

Dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek, prof. nadzw. PG
Politechnika Gdańska
Katedra Chemii, Technologii
i Biotechnologii Żywności

ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk
tel: 58 347 17 23
fax: 58 347 22 48
e-mail: agnieszka.bartoszek@pg.gda.pl



Gdańsk, 9 maja 2019

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Pauliny Drózdź

**pt. "Badanie możliwości wykorzystania produktów ubocznego użytkowania lasu
jako źródła antyutleniaczy"**

Przeciwutleniacze były przedmiotem badań nauk o żywności od dawna, przy czym początkowo niemalże wyłącznie jako substancje chroniące żywność przed niepożądanymi reakcjami utlenienia, co miało i ma nadal szczególne znaczenie w przemyśle tłuszczowym. Rola przeciwutleniaczy w różnych aspektach funkcjonowania ludzkiego organizmu zwróciła uwagę badaczy pod koniec ubiegłego wieku i cieszy się niesłabnącym zainteresowaniem od tamtego czasu. Rosnące zrozumienie roli homeostazy redoksowej w dobrostanie człowieka spowodowało, że przeciwutleniacze w żywności z substancji istotnych tylko technologicznie stały się substancjami postrzeganymi jako ważne czynniki prozdrowotne. Szczególnie dotyczy to antyoksydantów pochodzenia roślinnego, którym przypisuje się wielokierunkowe działanie biologiczne. Zyskały sobie one status bioaktywnych fitozwiązków zdolnych do przeciwdziałania chorobom przewlekłym określanym także mianem cywilizacyjnych, których rozwój jest powiązany z tzw. stresem oksydacyjnym. Ta nowa rola przeciwutleniaczy budzi żywe zainteresowanie przemysłu żywnościowego, w tym producentów suplementów diety, oraz farmaceutycznego. Zapotrzebowanie przemysłu na bioaktywne związki fitochemiczne zapoczątkowało też poszukiwania nowych źródeł roślinnych antyoksydantów, któremu to celowi mogą służyć także badania dotyczące produktów ubocznego użytkowania lasu wykonane w ramach pracy doktorskiej Pani mgr Pauliny Drózdź.

Praca doktorska została zrealizowana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Promotor pracy prof. dr hab. Krystyna Pyrzyńska jest znaną specjalistką w dziedzinie analityki przeciwutleniaczy i oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej substancji pochodzenia naturalnego. Celem podjętych badań było oznaczenie aktywności przeciwutleniającej oraz składu i zawartości związków polifenolowych w wybranych ubocznych użytkach leśnych znanych medycynie ludowej, takich jak dziko rosnące owoce jadalne (jagody i borówki), kwiaty wrzosu oraz kora drzew (sosny pospolitej i dębu). Taka wiedza oraz dopracowane metody analityczne są warunkiem niezbędnym do racjonalnego, nowoczesnego zagospodarowania tych zasobów dotychczas wykorzystywanych w sposób wynikający z tradycji rzadko popartej systematycznymi badaniami naukowymi.

Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera 162 strony maszynopisu. Na dysertację składają się następujące rozdziały: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie i część literaturowa (7 bloków tematycznych), Cel pracy, Część eksperymentalna obejmująca Materiały i Metody, Wyniki i Podsumowanie badań omawiane osobno dla każdego rodzaju badanego materiału roślinnego oraz umieszczona na końcu lista cytowanych publikacji obejmująca 228 pozycji (rozdział Literatura) oraz Prezentacja dorobku naukowego. Dysertację rozpoczyna krótkie Wprowadzenie, w którym Doktorantka przedstawia najważniejsze informacje dotyczące produktów ubocznego użytkowania lasu, nazewnictwa oraz sposobów i skali eksploatacji oraz korzyści z ich obecnego wykorzystania praktycznego. Z tego opisu wynika, że ciągle obowiązuje bardzo tradycyjne podejście i udział naukowców może przyczynić się do znacznie efektywniejszego zagospodarowania wspomnianych zasobów leśnych.

Część literaturowa rozprawy zawiera dwa wątki ściśle powiązane z tematyką pracy. Pierwszy to opis roślin, które są przedmiotem badań pod względem składu przede wszystkim bioaktywnych fitozwiązków oraz postulowanego działania biologicznego. Drugi wątek jest bardziej analityczny i dotyczy metod wyodrębniania substancji polifenolowych z matrycy roślinnej, ich analizy chromatograficznej oraz oznaczania aktywności przeciwutleniającej. Oba tematy są omówione na poziomie rozszerzonym, ale nie wyczerpująco, tak by wprowadzić czytelnika w zagadnienia dotyczące badań. W drugim przypadku kompetencje Doktorantki nie budzą wątpliwości, ale fragmenty dotyczące aktywności biologicznych ekstraktów roślinnych lub poszczególnych polifenoli nie są mocną stroną pracy. Brak ugruntowanej wiedzy z zakresu podstaw molekularnych działania chemoprewencyjnego przeciwutleniaczy niestety zbyt często prowadzi do błędnych sformułowań, dość przypadkowego doboru literatury i nieostrożnych stwierdzeń. Z obowiązku recenzenta przytoczę kilka szczególnie wątpliwych przykładów. Przy omawianiu aktywności przeciwrakotwórczych (w tym przypadku mamy do czynienia z prewencją, a nie leczeniem, więc "zwalczanie nowotworów" jest określeniem raczej nieuprawnionym) wykazywanych przez jagody Doktorantka wspomina na stronie 20:

- o indukowaniu enzymów metabolizujących, ale takich enzymów jest dziesiątki i tylko nieliczne mają znaczenie prewencyjne,
- o zmianie ekspresji genów, co wcale nie musi być korzystne jeśli nie oznacza stymulacji ekspresji genów ochronnych i hamowania ekspresji genów promujących rozrost nowotworowy,
- o właściwościach antymutagennych, które nie powinny być utożsamiane z przeciwutleniającymi, bo tak być nie musi,
- a już na pewno mutacje nie są wynikiem aktywności metaloproteinaz.

Na stronie 21 z kolei pojawia się sugestia, że ekstrakty z jagody dzięki zawartości substancji przeciwutleniających obniżają poziom azotu mocznika i kreatyniny we krwi, co jest dość nieoczywistym wnioskiem. Podobnie jak to, że wspomniane dwa naturalne metabolity są szkodliwymi substancjami, podczas gdy są one po prostu wykorzystywane w diagnostyce medycznej jako biomarkery wydolności nerek.

Przy omawianiu aktywności biologicznej borówek, na stronie 31 pojawia się zdanie "Ponadto polifenole inhibują utlenianie frakcji LDL, obniżając tym samym zbyt wysoki poziom cholesterolu", podczas gdy ograniczenie reakcji utleniania obniża zawartość nie cholesterolu, ale utlenionej formy lipoproteiny LDL zwiększającej zagrożenie miażdżycą. Również zbyt dużym błędem jest stwierdzenie dotyczące apigeniny (str. 44) sugerujące, że związek ten "inhibuje deacetylację histonów, które biorą udział w powstawaniu chorób neurodegeneracyjnych". Histony wchodzi w skład chromatyny, a ich acetylacja/deacetylacja reguluje aktywność transkrypcyjną chromatyny i to specyficzne zaburzenie tej regulacji może mieć negatywne skutki. Te wszystkie biologiczne efekty na pewno były sprecyzowane w cytowanych publikacjach, a podstawowe mechanizmy są opisane np. w Wikipedii, po prostu Doktorantka nie wykazała się w tych przypadkach wystarczającą dociekliwością. Poświęcam tej sprawie tyle miejsca, choć nie jest to główny przedmiot dysertacji, ponieważ w przypadku żywności prozdrowotnej, która wzbudza ogromne oczekiwania wśród konsumentów, naukowcy muszą być bardzo uważni i pilnować by nie być źródłem błędnych informacji.

Kolejny rozdział poświęcony jest omówieniu pozyskania i przygotowania materiału roślinnego do badań, stosowanych odczynników i procedur eksperymentalnych. Ten rozdział jest bardzo szczegółowo napisany, bez trudności można by było powtórzyć przeprowadzone pomiary lub wykorzystać opisy metod do analizy frakcji polifenoli lub oceny aktywności przeciwutleniającej innych ekstraktów roślinnych. Opisy metod zawierają wszystkie szczegóły ważne dla powtórzenia oznaczeń przez inną osobę, a załączone proste wzorcowe imponują precyzją wykonania. Jak zwykle ten rodzaj pośrednio dostarcza informacji o zakresie wykonanych oznaczeń, ich rzetelności i kompetencjach Doktoranta. W moim przypadku, jeszcze przed przystąpieniem do zapoznania się z częścią wynikową pracy, Doktorantka już na tej podstawie zapewniła sobie bardzo duży kredyt zaufania. Mam tu tylko dwie małe uwagi. W rozdziale 5.6 opisującym oznaczanie zawartości antocyjanów używany

jest m.in. odczynnik 1 M KCl/HCl, błędnie nazwany buforem. Jest to po prostu roztwór 1 M KCl miareczkowany 1 M HCl do pH=1, który nie ma właściwości buforowych, ponieważ zawiera sól silnego kwasu i silnej zasady. Ponadto może jeszcze przydałoby się w tej części dysertacji krótkie omówienie statystycznej analizy wyników.

Rozdziały rozprawy poświęcone omówieniu wyników i ich dyskusji (6-8. Wyniki i Dyskusja) podzielone są na poszczególne typy materiału roślinnego: wrzos zwyczajny (rozdział 6), borówki (rozdział 7) i kory drzew (rozdział 8). Wszystkie te rozdziały są bardzo starannie napisane, zebrane w tabelach i zilustrowane na wykresach wyniki z łatwością można prześledzić. Staranność Doktorantki jest tu najwyższej próby. Jako pierwsze omawiane są ekstrakty z kwiatów wrzosu. Zaskoczył mnie ich skład, to jak kawa z herbatą wzięwszy pod uwagę wysoką zawartość kwasów fenolowych i katechin. W pracy sugerowane jest nawet spożywanie takich naparów i pojawia się pytanie czy wrzos nie zawiera przy tym substancji toksycznych, bo zwykle wszystko co nadaje się do spożycia znalazło miejsce w tradycji kulinarnej, a wrzos wykorzystywany jest raczej medycznie. Mam też dwa pytania do ekstrakcji cieczami jonowymi. Ich efektywność w przypadku niektórych substancji jest fantastyczna, co ilustrują przekonywująco wykresy zawarte m.in. na Rys. 32. Tym niemniej, jak to pokazuje m.in. Rys. 33 w przypadku całkowitej zawartości flawonoidów i właściwości redukujących wygrywa często 60% etanol w wodzie. Które z flawonoidów zadecydowały o takim wyniku? Doktorantka także nie wspomina czy ekstrakcja cieczami jonowymi ma zastosowanie tylko analityczne, czy może mogłaby być bezpiecznie stosowana także do wyodrębniania bioaktywnych fitozwiązków z matrycy roślinnej na potrzeby przemysłu spożywczego lub farmaceutycznego?

Kolejnymi badanymi próbkami były jagody (borówka czernica), borówki (borówka brusznica) i jagoda amerykańska (borówka wysoka) dla porównania owoców dziko rosnących z owocami uprawianymi. Wykonane oznaczenia potwierdziły, że owoce te, szczególnie dziko rosnące, są bogatym źródłem antocyjanów (szczególnie borówka czernica) i minerałów. Obserwowane różnice jakościowe wynikają z genotypów tych roślin, natomiast różnice ilościowe są pochodną czynników środowiskowych. Skład gleby będzie decydował o zawartości minerałów, a nasłonecznienie czy obecność patogenów o biosyntezie bioaktywnych fitozwiązków. Nie należy zatem zbyt mocno się przywiązywać do oznaczanych zawartości, ponieważ są to dane na "tu i teraz", oczywiście dla porządku wypada się odnieść do oznaczeń innych badaczy, ale różnice i to nawet bardzo znaczące nie powinny być zaskoczeniem. W ostatnim zdaniu na str. 110, Doktorantka pisze, że owoce borówek nie są bogatym źródłem polifenoli, bo mało jest w nich flawonoidów. Z tym stwierdzeniem nie sposób się zgodzić, polifenolami są także antocyjany i kwasy fenolowe, stąd też w podpisie do Rys. 37 powinno być zaznaczone, że zawiera on dane dla wybranych polifenoli. Zabrakło mi w przypadku tych owoców uwagi jak na zawartość polifenoli, w szczególności antocyjanów, wpływa proces suszenia. Sądzę, że zebrane przez Doktorantkę wyniki pozwalają takie dane oszacować

i ocenić straty. Jeżeli byłyby one duże to sugerowałyby konieczność poszukiwania bardziej zachowawczych metod suszenia.

Ostatnia grupa badanych próbek roślinnych to kory dębu i sosny, materiał roślinny rzadko kojarzony jako surowiec w przemyśle żywnościowym, jak Doktorantka wykazała niekoniecznie słusznie. Te produkty uboczne użytkowania lasów być może mogłyby się stać źródłem mikroelementów i polifenoli, którymi można by wzbogacać prozdrowotną żywność.

Przedstawiona praca jest bardzo starannie przygotowana pod względem redakcyjnym. Usterki językowe są jednak przy tak dużych opracowaniach nieuniknione. Ze względu na wieloletnie doświadczenie edytorskie trudno mi ich nie zauważyć, a także z obowiązku recenzenta muszę je przytoczyć. Ponieważ nie wszystkie są równie istotne pozwolę sobie podzielić je kategorie, aby w przyszłości Doktorantka mogła łatwiej unikać podobnych potknięć:

- *usterki w nazewnictwie:*

- str. 16 linia 7 od dołu: jest α - amaryna, β - amaryna powinno być α -amaryna, β -amaryna;
- str. 16 linia 1 od dołu, str. 17 linia 2 od góry: jest 400 mg/100g powinno być 400 mg/100 g; str. 23 linia 8/9 od dołu: jest 63-235 mg/100 powinno być 63-235 mg/100 g; zawartość podawana w takich jednostkach pojawia się często i w większości przypadków zapis jest prawidłowy;
- str. 19 linia 3 od góry: jest małe związki powinno być związki niskocząsteczkowe;
- str. 21 linia 3 od dołu: jest trójglicerydy powinno być triacyloglicerole;
- rozdział 2, brakuje Doktorantce trochę konsekwencji w nazewnictwie jagód; raz przychyła się do Polski północnej nazywając czarną jagodę jagodą, a raz do południa Polski nazywając jagodę borówką;
- str. 30 linie 8/10 od góry i inne miejsca: jest proantocyjanidynów powinno być proantocyjanidyn; str. 37 linia 10 od góry i inne miejsca jest prodelfinidynów powinno być prodelfinidyn; nazwy tych złożonych związków polifenolowych są rodzaju żeńskiego w przeciwieństwie do antocyjanów;
- str. 103 ostatnie zdanie, podpis pod Rys. 34 i inne miejsca: jest ...najwyższe efektywności uzyskano..., ...Efektywność ekstrakcji... powinno być ...najwyższe wydajności uzyskano..., ...Wydajność ekstrakcji...;

- *usterki stylistyczne:*

- str. 13, linia 8 od dołu: jest ...wrzos redukuje stres oksydacyjny...; linia 6 od dołu: jest ...znacząco zredukowały poziom cytokin...; str. 30 linia 6 od dołu ...zredukowanie objawów choroby...; podobne sformułowania z użyciem czasownika zredukować pojawiają się w pracy bardzo często i we wszystkich tych przypadkach lepsze by były zwroty typu “zmniejszyła zawartość, obniżał poziom, przeciwdziała stresowi oksydacyjnemu”, itd. Jest to szczególnie warte polecenia gdy opis dotyczy związków uczestniczących w reakcjach utleniania-redukcji takich jak przeciwutleniacze, bo tu określenie “redukcja” powinno być zarezerwowane do opisu zjawisk chemicznych;
- str. 13 linia 13 od góry: jest ...ekstrakty z wrzosu inhibują monoaminooksydazy...; str. 26 linia 10 od góry: jest ...ekstrakty te inhibują działanie enzymu... i inne miejsca; czasownik “inhibitować” wyjątkowo niezręczny w języku polskim niestety coraz częściej jest spotykany w polskojęzycznej literaturze naukowej wypierając

czasownik “hamować”; sugerowałabym jednak używanie zwrotu “ekstrakty z wrzosu hamują (aktywność/działanie) enzymu” itp.;

- str. 30, 31 i inne, Doktorantka używa określenia ...związki wykazują działanie w kierunku bakterii lub komórek..., przyjęło się stosować raczej sformułowania typu: związki wykazują działanie wobec bakterii lub w stosunku do komórek;
- w całej pracy stosowane są wymiennie jako synonimy antyutleniający-przeciwutleniający, antyutleniacze-antyoksydanty-przeciwutleniacze, antynowotworowy-przeciwnowotworowy; w dyskusjach z profesorem Zdzisławem Sikorskim, bardzo doświadczonym redaktorem m.in. podręczników chemii żywności, doszliśmy do przyjęcia zasady, że budując złożone słowa łączymy “polskie z polskim” a “obcojęzyczne z obcojęzycznym”, czyli:

przeciwutleniacze ale antyoksydanty
przeciwnowotworowy a nie antynowotworowy
przeciwcukrzycowe ale antydiabetyczne
przeciwrakotwórczy ale antykancerogeny raczej niż antykarcynogeny
przeciwnowotworowy ale antyseptyczny
przeciwdrobnoustrojowy ale raczej antywirusowy

itp., zachęcamy do przyjęcia tej konwencji;

- błędy interpunkcyjne i drobne usterki językowe:

- str. 28 linia 10/11 od góry; str. 29 linia 2/3 od dołu: brakuje spacji przed i po myślniku przy podawaniu zawartości wymienianych składników;
- str. 38 linia 9 od dołu: jest ...uznawany jako czynnik... powinno być ...uznawany za czynnik...
- str. 73 linia 6 od dołu: jest Folina - Ciocalteu powinno być Folina-Ciocalteu, w pozostałych miejscach nazwa testu jest zapisana poprawnie, ale tym razem Word przechytrzył Doktorantkę;
- str 102 linia 17 od dołu: jest ...jest bardziej mobilny w łyku i ksylem... powinno być ...jest bardziej mobilny w łyku i ksylemie...;
- str 102 linia 11 od dołu: jest ...są zbliżone z wynikami... powinno być ...są zbliżone do wyników lub porównywalne z wynikami...;
- podpis pod Rys. 40 wymknął się trochę spod kontroli edytorskiej.

Podsumowując, recenzowana praca zarówno pod względem koncepcji, wykorzystanego warsztatu badawczego, uzyskanych wyników dostarcza może nie tyle całkiem nowych, co pogłębionych, rzetelnych informacji na temat składu i zawartości substancji prozdrowotnych w dostępnych surowcach leśnych, które obecnie są wykorzystywane w bardzo nieefektywny, tradycyjny sposób, a w świetle nowej wiedzy mogłyby stanowić źródło substancji znacząco podnoszących jakość zdrowotną żywności lub suplementów diety, może także preparatów zielarskich i farmaceutycznych. Wprawdzie po omówieniu wyników oznaczeń dla każdej grupy próbek roślinnych, Doktorantka podsumowuje wykonane badania, ale jest to podsumowanie czysto “analityczne” i nieco jestem rozczarowana brakiem takiej uogólnionej dyskusji, nawiązującej do Wprowadzenia otwierającego dysertację. Nie pokusiła się Doktorantka o refleksję co mogą wnieść jej badania do lepszego wykorzystania zasobów leśnych, jakie mogą nieść korzyści społeczne

oraz ekonomiczne i dlatego warto w związku z tym było je prowadzić. Nie należy się bać spojrzenia z takiej perspektywy na swoje dokonania.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa pt. “Badanie możliwości wykorzystania produktów ubocznego użytkowania lasu jako źródła antyutleniaczy” spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym i przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego wnioszek o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Drózdź do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, doceniając zakres i analityczną wartość pracy, wysoką jakość oznaczeń oraz fakt, że obiektem był stosunkowo mało zbadany materiał roślinny, który dzięki uzyskanej wiedzy jest być może bliższy racjonalnego wykorzystania, a także wzięwszy pod uwagę dorobek publikacyjny i popularyzatorski Doktorantki wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Drózdź.

Gdańsk, 9 maja 2018

A. Barchel