

Prof. dr hab. inż. Iwona Konopka
Katedra Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Joanny Skoczylas

**pt. „Porównanie składu chemicznego i zawartości związków bioaktywnych
młodych roślin czosnku uprawianych z cebulek powietrznych i ząbków
oraz ocena wchłaniania zawartych w nich związków polifenolowych
w modelu *in vitro*”**

**wykonanej pod kierunkiem promotora – prof. dr hab. inż. Anety Kopec
z Katedry Żywienia Człowieka i Dietetyki, Wydziału Technologii Żywności,
Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie**

Podstawa prawna

Recenzję przygotowano na zlecenie Pana dr. hab. inż. Marcina Łukasiewicza, prof. URK, po wyznaczeniu mojej osoby na recenzenta przez Radę Dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Przewód doktorski został wszczęty na podstawie Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) oraz rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. (w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu naukowego (Dz.U. z 2018 r. poz. 261) i przeprowadzany jest w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie technologia żywności i żywienia (art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669).

Ocena formalna rozprawy

Pani mgr inż. Joanna Skoczylas przedstawiła rozprawę doktorską w formie monografii. Rozprawa liczy łącznie 162 strony, w tym wstęp teoretyczny przedstawiono na 22 stronach, część doświadczalną na 17 stronach, wyniki badań na 35 stronach, a ich dyskusję na 24 stronach. Dodatkowo rozprawa zawiera streszczenia (łącznie 4 strony streszczeń w języku polskim i angielskim), hipotezy i cel pracy (2 strony), wnioski (1 strona),

wykaz stosowanych skrótów (3 strony), spis tabel (3 strony), spis rycin (2 strony), aneks (6 stron), podziękowania (1 strona) oraz stronę tytułową w języku polskim. Doktorantka opracowała łącznie 35 tabel oraz 21 rysunków. Do przygotowania uzasadnienia tematu badań, wyboru metod analitycznych oraz dyskusji wyników wykorzystwała znaczącą liczbę 272 źródeł naukowych (26 stron pracy). Ponad 150 zacytowanych publikacji opublikowano w ostatnich 10 latach, w tym aż 37 publikacji pochodzi z lat 2020 - 2022. Wskazuje to na dobre źródłowe rozpoznanie tematyki badań przez Doktorantkę oraz aktualność przedstawionego stanu wiedzy. Tekst i dokumentacja pracy są przygotowane stosunkowo starannie, z niewielką liczbą tzw. literówek, błędów interpunkcyjnych oraz braku pełnych informacji w kilku cytowanych źródłach (brak pozycji w wykazie, brak roku wydania lub brak tytułu publikacji).

W kontekście oceny formalnej stwierdzam, że rozprawa ma prawidłową strukturę oraz proporcje rozdziałów dla pracy w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Ocena istotności tematu badań w dyscyplinie technologia żywności i żywienia

Doktorantka podjęła się trudu oszacowania różnic pomiędzy składem chemicznym młodych roślin czosnku uprawianych z cebulek powietrznych i z ząbków, porównania pojemności antyoksydacyjnej ekstraktów, zawartości wybranych składników polifenolowych po trawieniu metodą *in vitro* oraz oceny oddziaływania ekstraktów po trawieniu na żywotność i cytotoksyczność względem komórek Caco-2 oraz ekspresję w tych komórkach wybranych genów kodujących cytokiny pro- i przeciwzapalne.

Zaproponowana tematyka badań wpisuje się w aktualne trendy zainteresowania żywnością funkcjonalną pochodzenia roślinnego, zasobną w unikalne składniki sprzyjające zachowaniu homeostazy organizmu, chroniące przed rozwojem chorób lub nawet działające wspomagająco w leczeniu wybranych chorób. Młode rośliny czosnku można uznać za odpowiedniki roślinnych „microgreens” (mikrolistków). Wybór czosnku uznaję za zasadny z uwagi na unikalny skład związków siarki w tej roślinie oraz zasobność w związki fenolowe, szczególnie w roślinach na początkowym etapie rozwoju. Z uwagi na fakt, że czosnek można uprawiać zarówno z ząbków jak i cebulek powietrznych interesujące naukowo stało się porównanie zmian składu chemicznego roślin czosnku dwóch krajowych odmian (Harnaś i Ornak) w toku ich wegetacji (od maja do lipca).

Przeprowadzone badania są nowatorskie, adekwatne dla dyscypliny technologia żywności i żywienia, a uzyskane wyniki mają istotne znaczenie dla rozwoju nauki oraz posiadają walory aplikacyjne w kierunku rozwoju nowych źródeł żywności zasobnych w składniki bioaktywne.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej

We **przeglądzie literatury** Doktorantka przedstawiła opis botaniczny czosnku, szczegółowo omówiła składniki bioaktywne tej rośliny oraz dokonała starannego opisu

prozdrowotnych właściwości czosnku (działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwgrzybicze i przeciwwirusowe). Ta część pracy została uzupełniona o opis ochronnego oddziaływania spożycia czosnku na choroby układu krwionośnego (obniżenie poziomu cholesterolu całkowitego, frakcji LDL, trójglicerydów, regulacja/obniżenie skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi, zapobieganie zakrzepicy poprzez hamowanie agregacji płytek krwi) oraz ryzyko wystąpienia nowotworów okrężnicy, prostaty, przełyku, jamy ustnej i nerek. Doktorantka przedstawiła również dane na temat zalecanego dziennego spożycia świeżego czosnku (1-2 ząbki – ok. 4 g) oraz przeciwwskazania do jego stosowania (alergicy, osoby przyjmujące leki przeciwzakrzepowe). Zwróciła również uwagę na możliwe problemy zdrowotne ze strony przewodu pokarmowego po przekroczeniu zalecanych dawek. W opisie literaturowym odrębne części stanowią informacje dotyczące pojęcia biodostępności składników chemicznych z żywności, modelach *in vitro* trawienia w przewodzie pokarmowym oraz charakterystyce linii komórkowych wykorzystywanych w badaniach transportu transbłonowego składników z pokarmu (Caco-2 – gruczołakorak jelita grubego, HT-29 – gruczołakorak jelita grubego, MSCK – komórki nabłonka psich nerek, linia 2/4/A1 - komórki jelita płodu szczura). Omawiając biodostępność składników z pokarmu Doktorantka skupiła się na przemianach związków fenolowych (kwasów fenolowych i flawonoidów) w różnych odcinkach przewodu pokarmowego, wskazując na interakcje polifenoli z frakcją błonnikową, zależność przemian od pH oraz oddziaływanie mikrobioty jelitowej. Z tej części pracy usunęłabym jednak podsumowujący fragment ze str. 39 (nie ma on związku z tematem podrozdziału 1.4.3.). Tę część tekstu włączyłabym natomiast do kolejnego rozdziału pracy. W przeglądzie literaturowym Doktorantka nie uniknęła kilku skrótów myślowych, np. na str. 27 „Działanie przeciwwirusowe przypisuje się następującym związkom: ajoenowi, allicynie, tiosulfonianowi etylu allilu, ich ochrona polega na produkcji przeciwciał...”; na str. 32 „Na biodostępność związków polifenolowych ma także wpływ roślina...”; na str. 34 „...na biodostępność związków polifenolowych wpływa również rodzaj zastosowanej metody podczas trawienia oraz sposób prezentowania otrzymanych wyników”. Ponadto, czy rzeczywiście kwas synapowy jest mniejszą cząsteczką niż kwas ferulowy (str. 33)?

Doktorantka za **cel główny** badań przyjęła cyt. „...porównanie składu chemicznego i zawartości wybranych składników bioaktywnych oraz aktywności antyoksydacyjnej młodych roślin, polskich, ozimych odmian czosnku odmiany Harnaś i Ornak uprawianych z cebulek powietrznych lub ząbków. Dokonano również oceny biodostępności związków polifenolowych zidentyfikowanych w materiale roślinnym z wykorzystaniem statycznego modelu *in vitro* i modelu komórkowego linii Caco-2”. Uznaję, że cel główny badań został jasno określony i zrealizowany w postaci dobrze zaplanowanych 5 zadań szczegółowych. Pani mgr inż. Joanna Skoczylas postawiła w pracy **cztery hipotezy cząstkowe**, jednak moim zdaniem hipoteza 2, cyt.:

„2) trawienie metodą *in vitro* wpływa na zawartość związków polifenolowych w materiale z młodych roślin czosnku odmiany Harnaś i Ornak”,

powstała nie na etapie planowania eksperymentów, ale jako efekt uzyskania dyskusyjnych wyników zawartości polifenoli w strawionych ekstraktach młodych roślin czosnku. Proszę Doktorantkę o wypowiedź w tej kwestii podczas publicznej obrony.

W części doświadczalnej rozprawy mgr inż. Joanna Skoczyła szczegółowo opisała zastosowany materiał roślinny, w tym pochodzenie odmian oraz agrotechniczne i klimatyczne warunki ich uprawy w latach zbioru 2018-2020. Proszę w tym miejscu o wyjaśnienie niejasności dotyczącej liczby dni z opadami LDO w tabeli 1 (35 i 33 dni dla grudnia i stycznia oraz 30 dni dla lutego). W opisie zastosowanych materiałów Doktorantka podała również pochodzenie zastosowanej linii komórkowej Caco-2. Schemat doświadczeń został przedstawiony szczegółowo na poglądowych rycinach 7 i 8, ale nazwa zawierającego te ryciny podrozdziału 3.2. powinna być uzupełniona (to nie tylko „Metody”). Ryciny 6-8 powinny być ponadto poprzedzone tekstem wprowadzenia z ich zacytowaniem.

W dalszej części tego rozdziału pracy Doktorantka szczegółowo opisała zastosowane techniki analityczne dotyczące oznaczenia zawartości suchej masy, białka, tłuszczu, błonnika zgodnie z procedurami AOAC, składników mineralnych za pomocą wysokodispersyjnego spektrometru emisyjnego z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-OES), witaminy C metodą Thillmanna, zawartości polifenoli ogółem z odczynnikiem Folin-Ciocalteu, pojemności antyoksydacyjnej w kolorymetrycznych testach ABTS, DPPH i FRAP i składu kwasów tłuszczowych metodą GC-MS. Doktorantka wyczerpująco przedstawiła również opis oznaczania 19 związków polifenolowych czosnku (9 flawonoidów i 10 kwasów fenolowych) techniką HPLC-DAD oraz 3 związków siarkowych (alliny, SAC i GSAC) techniką HPLC-MS.

Po dokonaniu selekcji próbek, na młodych roślinach czosnku zebranych w maju oraz dojrzałych ząbkach, przeprowadzono eksperymenty trawienia *in vitro* (symulacje trawienia żołądkowego i jelitowego) wg metodyki Starzyńskiej-Janiszewskiej i in. (2016) – niestety brak tej pozycji w wykazie piśmiennictwa. Przeprowadzono również namnażanie komórek Caco-2 z zachowaniem rekomendowanej wartości rezystancji elektrycznej TEER w przedziale 450-700 Ωcm^2 , a następnie badano żywotność komórek w obecności w pożywce ekstraktów z czosnku w stężeniach 1.5, 1.8 i 2.0 mg/ml. Żywotność komórek badano w testach z wybarwianiem 0.5% roztworem fioletu krystalicznego oraz w testach z odczynnikiem Owena (test tetrazolowy MTS). Do oceny cytotoksyczności ekstraktów czosnku Doktorantka zastosowała zestaw komercyjny (Cytotoxicity Detection Kit). Końcowym etapem badań była ocena ekspresji wybranych genów w komórkach Caco-2 z wykorzystaniem techniki Real-Time PCR z barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Green. Część doświadczalną kończy opis zastosowanych metod statystycznych i ich wykorzystania w oprogramowaniu Statistica w wersji 13. Mgr inż. Joanna Skoczyła zastosowała analizę wariancji z testem post-hoc Duncana (analiza dwuczynnikowa) i test t-Studenta (analiza jednoczynnikowa) dla wykazania różnic między badanymi wariantami.

W posumowaniu opinii na temat tego rozdziału pracy stwierdzam, że materiał badawczy, organizacja eksperymentów i zastosowane techniki analityczne zostały prawidłowo dobrane. Szczegółowo opisano sposób postępowania w każdej procedurze analitycznej oraz wyczerpująco podano dane wykorzystanej aparatury i parametry ich pracy.

Główną część pracy stanowi **omówienie wyników** (str. 61-96). W tej części Doktorantka zamieściła 22 tabele z wynikami badań oraz 8 rysunków. Moim zdaniem, w kontekście tematu rozprawy doktorskiej, wyniki w tabelach 2-15 powinny być przedstawione w odmienny sposób. Bardziej zasadne byłoby porównanie w jednej tabeli składów chemicznych i pojemności antyoksydacyjnych roślin jednej odmiany wyhodowanej z ząbków lub cebulek powietrznych w badanych trzech miesiącach. Pomimo tej usterki, do najważniejszych wyników opisujących I etap badań (ocena składu chemicznego i pojemności antyoksydacyjnej) zaliczam wykazanie, że młode rośliny czosnku zebrane w maju zawierają najwięcej białka, tłuszczu ogółem, błonnika pokarmowego i popiołu ogółem, natomiast wraz z dojrzewaniem roślin czosnku rośnie w nich zawartość suchej masy i węglowodanów. Dominującymi składnikami mineralnymi czosnku były: potas, wapń, siarka, fosfor i magnez, których największe ilości stwierdzono w roślinach z ząbków zebranych w maju. W obu typach młodych roślin czosnku stwierdzono śladowe ilości niklu i kadmu, natomiast zawartość glinu była ok. 4-krotnie wyższa w roślinach z wysiania cebulek powietrznych. Co typowe, najwięcej glinu zawierały rośliny zebrane w maju. W roślinach otrzymanych z wysadzenia ząbków stwierdzono więcej witaminy C i polifenoli ogółem. Również wszystkie testy badania pojemności antyoksydacyjnej potwierdziły wyższość młodych roślin pozyskanych z wysadzenia ząbków, szczególnie tych zebranych w maju. Wśród flawonoidów dominowały w obu typach młodych roślin: katechina, epikatechina, rutyna i hesperydyna, jednak więcej tych związków zawierały rośliny uprawiane z ząbków. W młodych roślinach otrzymanych z wysiania cebulek powietrznych dominowały cztery kwasy fenolowe: syringowy, ferulowy, synapowy i chlorogenowy, natomiast w młodych roślinach z wysadzenia ząbków: kwas syringowy, 4-hydroksybenzoesowy, chlorogenowy i synapowy. Skład kwasów tłuszczowych był różnicowany głównie przez termin zbioru roślin i odmianę. Młode rośliny zebrane w maju otrzymane z wysadzenia ząbków zawierały zdecydowanie więcej związków siarki, z dominującym udziałem alliny (sulfotlenek S-allilo-L-cysteiny). Porównanie składu całych młodych roślin wysadzonych z ząbków z dojrzałymi ząbkami czosnku potwierdziło wyższą zawartość większości składników bioaktywnych (poza mniejszą ilością L- γ -glutamyl-(S)-allilo-cysteiny) w całych młodych roślinach.

Do istotnych rezultatów badań zaliczam wykazanie, że związki polifenolowe obecne w płynie po trawieniu młodych roślin czosnku zostały w dużej mierze wchłonięte przez komórki Caco-2. Żywotność tych komórek pozostawała na zbliżonym do kontroli poziomie po 24 i 72 godz. hodowli, przy stężeniu ekstraktów na poziomie 1.5 i 1.8 mg/ml pożywki. Cytotoksyczność powyżej 10% względem komórek Caco-2 wykazały wybrane ekstrakty z młodych roślin czosnku przy stężeniu 2.0 mg/ml. Wpływ ekstraktów na ekspresję genów cytokin pro- i przeciwzapalnych był różnicowany, zależny od odmiany i typu ekstraktu. Większe obniżenie ekspresji genów prozapalnych cytokin (IL8 i IL1 β) oznaczono dla ekstraktów z odmiany Harnaś. Wzrost ekspresji przeciwzapalnej cytokiny CCL2 stwierdzono dla ekstraktów z ząbków i młodych roślin czosnku odmiany Harnaś oraz ząbków odmiany Ornak. Ekstrakty z dojrzałych ząbków obu odmian czosnku hamowały ekspresję prozapalnej cytokiny IL6.

W rozdziale **dyskusja wyników** (str. 97-121) Doktorantka poprawnie skorzystała z licznych źródeł naukowych, chociaż dyskusję naukową niewątpliwie utrudniał brak

wyników badań dla młodych roślin czosnku uprawianych z wysiania cebulek lub wysadzenia ząbków oraz różnice jednostek dla wartości w cytowanych źródłach (podawano wartości w przeliczeniu na suchą lub świeżą masę). Dużą zaletą przedstawionej dyskusji wyników uzyskanych w etapie I badań jest przedstawianie zawartości wielu składników czosnku w odniesieniu do norm RDA. Z kolei badania etapu II dotyczące żywotności komórek Caco-2 potwierdziły, że ekstrakty z młodych roślin czosnku działają podobnie do ekstraktów z dojrzałych ząbków, olejku czosnkowego lub wybranych związków siarkowych czosnku. Doktorantka przedstawiła dostępne dane na temat oddziaływania preparatów czosnku na różne linie komórkowe, wskazując na dużą zmienność i rozbieżności w uzyskiwanych przez badaczy wynikach. W aspekcie wpływu ekstraktów czosnku na ekspresję genów wskazała jako kluczowe: związki siarki, polifenole oraz cynk i miedź, które mogą wpływać na wyciszenie stanu zapalnego w organizmie, pracę układu immunologicznego i ograniczają syntezę prozapalnych cytokin. Wyniki badań własnych Doktorantki, podobnie do niektórych cytowanych źródeł, potwierdziły możliwość ograniczenia stanu zapalnego w komórkach Caco-2 po kontakcie ze składnikami młodych roślin czosnku.

W kontekście dyskusji na temat przemian związków fenolowych w przewodzie pokarmowym proszę Doktorantkę o podsumowanie cytowanych źródeł w aspekcie zawartości kwasów fenolowych i flawonoidów w płynie po trawieniu. Jakie mogły być przyczyny tak wysokiej redukcji tych związków po trawieniu *in vitro*? Proszę również o porównanie treści pracy na stronach 114 i 116 odnoszących się do kwercetyny – czy ten związek ulega degradacji w jelicie po trawieniu, czy też jest metabolizowany dopiero po wchłonięciu?

Ostatnią część rozprawy stanowi rozdział **Wnioski**, w którym Doktorantka zamieściła 5 wniosków będących odpowiedzią na przedstawione hipotezy badawcze. Potwierdziła tym samym, że:

- 1) skład chemiczny młodych roślin czosnku jest zależny od terminu zbioru, odmiany i typu młodej rośliny (z cebulek powietrznych lub z ząbków);
- 2) po trawieniu metodą *in vitro* maleje w ekstraktach młodych roślin czosnku zawartość flawonoidów i kwasów fenolowych;
- 3) z płynu po trawieniu *in vitro* kwasy fenolowe i flawonoidy są wchłaniane przez komórki Caco-2;
- 4) ekstrakty z młodych roślin czosnku i z dojrzałych ząbków powodują spadek ekspresji genów wybranych cytokin prozapalnych.

Zaproponowany szósty wniosek jest podsumowaniem całokształtu badań i programową wskazówką, jakie dalsze prace powinny być podjęte, aby jednoznacznie potwierdzić prozdrowotne właściwości młodych roślin czosnku.

Dodatkowe tematy do dyskusji:

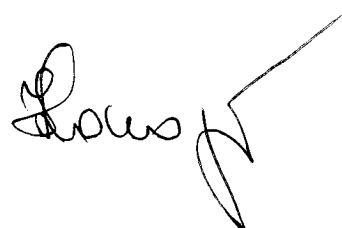
- 1) Czy zasadne jest stosowanie pojęcia aktywność antyoksydacyjna w testach ABTS, DPPH i FRAP jeżeli wyniki przedstawia się jako równoważniki Troloksu?
- 2) Jakie są przyczyny różnic w wartościach pojemności antyoksydacyjnej ekstraktów w przeprowadzonych testach? – jaki jest mechanizm działania antyoksydacyjnego w tych testach,

- 3) Jakie jest zdanie Doktorantki nt. adekwatności podawania wartości liczbowych z tak dużą dokładnością, np. 2930.25 (Tabela 6).

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Skoczylas spełnia warunki określone w art. 13, ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789). Potwierdzam, że recenzowana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i **wniosuję do Rady Dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania.**

Olsztyn, 15.08.2022 r.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Kowalski', with a long horizontal stroke extending to the right.