

Warszawa, dn. 24.11.2024

Prof. dr hab. Jadwiga Hamułka
Katedra Żywienia Człowieka
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Marii 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*”.

wykonanej w Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
pod kierunkiem naukowym **prof. UPP dr hab. Anny Olejnik**

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Podstawą wykonana niniejszej recenzji było pismo Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu prof. dr hab. Pawła Cyplika (WNZZ-4000-24/2019, z dnia 23-10-2024) oraz rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Marii Zielińskiej-Wasielicy.

Podstawa prawna: Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.)

2. Uzasadnienie wyboru tematu rozprawy doktorskiej

Szybko rosnący wskaźnik otyłości stał się niezwykle ważnym problemem zdrowia publicznego, szczególnie w krajach rozwiniętych. Otyłość wiąże się z szeregiem problemów zdrowotnych, często określanych jako zespół metaboliczny, obejmujących rozwój insulinooporności, cukrzycy typu 2, chorób sercowo-naczyniowych, nadciśnienia i innych. Tkanka tłuszczowa jest obecnie uważana za narząd endokrynną odpowiedzialny za hormonalne wydzielanie adipokin, które biorą udział w różnych procesach fizjologicznych. Nadmierna masa ciała sprzyja przerostowi adipocytów i występowaniu miejscowego niedotlenienia komórkowego, które przyczyniają się wspólnie do rozwoju przewlekłego stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia. Prowadzi to następnie do zwiększonej migracji komórek układu odpornościowego, takich jak makrofagi i limfocyty oraz do patologicznie zmodyfikowanej tkanki tłuszczowej z powodu zwiększonej apoptozy adipocytów promowanej przez niedotlenienie. Z kolei zwiększona infiltracja komórek układu odpornościowego narażonych na przewlekłą hipoksję i zwiększony stres oksydacyjny zaburza równowagę pomiędzy wydzielaniem cytokin przeciwzapalnych i prozapalnych.

Ponadto adipocyty uwalniają setki cząsteczek sygnałowych, które odpowiadają za regulację lokalnej i systemowej aktywności komórkowej poprzez swoją aktywność autokrynną, parakrynną i endokrynną. Wykazano, że adipokiny odgrywają kluczową rolę w regulacji wielu procesów w organizmie człowieka, takich jak metabolizm glukozy i lipidów, wrażliwość na insulinę, apetyt, odpowiedź immunologiczną i stan zapalny. Ze względu na ich udział w tych procesach, adipokiny mogą być traktowane jako potencjalne cele dla nowych strategii terapeutycznych w licznych schorzeniach. Nadmierne gromadzenie tkanki tłuszczowej jest również jednym z głównych przyczyn zwiększonego stresu oksydacyjnego, jak również nasilenia procesów zapalnych w organizmie, co z kolei prowadzi do większego zużycia antyoksydantów. Jedną z bezpiecznych strategii terapeutycznych i profilaktycznych jest wykorzystanie naturalnych związków bioaktywnych, które wykazują zdolności do ingerowania w hiperplastyczny i hipertroficzny rozrost tkanki tłuszczowej poprzez modulowanie szlaków sygnałowych związanych z procesem adipogenezy, lipogenezy i lipolizy, produkcją adipokin, czynników i mediatorów stanu zapalnego, jak również wrażliwością komórek na insulinę.

Stąd też, problematyka badawcza recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Marii Zielińskiej-Wasielicy obejmująca ocena bioaktywności ekstraktów z owoców czarnego bzu (*Sambucus nigra* L.) oraz czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) w aspekcie prewencji i terapii otyłości i powiązanych z nią zaburzeń metabolicznych, jest jak najbardziej aktualna i istotna. Wybór tematu dysertacji uważam więc za uzasadniony, zarówno z punktu widzenia naukowo-badawczego, jak i aplikacyjnego.

3. Ogólna charakterystyka i ocena formalna pracy

Układ rozprawy doktorskiej Pani Mgr inż. inż. Joanny Marii Zielińskiej-Wasielicy jest typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym. Dysertacja jest klasycznym opracowaniem przedstawionym w postaci maszynopisu, liczącym 187 stron, łącznie ze spisem piśmiennictwa oraz spisem tabel i rysunków. Składa się z 7 rozdziałów, wykazu najważniejszych skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. W pracy znajduje się 9 tabel oraz 50 rysunków, w tym 44 z wynikami badań własnych. Poszczególne rozdziały pracy są logicznie ułożone i stanowią kompletną całość. Pierwsza część dysertacji dotyczy przeglądu literatury i zawiera wprowadzenie oraz 4 podrozdziały tematyczne stanowiące 17% ogółu pracy, natomiast część empiryczna, w tym część doświadczalna ze szczegółowo opisaną metodyką badań, opisem uzyskanych wyników, ich dyskusję oraz wnioskami, stanowi ponad 60% całej pracy. W przedstawionej do recenzji dysertacji zacytowano 215 pozycji bibliograficznych. Proporcje poszczególnych części pracy są adekwatne do charakteru pracy, a uzyskane wyniki zinterpretowano i przedyskutowano prawidłowo. Od strony formalnej praca nie budzi zastrzeżeń.

Praca doktorska mgr inż. inż. Joanny Marii Zielińskiej-Wasielicy została wykonana w ramach projektu nr 2015/19/B/NZ9/01054 w konkursie OPUS 10 finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w latach 2016 – 2020, co zostało podane na str. 10 i 12 (wersja angielska)

4. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy jest zgodny z celem oraz treścią rozprawy.

Przegląd literatury stanowi dobry asumpt do zaplanowanych badań, nakreślając w zarysie najważniejsze kwestie związane z tematem pracy. Doktorantka przejrzyście omówiła tło naukowe podjętych badań, opisując charakterystykę i fizjologię tkanki tłuszczowej, z uwzględnieniem procesu adipogenezy na zdrowie metaboliczne, omówiła mechanizmy immunologiczne towarzyszące otyłości oraz implikacje z nim związane, próbując wyjaśnić mechanizmy rozwoju przewlekłego stanu zapalnego w tkance tłuszczowej i jego konsekwencje zdrowotne. W kolejnej części przeglądu literatury Autorka scharakteryzowała owoce czarnego bzu (EDB) i czarnej porzeczki (BC) jako źródła związków bioaktywnych. Zwróciła uwagę na właściwości przeciwutleniające, przeciwdrobnoustrojowe i przeciwwirusowe wykorzystywane w profilaktyce i leczeniu otyłości, chorób układu krążenia, cukrzycy, jak również chorób nowotworowych.

Pomimo bardzo obszernego wprowadzenia literaturowego, w moim odczuciu, zabrakło krótkiego podsumowania tej części dysertacji wskazującego dlaczego w części praktycznej zajęto się tylko związkami polifenolowymi, biorąc pod uwagę, iż owoce jagodowe, a zwłaszcza czarna porzeczka, ale również bez czarny są źródłem witamin, w tym głównie witaminy C.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiony przegląd literatury, dobrze uzasadnia założenia pracy oraz potrzebę podjęcia niniejszych badań. Bowiem, tak jak podkreśliła Doktorantka we wprowadzeniu „w obliczu złożoności i wieloczynnikowego charakteru otyłości, konieczne jest poszukiwanie nowatorskich podejść, jakim jest m.in. wykorzystanie potencjału biologicznego naturalnych składników roślinnych. Badania nad potencjałem biologicznym naturalnych składników roślinnych, takich jak owoce czarnego bzu i czarnej porzeczki, w prewencji i terapii otyłości, mają istotne znaczenie dla dalszego rozwinięcia bezpiecznych strategii terapeutycznych opartych na bioaktywnych związkach pochodzenia naturalnego”. Do przygotowania tej części pracy Doktorantka wykorzystała aktualną literaturę, co świadczy o dobrym rozeznaniu literaturowym w tym zakresie.

Hipotezy badawcze i cele pracy:

W swojej dysertacji, mgr inż. Joanna Maria Zielińska-Wasielica postawiła, aż 7 hipotez badawczych:

- 1) 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.
- 2) Ekstrakty z czarnego bzu i czarnej porzeczki wykazują wysoki potencjał antyoksydacyjny, który może prowadzić do ograniczenia poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach tłuszczowych.

- 3) Ekstrakty z owoców czarnego bzu i czarnej porzeczki wpływają na proces adipogenezy i lipogenezy oraz na metabolizm lipidów w komórkach tłuszczowych.
- 4) Ekstrakty z owoców czarnego bzu i czarnej porzeczki modulują ekspresję leptyny i adiponektyny, przez co mogą wspierać homeostazę metaboliczną oraz redukować insulinooporność.
- 5) Ekstrakty z czarnego bzu i czarnej porzeczki mogą osłabiać insulinooporność i poprawiać wychwyt glukozy w adipocytach.
- 6) Ekstrakty z czarnego bzu i czarnej porzeczki mają zdolność do ograniczania absorpcji tłuszczów i węglowodanów poprzez hamowanie aktywności enzymów trawiennych.
- 7) 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.

W celu weryfikacji postawionych hipotez badawczych oraz celu głównego, którym była analiza potencjału biologicznego ekstraktów z owoców czarnego bzu i czarnej porzeczki w odniesieniu do otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych Doktorantka zastosowała układy doświadczalne umożliwiające ocenę aktywności biologicznej ekstraktów z owoców czarnego bzu (*Sambucus nigra* L.) i czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) w aspekcie prewencji i wspierania terapii otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych.

Dodatkowo przedstawiono 5 celów szczegółowych, które są spójne z hipotezami i celem głównym pracy.

Materiały i metody badań:

Rozdział ten jest napisany w sposób czytelny, bardzo dobrze przedstawiając poszczególne etapy przebiegu realizacji pracy, tj. przygotowanie ekstraktów z owoców czarnego bzu i czarnej porzeczki; trawienie ekstraktów *in vitro*; transport ekstraktów przez nabłonek jelitowy *in vitro* (badania z wykorzystaniem linii komórkowych linii komórkowych raka okrężnicy Caco-2), jak również metody oznaczenia związków fenolowych w badanych ekstraktach; warunki i przebieg eksperymentów na modelu komórkowym 3T3-L1; oznaczenia właściwości przeciwzapalnych z wykorzystaniem hodowli komórkowych RAW 264.7; oznaczenie wpływu ekstraktów na aktywność enzymów trawiennych; Analiza ekspresji genów metodą Real-Time PCR oraz analizę statystyczną uzyskanych wyników. Opis metodyki zajmuje znaczną część pracy – 18 stron maszynopisu (10%) i na ogół nie budzi zastrzeżeń. Jednak do tej części pracy nasuwa się kilka pytań:

- Przy charakterystyce owoców dobrze byłoby podać, z jakich upraw one pochodziły, konwencjonalnych, czy ekologicznych, biorąc pod uwagę potencjalne różnice w zawartości związków polifenolowych?
- Czy ekstrakty z owoców były badane pod kątem zawartości innych składników odżywczych/bioaktywnych?
- Czy badano również wpływu ekstraktu EBD na stan zapalny indukowany w adipocytach 3T3-L1? W metodyce (str. 55) odniesiono się tylko do ekstraktu BC.
- W metodyce zabrakło mi również informacji odnośnie różnych stężeń ekstraktów wykorzystywanych do poszczególnych badań/analiz; informacja taka pojawiła się

- dopiero częściowo w wynikach i w dyskusji. Podanie takiej informacji wcześniej – może np. na schemacie – umożliwiło by lepsze śledzenie wyników i ich zrozumienie.
- Proponowałabym również podanie powodów wyboru poszczególnych hodowli/ linii komórkowych wykorzystanych w poszczególnych badaniach i etapach pracy; Czym uzasadniony był taki wybór?
 - Czy w przypadku analizy statystycznej były wykorzystywane dane z 3 niezależnych eksperymentów czy również z 3 powtórzeń? Ponadto do dalszych analiz statystycznych proponowałabym zastosowanie analizę dwuczynnikową (dawka, rodzaj ekstraktu). A może takie analizy były wykonane?
 - Analizując przedstawioną pracę, z mojego punktu widzenia, dla lepszej przejrzystości przeprowadzonych badań, dobrze byłoby przedstawić schemat badań, a także uzupełnienie pracy o analizy statystyczne porównujące właściwości i działanie badanych ekstraktów z owoców czarnego bzu i czarnej porzeczki (tam gdzie jest to możliwe).

Reasumując uważam, iż zakres zaplanowanych i wykonanych analiz jest bardzo szeroki i przemyślany, co pozwoliło na zrealizowanie zarówno postawionego celu pracy jak i zweryfikowanie hipotez badawczych. Wielość i różnorodność zastosowanych metod i procedur badawczych świadczy o bardzo dobrej znajomości warsztatu badawczego oraz dowodzi dobrego przygotowania do prowadzenia badań naukowych a przedstawione uwagi/komentarze mają charakter dyskusyjny.

Na podkreślenie zasługuje również konsekwentna realizacja zaplanowanych badań, co wymagało od Doktorantki dużego zaangażowania, dobrej organizacji pracy w laboratorium i umiejętności analitycznych – szeroki zakres analiz. Stąd też nasuwa się pytanie czy Doktorantka sama zrealizowała wszystkie elementy pracy, analizy chemiczne? Na ile wchodziło to w zakres projektu Opus 10?

Wyniki:

Rozdział ten jest najobszerniejszą częścią pracy liczącą 65 stron maszynopisu (35%). Autorka podzieliła ten rozdział na 2 główne podrozdziały, związane z badaniami dotyczącymi aktywności ekstraktu z owoców czarnego bzu (4.1. - 31 stron) oraz aktywności ekstraktu z czarnej porzeczki (4.2. – 34 strony)

Podrozdziały tej części pracy stanowią logiczną konsekwencję, a ich treści są logiczną konsekwencją zarówno celów szczegółowych pracy jak i postawionych hipotez badawczych. Opis wyników koresponduje odpowiednio z danymi zamieszczonymi na wykresach i w tabelach.

Z obowiązku recenzenta chciałabym jednak zwrócić uwagę na kilka kwestii:

- 1) Wyniki prezentowane są, zgodnie z zaproponowanym przez Doktorantkę schematem ich omawiania na poszczególnych rysunkach w odniesieniu do danego ekstraktu, co znacznie wydłuża prezentację wyników i nie pokazuje zależności oraz wpływu czynników związanych z rodzajem użytych ekstraktów.

- 2) Dlaczego dane dla współczynników przenikalności pozornej (Papp) związków antocyjanowych zawartych w trawionych ekstraktach (tabela 9) znalazły się w dyskusji, a nie w wynikach?
- 3) W omówieniu wyników należy odnosić się do analizy statystycznej – jeśli wyniki nie różniły się statystycznie nie piszemy o „nieznacznie mniejszą” itp., a wartość p-value należałoby podawać zwłaszcza w tabelach (np. tabela 4, 5, 7).
- 4) Na rysunkach, zwłaszcza 7 i 28 należałoby podać wartości ponieważ trudno jest określić tu różnice.
- 5) Czasami zabrakło również komentarzy do prezentowanych wyników, np. Rys. 17, 20, 38).

Dyskusja wyników, jako jeden z ważniejszych rozdziałów dysertacji, polega nie tylko na porównaniu wyników własnych z wynikami innych autorów, ale przede wszystkim na wskazaniu przyczyn stwierdzonych zależności i zaobserwowanych zjawisk. Doktorantka dokonała obszernej i udanej próby interpretacji wyników badań własnych na tle dostępnego i szeroko przeanalizowanego piśmiennictwa zarówno krajowego jak i zagranicznego.

Nie było to proste zadanie biorąc pod uwagę złożoność i wielowątkowość pracy oraz fakt, że Autorka starała się wyjaśnić mechanizm działania co stanowi cenną część tego opracowania. Przytacza wiele pozycji literaturowych, próbuje również wyjaśnić obserwowane zmiany, co w przypadku analizowania tak złożonej matrycy nie jest łatwym wyzwaniem. Efektem tego było przedstawienie dyskusji na 32 stronach maszynopisu.

Z obowiązku recenzenta chciałabym jednak zwrócić uwagę, że w przedstawionej dyskusji, skupionej głównie na działaniu związków polifenolowych, zabrakło mi chociażby krótkiego komentarza, że efekt ich działania, tj. ekstraktów z owoców czarnego bzu i czarnej porzeczki może być również efektem obecności innych związków o działaniu prozdrowotnym (bioaktywnym), takich jak witaminy, błonnik pokarmowy i inne. Szkoda również, że Doktorantka nie pokusiła się o podsumowanie swoich wyników np. w postaci przedstawienia mocnych i słabych stron badania co byłoby uzasadnione chociażby do faktu, iż w modelu przewodu pokarmowego zastosowanego w pracy nie uwzględniono etapu trawienia w jamie ustnej i w jelicie grubym.

Wnioski:

W pracy Doktorantka przedstawiła 8 wniosków, a właściwie 7 dotyczących najważniejszych osiągnięć wynikających z przeprowadzonych badań - adekwatnych do postawionych hipotez badawczych i 1 wniosek ogólny. Świadczą one o realizacji wyznaczonego przez Autorkę celu badań oraz weryfikacji postawionych hipotez. Proponowałabym jednak zmianę kolejności wniosku 6 i 7 – co byłoby zgodne z kolejnością hipotez i omawianych wyników, a w przypadku wniosku 2 dodanie informacji, „.....ale nie katalazy” i że nie odnotowano takiej zależności w przypadku ekstraktu z czarnej porzeczki.

Literatura - W pracy wykorzystano 215 pozycji literaturowych. W większości są to oryginalne prace twórcze. Na uwagę zasługuje trafny dobór źródeł oraz ich aktualność. Świadczy to dobrym rozeznaniu literaturowym Autorki rozprawy.

Jak wspomniałam wcześniej, oceniana dysertacja została wykonana starannie i napisana poprawnie pod względem językowym i merytorycznym, niemniej jednak z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kilka kwestii, które zauważyłam podczas szczegółowej lektury pracy:

- zła numeracja hipotez – jest ich 7, a nie 8 jak wynika z numeracji - brakuje hipotezy 5.
- w pracy zdarzają się błędne lub niefortunne sformułowania, np. waga zamiast masa ciała; ekstrakty „ingerują” w przebieg procesu apoptozy – w jaki sposób? Niejednolity sposób zapisu skrótów (głównie w metodyce) Odsyłacz literaturowy (Olejniki, Rychlik i in., zamiast Olejnik i in.).

Odnosząc się do przeprowadzonych przez Doktorantkę badań i wyników własnych, podczas publicznej obrony pracy doktorskiej prosiłabym o ustosunkowanie się do poniższych kwestii:

- Poproszę o wyjaśnienie dlaczego zastosowano Oristat, jak referencyjnych inhibitor i jak to się ma do obecnie dostępnych/ stosowanych preparatów o podobnym działaniu farmakologicznym?
- Jakie są możliwości i jednocześnie ograniczenia wykorzystania uzyskanych wyników własnych? Czy otrzymane i przebadane w pracy ekstrakty są wykorzystywane w przemyśle spożywczym/ farmaceutycznym? Jeśli tak to w jaki sposób i do czego?

5. Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że zaplanowane przez Doktorantkę badania zostały zrealizowane, a cel pracy został osiągnięty. Badania dostarczają wartościowych informacji teoretycznych i możliwości zastosowań praktycznych. Ten obszar wiedzy nadal wymaga dalszych wnikliwych badań i poszukiwania związków przyczynowo-skutkowych między składnikami diety, naturalnymi surowcami roślinnymi a zdrowiem.

Z powyższych danych oraz analizy przedłożonej dysertacji wynika, że mgr inż. Joanna Maria Zielińska-Wasielica uzyskała efekty kształcenia przewidziane wg Polskich Ram Kwalifikacji dla ósmego (doktoranckiego) poziomu kształcenia, tj. posiada umiejętność opracowania koncepcji badań, zdolność do planowania i wykonywania eksperymentów badawczych, a także opracowywania wyników i konfrontowania ich z wynikami innych badaczy. Należy zaznaczyć, że przedstawione w recenzji uwagi i spostrzeżenia mają na celu doskonalenie warsztatu naukowo-badawczego Autorki oraz mogą być wykorzystane przy przygotowywaniu publikacji naukowych i nie umniejszą wartości merytorycznej recenzowanej pracy.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Marii 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”* zrealizowanej pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Anny Olejnik spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Tekst jedn.: Dz.U. z 2014 r. poz. 1852 z późn. zm.).

W związku z powyższym stawiam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Joanny Marii Zielińskiej-Wasielicy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jadwiga Hamułka