu. W ocenianej pracy mgr inż. Marii Magdaleny Kasprzak doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane i wykonane, a uzyskane wyniki przyczyniają się do lepszego poznania omawianej tematyki. Dlatego też, praca doktorska stanowi cenne uzupełnienie dostępnego piśmiennictwa naukowego, stanowiąc zarazem podstawę do kontynuowania badań w tej tematyce.

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Cytotoksyczność stigmasterolu, estrów stigmasterolu i produktów ich termicznie-oksydacyjnej degradacji w badaniach *in vitro*” spełnia wszystkie ustawowe warunki i kryteria, jakim powinna odpowiadać praca na stopień doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Marii Magdaleny Kasprzak do dalszych etapów przewodu doktorskiego i ze względu na wysoką wartość poznawczą przeprowadzonych badań wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Załącznik: wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej.

prof. dr hab. Hanna Piątrowska-Kempisty

Katedra i Zakład Toksykologii UMP



Poznań, 26.10.2023 r.

**Wniosek o wyróżnienie**  
**rozprawy doktorskiej mgr inż. Marii Magdaleny Kasprzak**  
**pt. „Cytotoksyczność stigmasterolu, estrów stigmasterolu i produktów ich termiczno-  
oksydacyjnej degradacji w badaniach in vitro”**

Wnioskuje do Wysokiej Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o przyznanie wyróżnienia przedłożonej mi do recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Marii Magdaleny Kasprzak pt. „Cytotoksyczność stigmasterolu, estrów stigmasterolu i produktów ich termiczno-oksydacyjnej degradacji w badaniach in vitro”

Badania będące przedmiotem pracy doktorskiej przeprowadzono w oparciu o nowoczesną platformę analityczną. Argumentem przemawiającym za wyróżnieniem pracy jest bardzo wysoki poziom badań z zakresu bezpieczeństwa i technologii żywności. Doktorantka wykazała się dużą samodzielnością naukową i umiejętnością wyciągania z przeprowadzonych analiz poprawnych wniosków. Rozprawa doktorska wyróżnia się aktualnością tematu oraz kompleksową, wieloaspektową analizą uzupełniającą obraz bezpieczeństwa stosowania stigmasterolu jako dodatku do żywności funkcjonalnej.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że zarówno aktualna tematyka pracy doktorskiej, jak i całokształt prac badawczych wykonanych przez Doktorantkę znacząco przekracza wymagania stawiane pracom doktorskim w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

prof. dr hab. Hanna Piotrowska-Kemplyt

Katedra i Zakład Toksykologii UMP