

Szczecin, 06.09.2022 r.

Dr hab. inż. Agnieszka Tomza-Marciniak, prof. ZUT
Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Zwyrzykowskiej-Wodzińskiej

pt.: *Identyfikacja i działanie substancji biologicznie aktywnych zawartych w różnych gatunkach
ostrokrzewów (Ilex sp.) – badania in vitro i in vivo*

Praca doktorska została wykonana na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt, w Katedrze Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Roberta Kupczyńskiego i dr hab. inż. Sebastiana Opalińskiego, prof. UP.

Metabolity wtórne roślin od szeregu lat są przedmiotem wielokierunkowych badań mających na celu m.in. ocenę ich aktywności biologicznej, zwłaszcza pod kątem korzystnych właściwości dla zdrowia ludzi i zwierząt. Dość dobrze udokumentowane jest pozytywne działanie ekstraktów ostrokrzewu paragwajskiego na parametry gospodarki lipidowej i węglowodanowej u osób i zwierząt z chorobami metabolicznymi. Dlatego szczególnie wartościowe wydają się być badania mające na celu wskazanie czy europejskie gatunki i odmiany tej rośliny wykazują podobieństwo zarówno w składzie fitochemicznym jak i we właściwościach biologicznych do ww. gatunku. Biorąc to pod uwagę uważam, że temat podjęty przez Doktorantkę w niniejszej rozprawie doktorskiej jest aktualny i niezwykle ważny pod względem poznawczym i praktycznym, zwłaszcza w kontekście profilaktyki zootechniczno-weterynaryjnej.

Rozprawa doktorska została napisana w formie monografii z klasycznym układem. Rozprawa liczy 141 stron i zawiera kolejno: Objasnienia skrótów, Spis treści, Wstęp (2 strony), Przegląd piśmiennictwa z 3 podrozdziałami (22 strony), Cel badań i hipotezy badawcze (1 strona), Materiały i metody (20 stron), Wyniki (49 stron), Dyskusja (14 stron), Wnioski (2 strony), Piśmiennictwo (16 stron, 182 pozycje), Spis tabel, rycin i fotografii (4 strony) oraz Streszczenie w języku polskim (2 strony) i angielskim (2 strony). W pracy znajduje się 14 tabel, 33 ryciny i 11 fotografii. Z formalnego punktu widzenia przedłożona do recenzji praca jest zgodna z wymogami stawianymi rozprawie doktorskiej.

Ocena merytoryczna pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Zwyrzykowskiej-Wodzińskiej koncentruje się na identyfikacji związków bioaktywnych pozyskiwanych z roślin rodzaju *Ilex* sp. i ich wpływie na wybrane parametry zdrowotne zwierząt, a biorąc pod uwagę udokumentowane w literaturze korzystne działanie ekstraktów z *Ilex* sp. także na jakość mleka, mięsa czy odchów zwierząt gospodarskich należy uznać, że praca wpisuje się w obszar dyscypliny zootechnika i rybactwo. Podjęte przez Doktorantkę badania uważam za uzasadnione z naukowego punktu widzenia.

Rozprawę otwiera część teoretyczna, czyli Wstęp i Przegląd piśmiennictwa, w której Doktorantka wprowadza w podjętą przez siebie tematykę i dokonuje przeglądu piśmiennictwa z tego zakresu i uzasadnia swoje badania. Ta część pracy została napisana w oparciu o bogate piśmiennictwo z uwzględnieniem aktualnego stanu wiedzy i jest ściśle związana z badawczą częścią pracy. Do tej części rozprawy mam kilka uwag, które jednak nie umniejszają wartości merytorycznej pracy:

- na str. 16 – opisane zostały flawonoidy, wymieniono 6 podklas tych związków i dokonano krótkiej charakterystyki jednej z nich – flawonoli. W mojej opinii, należało konsekwentnie scharakteryzować również pozostałe podklasy.
- na str. 21 – znajduje się zdanie, cytując „*Okolo jedna trzecia wszystkich wchłoniętych estrów jest pochłaniana w górnym odcinku przewodu pokarmowego, podczas gdy okolo dwie trzecie dociera do okrężnicy (...)*”. Omawiając metabolizm związków nie posługujemy się terminem „pochłanianie” – mówimy o wchłanianiu albo absorpcji.

W dalszej części tego samego akapitu znajduje się niezrozumiałe stwierdzenie: „widoczna biodostępność kwasu chlorogenowego w osoczu i moczu”. Ocena biodostępności na podstawie tego co obserwujemy w osoczu może się obronić, natomiast w moczu już nie, ponieważ musimy tu uwzględnić zarówno proces ewentualnej kumulacji w tkankach, jak i wydalanie związków innymi drogami.

- na str. 22 znajdują się 2 zdania (kolejno 2. i 3. zdanie), które w mojej ocenie wymagają przeredagowania, cytując: „*Kwas chlorogenowy i jego pochodne nie były dobrze wchłaniane w niezmienionej postaci. Ponadto, kwas chlorogenowy i kwasy fenolowe pojawiły się szybko w osoczu, co wskazuje na wczesne wchłanianie w przewodzie żołądkowo-jelitowym, podczas gdy metabolity związków fenolowych, (...), pojawiły się o wiele wolniej, za to w wysokiej koncentracji”.* Należałoby jasno określić czy ocenie polega efektywności wchłaniania (np. % podanej lub pobranej dawki) czy szybkość wchłaniania.
- na str. 23 znajduje się zdanie: „*Przegląd dostępnej literatury potwierdza, iż suplementacja yerba mate u przeżuwaczy przynosi wiele pozytywnych skutków*”. Niestety zabrakło cytowań i odniesienia do tych badań. Informacje te znajdują się w dyskusji wyników, przy czym w mojej ocenie powinny być one uwzględnione właśnie w tym rozdziale, tym bardziej, że w dużej części odnoszą się do efektów produkcyjnych.

- na str. 25 Doktorantka opisała zastosowanie modeli zwierzęcych i zwróciła uwagę na konieczność stosowania zasady 3R, jednocześnie wyjaśniając, co oznaczają poszczególne R. Przy REDUCTION czytamy: „zmniejszenie liczby zwierząt poprzez lepsze wykorzystanie metod statystycznych”. Ta zasada jest realizowana nie tylko poprzez „lepsze wykorzystanie metod statystycznych”, ale przede wszystkim dzięki zastosowaniu takich procedur badawczych, aby możliwe było uzyskać porównywalne poziomy informacji dzięki wykorzystaniu mniejszej liczby zwierząt lub uzyskiwania większej ilości informacji od tej samej liczby zwierząt.

Cel badań

W tym rozdziale Doktorantka przedstawiła 3 cele badawcze. Dwa z nich dotyczyły analizy chemicznej, a więc określenia składu jakościowego i ilościowego metabolitów wtórnych taksonu *Ilex* (*I. paraguariensis*, *I. aquifolium* L., *I. aquifolium* 'Argentea Marginata', *I. meserveae* 'Blue Angel'), ze szczególnym uwzględnieniem związków terpenoidowych, polifenoli, saponin, a także kwasów organicznych oraz oceny właściwości przeciwutleniających polifenoli zawartych w ekstraktach wodnych *Ilex* sp.

Trzeci cel dotyczył oceny wpływu ekstraktów wodnych z *I. paraguariensis* i *I. meserveae* na kształtowanie się parametrów hematologicznych, biochemicznych, immunologicznych oraz oceny histopatologicznej wybranych narządów szczurów Wistar otrzymujących dietę standardową lub hipercholesterolomiczną.

Moja uwaga dotyczy fragmentu, w którym przedstawiono wg Doktorantki hipotezy badawcze. W związku z tym, że pierwsza z nich jest pytaniem, należy uznać, że jest to problem badawczy, a nie hipoteza i wymaga preredagowania.

Metodyka badań

W pierwszej części tego rozdziału szczegółowo opisano badane ostrokrzewy i procedury przygotowania z nich poszczególnych rodzajów ekstraktów, wykorzystanych do analizy chemicznej. W kolejnym etapie opisano warunki przeprowadzenia rozdzielania chromatograficznego badanych analitów z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (GCMS) i ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (UPLC-MS/MS), a także metodykę przygotowania próbek i wykonania analiz spektrofotometrycznych w kierunku oznaczenia ogólnej zawartości polifenoli i właściwości przeciwutleniających. Do tej części mam następujące uwagi:

- O ile w bardzo szczegółowy sposób opisano analizę instrumentalną, w tym parametry pracy wysokospecjalistycznej aparatury badawczej, o tyle w mojej ocenie zabrakło takiej samej szczegółowości przy opisanu procedury przygotowania próbek do planowanych analiz, np. nie ma podanej czystości zastosowanych odczynników chemicznych i nazwy producenta tychże odczynników, co jest wymagane w publikacjach naukowych.

- Brakuje informacji na temat zastosowanych roztworów wzorcowych (rodzaj, skład, producent).
- W mojej ocenie to w tym rozdziale, a nie w wynikach, powinny być zawarte informacje na temat czasu retencji i jonów charakterystycznych dla poszczególnych związków, na podstawie których zidentyfikowano te związki chemiczne.

W dalszej części tego rozdziału opisano zwierzęta wykorzystane w badaniach, układ doświadczenia i rodzaj badań wykonanych na materiale pobranym od zwierząt doświadczalnych. Brakuje natomiast informacji o aklimatyzacji zwierząt oraz w jaki sposób przygotowano ekstrakty do picia. Wyjaśnienia wymaga także niespójność w podawanych informacjach: z podrozdziału 4.6.1 wynika, że spożycie paszy kontrolowane było codziennie, a z podrozdziału 4.6.2 – że co trzy dni.

Czytając podrozdział pt. Analiza statystyczna można odnieść wrażenie, że analizie statystycznej poddano tylko wyniki otrzymane w badaniach z użyciem szczurów. A co z wynikami analiz chemicznych?

Wyniki

Na uwagę zasługuje bardzo szeroki zakres zrealizowanych prac badawczych oraz ich interdyscyplinarność. Bardzo szczegółowo przedstawiono wyniki analiz chemicznych, biochemicznych, hematologicznych, morfotycznych i histologicznych. Wyniki, zebrane w tabelach, na rycinach i fotografiach, zostały opisane na 49 stronach.

Uwagi i sugestie dotyczące wyników:

- Przedstawione wyniki mają charakter jakościowy oraz półilościowy. W przypadku analiz chemicznych zabrakło typowo ilościowego przedstawienia wyników badań. Jeżeli wyniki przedstawiono jako powierzchnię pod pikiem (%) to znaczy, że do analizy wykorzystano roztwory kalibracyjne zawierające analizowane związki. W związku z tym, dlaczego wyników nie przedstawiono w jednostkach określających ich stężenie?
- Jony charakterystyczne dla danych związków powinny znaleźć się w Materiałach i metodach, a opieranie identyfikacji związków o dane literaturowe w tym rozdziale powoduje, że rozdział ten zawiera fragmenty dyskusji.
- str. 53, cytat: „*W ekstraktach zidentyfikowano 19 różnych związków fenolowych (...)*”, natomiast z tabeli wynika, że zidentyfikowano 17 związków, a pozostałych nie określono. Na chromatogramach 10-13 brakuje opisu osi Y (powinno być m/z).
- na str. 59 czytamy: „*Łącznie zidentyfikowano 46 związków w ekstraktach wodnych (...)*”. Wydaje się, że bezpieczniej byłoby użyć określenia STWIERDZONO, nie ‘zidentyfikowano’. Z tabeli 6 wynika, że liczba w pełni zidentyfikowanych związków w badanych ekstraktach jest mniejsza.
- str. 66 – w opisie wyników analizy chemicznej frakcji saponinowej ograniczono się tylko do zbadania i porównania składu *I. paraquariensis* i *I. meserveae*. Dlaczego, skoro w celu pracy było porównanie składu jakościowego i półilościowego 4 taksonów *Ilex*?

- str. 67-68 - Tabela 7 - co oznacza skrót RA [%]?
- na str. 72-73 znajdują się chromatogramy nr 20-23 przedstawiające rozdział chromatograficzny ekstraktów dichlorometanowych, ale w ich podpisie jest mowa o ekstraktach chloroformowych.
- na str. 75 znajduje się rycina 24 przedstawiająca ogólną zawartość polifenoli w ekstraktach wodnych i metanolowych – jest to powtórzenie danych z tabeli 9, ponadto brakuje w niej jednostek, w jakich wyrażono wyniki analiz.
- str. 77-78 - Ryciny 25-27 przedstawiają te same wyniki co tabela 10. Brakuje w nich jednostek przy osi y.

We fragmencie dotyczącym wydajności ekstrakcji znajduje się zdanie, cytat: „Z 5 g rozdrobnionej i wysuszonej tkanki ekstrahowanej wodą, zgodnie z przyjętą procedurą, uzyskano $1,1855 \pm 0,1063$ g” – ale nie wyjaśniono: czego?

- str. 79 - tabela 11 - oznaczenia istotności różnic zostały wprowadzone w sposób, który nie pozwala na interpretację wyników i właściwie nie wiadomo między jakimi grupami dokonywano porównań. Wymaga to poprawienia. Przy danych dotyczących przyrostów dobowych masy ciała w poszczególnych grupach, prócz gwiazdek zastosowano jeszcze inne oznaczenie: ++ i brak jest wyjaśnienia co ono oznacza.
- str. 80, znajduje się zdanie, cytat: „Analiza zużycia wody z ekstraktem w trakcie trwania całego doświadczenia (Ryc. 29), w zależności od grupy, wykazała w przypadku grup żywionych dietą bez dodatku cholesterolu wzrost zużycia dla grup otrzymujących ekstrakty”. Zdanie jest niezrozumiałe, ponadto proponowałabym użycie określenia „spożycie” zamiast „zużycie” wody. Na rycina 29 - brak oznaczeń, które wartości różnią się istotnie między sobą.

Od str. 84, rozpoczyna się podrozdział, w którym opisano wyniki badań biochemicznych, tj. stężenia cholesterolu całkowitego, HDL, trójlicerydów, NEFA, glukozy, białka całkowitego, albuminy, kreatyniny, aktywności ALT i AST.

- Nasuwa się pytanie dlaczego nie oznaczono stężenia LDL?
- W opisie wyników z badań stężenia cholesterolu i niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych ograniczono się do opisu wpływu dodatku cholesterolu do diety na te parametry, natomiast zabrakło opisu wpływu zastosowanych ekstraktów z *Ilex* sp.
- str. 85 - cytat: „Zawartość glukozy we krwi szczurów charakteryzowała się tendencją malejącą zarówno w przypadku grup żywionych dietą bez jak i z dodatkiem cholesterolu. W drugim pobraniu krwi w grupach suplementowanych ekstraktami z *Ilex* sp. (YM, IM, YMCH, IMCH) wykazano istotne ($p \leq 0,01$) obniżenie się zawartości glukozy”. Co było odniesieniem do stwierdzenia „obniżenie się zawartości glukozy”?

Podobna uwaga dotyczy opisu wyników stężenia kreatyniny. Doktorantka wskazuje, że cytat: „W dniu zakończenia doświadczenia stwierdzono wysoko istotne ($p \leq 0,01$) obniżenie się zawartości kreatyniny w grupie otrzymującej ekstrakt z *I. paraguariensis* (YMCH)(...)”, a z tabeli wynika, że odnotowane

stężenie było wyższe w porównaniu do: pierwszego terminu pobrania krwi dla danej grupy oraz do grupy otrzymującej ten sam ekstrakt, ale bez cholesterolu. Otrzymana wartość nie różniła się istotnie od wartości odnotowanych w grupach kontrolnych.

Wielokrotnie w tym podrozdziale pojawia się określenie „tendencja malejąca”, „tendencja rosnąca”. Jest to niefortunne określenie i nie wyjaśniono na jakiej podstawie określano tę tendencję.

- str. 88, cytat: „*Analizując poziom interleukin w surowicy krwi, badano stężenie IL-6 oraz IL-10. W grupie kontrolnej otrzymujących dietę z dodatkiem cholesterolu zaobserwowano niższą zawartość IL-6 (KCH).*” W porównaniu do czego? grupy kontrolnej nieotrzymującej cholesterol czy w porównaniu do innych grup cholesterolowych?
- zdanie, cytat: „*W przypadku IL-10, niższą zawartość tych cytokin zaobserwowano w grupach kontrolnych K i KCH*” nie znajduje uzasadnienia w danych zestawionych w tabeli 14.
- str. 98, na rycinie 30, przedstawiającej średnią długość kosmków jelitowych badanych zwierząt brakuje jednostek. Nie ma ich również z tytule ryciny. Podobna uwaga dotyczy ryciny 31, 32 i 33.
- na str. 100, znajduje się zdanie, cytat: „*Dieta z dodatkiem cholesterolu również wzmacnia diurezę, ale w tej diecie zarówno grupa otrzymująca ekstrakt z *I. paraguariensis* (YMCH) i grupa otrzymująca ekstrakt z *I. meserveae* (IMCH) wywołuje jego istotny statystycznie spadek intensywności. Ten parametr należy jednak odnieść do stopnia przekrwienia kłębuszka naczyniowego.*” Ten fragment jest niezrozumiały i wymaga wyjaśnienia i przerehabilitacji. Nasuwa się również pytanie na jakiej podstawie oceniono diurezę? - w części metodycznej nie ma informacji na ten temat.

Dyskusja

Ten rozdział rozpoczęto od wyjaśnienia zainteresowania europejskimi gatunkami ostrokrzewów. Wymieniono najważniejsze związki chemiczne *Ilex paraquariensis* i przystąpiono do interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników. Choć dyskusja została przeprowadzona w sposób sprawny i logiczny to niemniej jednak mam kilka uwag i pytań:

- na str. 103 autorka podaje, cytat: „*Zawartość kwasu chlorogenowego była najwyższa w przypadku ekstraktów z *I. aquifolium* L. i wynosiła 15,49% pola powierzchni pod pikiem (%PP).*” To stwierdzenie nie zgadza się z przedstawionymi wcześniej wynikami, ponieważ jak wynika z tabeli 5 wartość 15,49% PP odnotowano w ekstrakcie z *I. meserveae* ‘Blue angel’, a dla ekstraktu z *I. aquifolium* L. odnotowano wartość 12,82% PP.
- str. 105, cytat: „*(...) zawartość fenoli, określona metodami spektrofotometrycznymi i chromatograficznymi w niniejszej pracy, wykazała dobrą korelację.*” Niestety nie znalazłam wyników badania tej korelacji.

Ocena właściwości antyoksydacyjnych badanych ekstraktów to 3 krótkie akapity, będące właściwym powtórzeniem wyników. Spodziewałabym się wskazania, który gatunek charakteryzuje się największymi

właściwościami przeciwutleniającymi, a który najmniej. I porównania z innymi gatunkami roślin, tak jak to zrobiono omawiając polifenole.

- str.108: cytat: „*W innym badaniu, włączenie 2,5% yerba mate do diety jagniąt zmieniło skład mleka, w szczególności zwiększyło zawartość tłuszczu, białka i całkowitej koncentracji substancji stałych, jak również wpłynęło na niższą zawartość laktozy [Po i wsp., 2012; Celi, 2012].*” Zdanie wymaga przeredagowania, ponieważ wynika z niego, że jagnięta produkują mleko, a tak nie jest. W tej cytowanej pracy badaniami objęte były nie tylko jagnięta, ale także ich matki.
- w II akapicie na str. 110 Doktorantka stwierdza, że niektóre wyniki badań biochemicznych „znalazły się poza granicą normy”. W mojej ocenie należało wskazać te parametry oraz grupę doświadczalną, w której ta sytuacja miała miejsce, a następnie przedyskutować wyniki.

Kolejny akapit to opis wyników badań cholesterolu w danych grupach. Znajduje się tam zdanie, powołujące się na wyniki badań Andrade i wsp. [2012], cytat: „*Podawanie szczirom ekstraktu nie wpłynęło na poziom cholesterolu we krwi zwierząt, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w badaniach własnych.*” A przecież w z tabeli 13 wynika że stężenie cholesterolu w grupie YM, a więc otrzymujący ekstrakt z *I. paraquariensis* jest większe w porównaniu do kontroli, a dodatkowo w II. pobraniu te różnice są statystycznie istotne.

Na podstawie uzyskanych wyników i przeprowadzonej dyskusji Doktorantka sformułowała 8 wniosków. W mojej ocenie, część z nich to stwierdzenia. Jeden z wniosków dotyczy wpływu badanych ekstraktów na lipolizę. Wyjaśnienia wymaga na jakiej postawie go sformułowano?

Wymienione uwagi i sugestie nie umniejszają wartości rozprawy i prezentowanych w niej wyników. Poruszane w niej problemy wymagały znajomości zagadnień zarówno z zakresu chemii analitycznej, jak i procesów zachodzących z organizmie zwierząt. Wysoko oceniam ogrom pracy włożony w realizację tego projektu, wartość przedłożonej pracy oraz fakt poradzenie sobie z tym trudnym i obszernym zadaniem badawczym.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny praca pt. *Identyfikacja i działanie substancji biologicznie aktywnych zawartych w różnych gatunkach ostrokrzewów (Ilex sp.) – badania in vitro i in vivo* stanowi wartościowe opracowanie problemu naukowego i spełnia wymogi art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2014 poz. 1789 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1, ust. 3 pkt. 2b Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Anny Zwyrzykowskiej-Wodzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Tomasz-Marañniak 7