

Warszawa, dn. 28.08.2023

Prof. dr hab. Agata Wawrzyniak
Katedra Żywienia Człowieka
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka, SGGW w Warszawie
agata_wawrzyniak@sggw.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Jakuba Michała Kurka

**pt. „Ocena przeciwcukrzycowego potencjału glikozydów stewiolowych,
indywidualnie i we współdziałaniu z L-argininą i chromem(III)
w badaniach modelowych *in vitro* i *in vivo*”**

wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Zbigniewa Krejpcio (promotora),
na stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych
w dyscyplinie technologia żywności i żywienia
przedłożonej Radzie Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Podstawa wykonania recenzji i przedmiot recenzji

Recenzja została wykonana w oparciu o Uchwałę z dn. 29 czerwca 2023r. Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, w związku z postępowaniem o nadanie stopnia naukowego doktora Panu mgr Jakubowi Michałowi Kurkowi. Decyzja została przekazana pismem z dn. 04 lipca 2023r. i podpisana przez Przewodniczącą Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia prof. dr hab. Magdalenę Rudzińską. Recenzja uwzględnia wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003r. (opublikowanej w Dz.U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Ocena strony formalnej przedłożonej do recenzji rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Jakuba Michała Kurka pt. „Ocena przeciwcukrzycowego potencjału glikozydów stewiolowych, indywidually i we współdziałaniu z L-argininą i chromem(III) w badaniach modelowych *in vitro* i *in vivo*” stanowi sekwencję 3 oryginalnych prac badawczych, zgodnych tematycznie, wykonanych z wykorzystaniem różnych modeli badawczych, opublikowanych w języku angielskim w latach 2020-2022 w renomowanych i uznanych międzynarodowych czasopismach z listy JCR, jak też wysokopunktowanych z listy MNiSW, po uprzedniej pozytywnej ocenie recenzentów międzynarodowych. Tytuł dysertacji jest tożsamy z obszarem badawczym i tematami opublikowanych prac, można jedynie uzupełnić, iż badania dotyczyły przede wszystkim cukrzycy typu 2.

Na rozprawę doktorską złożyły się publikacje o łącznym wskaźniku IF wynoszącym **16,155** (IF wg. danych z lat publikacji) i **340 punktów MNiSW**:

1. **Kurek, J.M.**, Zielińska-Wasielica, J., Kowalska, K., Krejpcio, Z., Olejnik, A.: *Modulating effects of steviol and steviol glycosides on adipogenesis, lipogenesis, glucose uptake and insulin resistance in 3T3-L1 adipocyte model*. Journal of Functional Foods **2022**, 94, 105141, doi.org/10.1016/j.jff.2022.105141 (Wyd. Elsevier - IF = 5,223, MNiSW = 100).
2. **Kurek, J.M.**, Król, E., Krejpcio, Z.: *Steviol Glycosides Supplementation Affects Lipid Metabolism in High-Fat Fed STZ-Induced Diabetic Rats*. Nutrients **2020**, 13, 112, doi.org/10.3390/nu13010112 (Wyd. MDPI - IF = 5,717, MNiSW = 140).
3. **Kurek, J.M.**, Król, E., Staniek, H., Krejpcio, Z.: *Steviol Glycoside, L-Arginine, and Chromium(III) Supplementation Attenuates Abnormalities in Glucose Metabolism in Streptozotocin-Induced Mildly Diabetic Rats Fed a High-Fat Diet*. Pharmaceuticals **2022**, 15, 1200. doi.org/10.3390/ph15101200 (Wyd. MDPI - IF = 5,215, MNiSW = 100).

co należy uznać za wskaźniki odpowiednio wysokie przy ubieganiu się o stopień naukowy doktora.

Jako materiał pomocniczy załączono abstrakt z konferencji:

Kurek, J.M., Król, E., Krejpcio, Z.: *Steviol Glycosides and Lipid Profile Regulation — is it the Type or the Dose that Really Matters?*. European Association for the Study of Diabetes: 15th Annual International Conference of the D&CVD Study Group (D&CVD2023), 10-12 maja **2023** r., Tel Awiw-Jafa, Izrael, Poster P-1.

Przedstawiona do recenzji dysertacja ma układ rozprawy doktorskiej powstałej na bazie spójnego tematycznie zbioru publikacji naukowych, a przytoczony cykl publikacji należy uznać za ważny i nowatorski dla obszaru technologii żywności i żywienia człowieka, odnoszący się do poszukiwania w modelach badawczych *in vitro* i *in vivo* substancji żywieniowych wpływających na obniżenie potencjału przeciwcukrzycowego w cukrzycy typu 2.

Przedłożona dysertacja obejmuje 143 strony tekstu i zawiera w swojej treści: stronę tytułową, wykaz zastosowanych skrótów (2 strony), streszczenie w języku polskim i angielskim z podaniem słów kluczowych (4 strony), spis treści (1 strona), wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i podsumowanie osiągnięć naukowych Doktoranta (2 strony), wstęp teoretyczny (9 stron) - co pozwoliło lepiej zrozumieć zagadnienia stanowiące przedmiot badań, a odnoszące się do: opisu jednostki chorobowej cukrzycy i poszukiwania substancji aktywnych w leczeniu tego schorzenia; charakterystyki

rośliny *Stevia rebaudiana* Bertoni oraz charakterystyki jej glikozydów - substancji czynnych zawartych w roślinie; charakterystyki L-argininy i chromu, przy ocenie potencjału przeciwcukrzycowego wszystkich z wyżej omawianych związków. Ponadto treść dysertacji zawiera zapis modelu i celu rozprawy doktorskiej przy podaniu 3 hipotez badawczych (2 strony), jak też treść dysertacji prezentuje materiał i metody badawcze (12 stron) oraz wyniki 3 doświadczeń wraz z dyskusją, przy wnikliwym i rzetelnym podsumowaniu każdej z części badań (23 strony), podsumowanie dla całości badań i wnioski ogólne (2 strony), bibliografię – 216 pozycji (14 stron), podanie źródeł finansowania (1 strona), załączniki – uchwały komisji bioetycznej dla doświadczeń (6 stron). Dysertacja obejmuje kopie opublikowanych artykułów i posteru (55 stron), zawiera oświadczenia współautorów publikacji o wyrażeniu zgody, aby wymienione publikacje zostały wykorzystane w pracy doktorskiej mgr Jakuba Michała Kurka (8 stron). Strona edytorska przedstawionej do oceny pracy badawczej Doktoranta jest wyjątkowo staranna, co może dodatkowo wskazywać na rzetelność warsztatu naukowego Doktoranta. Przygotowanie wyników do publikacji w formie tabel, wykresów i zdjęć jest w pełni czytelne. Doktorant swobodnie posługuje się fachowym językiem angielskim w opublikowanych pracach. Publikacja prac w otwartym dostępie w uznanych wydawnictwach międzynarodowych i czasopismach umożliwia ich poczytność dla ogółu badaczy na świecie (opublikowane artykuły na dzień 28.08.2023 zostały zacytowane 18-krotnie, wg. bazy WoS).

Jednocześnie należy podkreślić, iż udział Doktoranta w powstaniu każdej z prac należy uznać za wiodący jako pierwszego autora. W przypadku pierwszej z publikacji wkład pracy Doktoranta polegał na przygotowaniu koncepcji badań, analizie formalnej wyników, prowadzeniu badań, przygotowaniu tekstu publikacji. W drugiej i trzeciej z publikacji wkład Doktoranta do badań to: analiza formalna wyników, prowadzenie badań, gromadzenie danych, przygotowanie tekstu oryginalnego projektu, wizualizacja. Autorzy nie podali procentowego wkładu pracy w prowadzonych badaniach.

Doświadczenie uzyskało zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Poznaniu (Uchwały Nr 31 i 59 z 2019r. oraz Uchwała Nr 7 z 2020r.).

Badania zostały wykonane w ramach projektu badawczego OPUS finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (Nr 2017/27/B/NZ9/00677) pt. „*Badania nad mechanizmami przeciwcukrzycowych właściwości glikozydów stewiolowych (indywidualnie i w połączeniu z L-argininą i chromem(III)) - w poszukiwaniu formuły preparatu dla osób chorych na cukrzycę*”, kierownik projektu: prof. dr hab. Zbigniew Krejpcio.

Reasumując przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania formalne przy ubieganiu się o stopień naukowy doktora.

Ocena merytoryczna pracy

Cukrzyca po chorobach serca i nowotworach jest najczęściej występującą chorobą przewlekłą na świecie, przy czym cukrzyca typu 2 stanowi około 90% zdiagnozowanych zachorowań, a u około 90% chorych na cukrzycę typu 2 stwierdza się nadwagę lub otyłość, których częstotliwość systematycznie wzrasta w społeczeństwach spożywających żywność wysokoprzetworzoną. Obecnie na cukrzycę choruje co 15 osoba na świecie. Według badania przeprowadzonego przez naukowców z Institute of Health Metrics and Evaluation Uniwersytetu Waszyngtona, na świecie żyje obecnie 529 milionów ludzi z cukrzycą, a badacze szacują, że do 2050 roku liczba ta wzrośnie ponad dwukrotnie do około 1,3 miliarda ludzi. Stąd konieczność poszukiwania substancji bioaktywnych i strategii leczenia cukrzycy lub stanów przedcukrzycowych. Biorąc pod uwagę, iż naturalnym rezerwuarem wielu substancji bioaktywnych i leczniczych są rośliny, promowane jako podstawa diety prozdrowotnej człowieka, należy uznać za wysoce zasadne badanie ich właściwości i właściwości związków w nich zawartych dla poprawy stanu zdrowia, w tym leczenia. Jedną z takich roślin jest stewia i zawarte w niej glikozydy stewiolowe. Badanie oddziaływania tych związków na komórki organizmu, w tym we wzmocnieniu innymi substancjami w poszukiwaniu strategii leczenia cukrzycy należy uznać za temat niezwykle ważny, aktualny, ciekawy i uzasadniony dla nauki o żywieniu człowieka i technologii żywności, gdyż propozycją dla pacjenta po zgłoszeniu do poradni z symptomami choroby powinna być m.in. weryfikacja/ propozycja diety na bazie substancji wspomagających leczenie lub wręcz leczniczych.

Tak więc, głównym celem badania przeprowadzonego przez mgr Jakuba Michała Kurka na stopień doktora była ocena potencjału przeciwcukrzycowego glikozydów stewiolowych (GS), indywidualnie i we współdziałaniu z L-argininą i chromem(III) z wykorzystaniem modeli *in vitro* i *in vivo*. Główny cel badania został poparty wcześniejszą analizą bieżącego piśmiennictwa zawartą w rozdziale Wstępu teoretycznego uzasadniającą wybór tematu i konieczność dalszych badań z tego zakresu w wyniku niejednoznacznych wyników badań dotychczas przeprowadzonych, przy często dużo węższym i nie tak złożonym ich zakresie. Nowum badań stanowi połączenie oddziaływania glikozydów stewiolowych z L-argininą i związkami cynku w ocenie ich przeciwcukrzycowego potencjału, ale należy również wziąć pod uwagę jako cenne połączenie modeli badawczych (model komórkowy i

model zwierzęcy), jak też wieloaspektowy pogłębiony metodologicznie, w odniesieniu do badań uprzednio prowadzonych, zakres badań z użyciem najnowocześniejszych zaawansowanych metod badawczych (badania dotyczące ekspresji genów, wieloaspektowe badania biochemiczne, badania histopatologiczne).

Na główny cel rozprawy doktorskiej złożyły się następujące cele szczegółowe, krokowo wyjaśniające wpływ glikozydów stewiolowych indywidualnie, jak też we współdziałaniu z L-argininą i związkami chromu(III), w badaniach *in vitro* (adipocyty linii komórkowej myszy 3T3-L1), a następnie w badaniach *in vivo* (model zwierzęcy – szczury), przy odniesieniu wyników do wyników/grupy kontrolnej (jako porównawczej), tj.:

- zbadanie oddziaływania GS (stewiozydu (ST), rebaudiozydu A (RA) i stewiolu (STL) oraz L-argininy i chromu(III) na procesy adipogenezy i lipogenezy oraz ich wpływu na adipogenezę, lipogenezę, wychwyt glukozy i insulinooporność w warunkach normalnych i insulinooporności, z użyciem adipocytów linii komórkowej myszy 3T3-L1 (model *in vitro*),
- ocena potencjału przeciwcukrzycowego GS (ST, RA) rozumianego jako efekt hipoglikemiczny, hipolipidemiczny i/lub antyoksydacyjny, w zależności od rodzaju i dawki glikozydu, u szczurów doświadczalnych z wywołaną cukrzycą typu 2 (model *in vivo* 1),
- ocena potencjału przeciwcukrzycowego GS (ST, RA) w połączeniu z L-arg i Cr(III), rozumianego jako efekt hipoglikemiczny, hipolipidemiczny i/lub antyoksydacyjny u szczurów doświadczalnych z wywołaną cukrzycą typu 2 (model *in vivo* 2).

Takie zaplanowanie doświadczenia należy uznać za wieloetapowe i wieloaspektowe, podkreślające wnikliwość badacza w poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie główne i pytania/hipotezy szczegółowe, pomimo nie zaplanowania badań z udziałem ludzi.

Biorąc pod uwagę, iż praca doktorska składa się z już opublikowanych artykułów, a uprzednio weryfikowanych przez recenzentów do prestiżowych światowych czasopism, dobór metod badawczych, jak też materiał i metody oraz opis wyników badań, w tym ich przedstawienie, jak też dyskusję należy uznać za poprawnie zweryfikowane i nie budzące zastrzeżeń. Praca doktorska jest konsekwentnie i poprawnie zaplanowanym, przeprowadzonym i bardzo starannie opisanym wieloaspektowym zbiorem tematycznie spójnych doświadczeń, wykonanych z wykorzystaniem przyjętych w tego typu badaniach nowoczesnych procedur i metod badawczych, jak też ze statystycznym opracowaniem wyników przy wykorzystaniu poprawnie dobranych testów.

Doktorant prawidłowo przeanalizował, zinterpretował i przedyskutował wyniki badań. Dobór piśmiennictwa do prac należy uznać za właściwy i bardzo aktualny.

Nie mniej jednak zapytanie budzi:

- co wpłynęło na wybór do badań *in vitro* komórek mysich adipocytów, a w badaniach *in vivo* modelu szczurzego, uprzejmie proszę o wyjaśnienie czy może mieć to wpływ na wnioskowanie;
- co było podstawą, iż analizowane związki wykorzystano w badaniach *in vitro* w postaci roztworów wodnych w stężeniach w medium reakcyjnym: 1, 10, 100 i 1000 μM ; uprzejmie proszę o uzasadnienie wykorzystywanych dawek także w powiązaniu do badań *in vivo* i ew. spożycia u ludzi;
- co wpłynęło na podawanie szczurom GS w ilości 500 lub 2500 mg/kg/dzień, uprzejmie proszę o uzasadnienie dawek, szczególnie w odniesieniu do spożycia przez ludzi (ADI jako ekwiwalent STL 0-4 mg/kg m.c./dobę) i założeniu, że związki te mogą być nawet 400 razy słodsze od sacharozy w badaniach organoleptycznych;
- co uzasadniało dobór dawek L-argininy i związków chromu do badań *in vivo*;
- uprzejmie proszę o wyjaśnienie zapisu "spożycie wody było mierzone co trzy tygodnie" (str. 32);
- co było powodem, iż w trakcie eksperymentu 6 szczurów zdechło przedwcześnie.

Elementami, które mogłyby ew. uzupełnić badania dotychczas przeprowadzone to:

- pogłębione pełne wyjaśnienie mechanizmów oddziaływania badanych związków w przeciwdziałaniu cukrzycy, w tym cukrzycy różnych typów;
- rozszerzenie badań o kolejny etap z udziałem ludzi, w tym w cukrzycach różnego typu;
- końcowe ustalenie dawek badanych związków w procesach terapeutycznych u ludzi – w leczeniu stanów przedcukrzycowych i cukrzycowych o różnym nasileniu;
- zaprojektowanie diet lub preparatów wspomagających leczenie stanów przedcukrzycowych i cukrzycowych u ludzi.

Przygotowaną rozprawę doktorską kończy podsumowanie i wnioski ogólne, co stanowi oryginalny wkład Doktoranta do nauki. **Mgr Jakub Michał Kurek wykazał w oparciu o wyniki przeprowadzonych badań, iż glikozydy stewiolowe (stewiozyd, rebaudiozyd A) posiadają znaczący potencjał przeciwcukrzycowy, który uwidocznił się najwyraźniej w regulowaniu zaburzonej gospodarki lipidowej, co mogło być, jak wykazano,**

uwarunkowane oddziaływaniem tych związków na ekspresję genów regulujących metabolizm lipidów. Silniejsze działanie przeciwcukrzycowe wykazywał stewiozyd, w porównaniu z rebaudiozydem A, co z kolei mogło wynikać z większej zawartości stewiolu w cząsteczce związku. Ponadto Doktorant wykazał, iż w warunkach łagodnej hiperglikemii potencjał przeciwcukrzycowy glikozydów stewiolowych, L-argininy i chromu(III) uwidocznił się najwyraźniej w poprawie niektórych wskaźników gospodarki węglowodanowej.

Wniosek końcowy

Na podstawie dokonanej oceny stwierdzam, iż rozprawa autorstwa mgr Jakuba Michała Kurka pt. *„Ocena przeciwcukrzycowego potencjału glikozydów stewiolowych, indywidualnie i we współdziałaniu z L-argininą i chromem(III) w badaniach modelowych in vitro i in vivo”* ma istotne walory poznawcze i jest na bardzo wysokim poziomie naukowym o dużej złożoności, a podjęty temat badawczy ma znaczenie w wymiarze i poznawczym i aplikacyjnym dla nauki zajmującej się badaniem zagadnień związanych z nauką o żywieniu człowieka, jak i technologią żywności. Praca doktorska jest oryginalnym i nowatorskim rozwiązaniem problemu naukowego, przy rozwiązywaniu którego Doktorant wykazał się wiedzą z zakresu dyscypliny oraz umiejętnościami prowadzenia badań naukowych. Przedłożona do oceny rozprawa jest opracowaniem oryginalnym, prawidłowo przygotowanym, spełniającym wymogi ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20.07.2018 (opublikowanej w Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Biorąc powyższe pod uwagę stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Jakuba Michała Kurka do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem nadania stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie ze względu na istotne elementy nowatorskie pracy i wkład do nauki oraz możliwość wykorzystania wyników w praktyce, jak też dojrzałość Doktoranta w prowadzeniu podjętych badań naukowych z wykorzystaniem różnych modeli badawczych i najnowocześniejszych technik dostępnych z tego zakresu, w tym o dużym stopniu złożoności, co pozwala stwierdzić, iż przedłożona do recenzji praca przekracza średni poziom prac doktorskich, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej. Do

wyróżnienia pracy skłania także niezwykle staranne przygotowanie strony edytorskiej dysertacji, potwierdzającej rzetelność warsztatu naukowego Doktoranta oraz publikacje w uznanych wysokopunktowanych czasopismach z list JCR i MNiSW, których mgr Jakub Michał Kurek jest konsekwentnie pierwszym autorem.

