Prof. dr hab. Beata Szymczyk
Dział Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa
Instytut Zootechniki, Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Matusiewicz pt. „Wpływ transgenicznego lnu o wzmocnionej syntezie polifenoli na metaboliczne skutki diety wysokotłuszczowej

Nieodpowiednie żywienie, nie uwzględniające współczesnych zaleceń żywieniowych może prowadzić do powstawania szeregu chorób cywilizacyjnych, zwłaszcza schorzeń układu krążenia, otyłości czy chorób nowotworowych. Problemy zdrowotne, wynikające z błędów żywieniowych można ograniczyć uzupełniając dietę o substancje biologicznie aktywne, wykazujące działanie prozdrowotne. Do substancji tych należą m.in. naturalne polifenolowe antyoksydanty, pełniące szereg funkcji biologicznych w organizmie. Związki polifenolowe mogą neutralizować reaktywne formy tlenu i azotu oraz chronić organizm przed negatywnymi zmianami wywołanymi przez stres oksydacyjny. Wykazują działanie neuroprotekcyjne, hipolipidemiczne, przeciwnowotworowe oraz przeciwzapalne.

Naturalnym źródłem antyoksydantów w żywności mogą być nasiona modyfikowanego genetycznie lnu, w którym przy zastosowaniu metod inżynierii genetycznej zwiększono syntezę związków polifenolowych takich jak: flawonoidy, kwasy fenolowe, lignany oraz ich glukozydy. Zwiększona została również pojemność antyoksydacyjna nasion oraz akumulacja wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Jednakże wykorzystanie nasion lnu jako składnika diety może ograniczać obecność substancji antyodżywczych, takich jak glikozydy cyjanogenne, ulegające przekształceniu w cyjanowodór w przewodzie pokarmowym zwierząt, czy flawonoidy, które również mogą działać szkodliwie na organizm. W wytłokach z nasion lnu - produkcie ubocznym z tłoczenia oleju na zimno, zawartość glikozydów cyjanogennych jest nadal wysoka, a w wyniku obłuszczenia nasion ich koncentracja jeszcze wzrasta. Dlatego warunkiem włączenia wytłoków z nasion lnu do diety jako składnika funkcjonalnego wymaga kompleksowej oceny wpływu substancji obecnych w wytłokach, zarówno tych pożądanych, jak i szkodliwych, na metaboliczne funkcje organizmu. W tym kontekście badania podjęte przez mgr inż. Magdalenę Matusiewicz, uważam za w pełni uzasadnione i interesujące zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera omówienie badań, składające się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, hipotez badawczych i celu badań oraz opisu zastosowanych metod. W kolejnej części Autorka przedstawia uzyskane wyniki i konfrontuje je z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów zarówno krajowych jak i zagranicznych. Opracowanie kończy syntetyczne podsumowanie wyników i wnioski oraz wykaz omawianej literatury przedmiotu, obejmującej 141 pozycji piśmiennictwa. Podstawę rozprawy i integralną jej część stanowią 3 publikacje w języku angielskim, w których zamieszczono dokładny opis zastosowanych metod badawczych i otrzymanych wyników. Prace zostały opublikowane w latach 2014-2015, dwie w International Journal of Molecular Sciences (IF=2,339) i jedna w Journal of Functional Foods (IF=4.480):

1. Matusiewicz, M., Kosieradzka, I., Zuk, M., Szopa, J. (2014). Genetically modified flax expressing NAP-SsGT1 transgene: examination of anti-inflammatory action. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(9), 16741-16759. (Liczba pkt. MNiSW=30, IF=2.339)

2. Matusiewicz, M., Kosieradzka, I., Sobczak-Filipiak, M., Zuk, M., Szopa, J. (2015a). Transgenic flax overexpressing polyphenols as a potential anti-inflammatory dietary agent. *Journal of Functional Foods*, *14*, 299-307. (Liczba pkt. MNiSW=45, IF=4.480)

3. Matusiewicz, M., Kosieradzka, I., Zuk, M., Szopa, J. (2015b). Effect of dose and administration period of seed cake of genetically modified and non-modified flax on selected antioxidative activities in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(6), 14259-14275. (Liczba pkt. MNiSW=30, IF=2.862)

Sumaryczna wartość IF - 9.681

Do wszystkich publikacji dołączono oświadczenia współautorów o ich udziale w wymienionych pracach. Z oświadczeń wynika, że wkład autorski mgr Magdaleny Matusiewicz w przygotowanie i wykonanie badań wynosił 60% w pracy nr 1, 52% w pracy nr 2 i 51% w pracy nr 3. Wiodący udział Doktorantki w zakresie opracowania metodyki badawczej, prowadzenia doświadczeń i przygotowania wyników do publikacji pozwala na stwierdzenie, że spełnione zostały wszelkie warunki formalne, pozwalające na wykorzystanie tych prac do rozprawy doktorskiej.

Wspomniane oryginalne prace naukowe stanowią spójny tematycznie cykl studiów dotyczących:

1. Wpływu zróżnicowanego udziału wytłoków z nasion zmodyfikowanego genetycznie lnu w dietach i czasu ich podawania na strawność składników pokarmowych, wskaźniki wzrostowe, wartość wskaźników hematologicznych i biochemicznych oraz status antyoksydacyjny krwi, oksydacyjne uszkodzenia lipidów i DNA wątroby oraz ultrastrukturę jelita cienkiego szczurów (Eksperyment 1).

2. Wpływu długotrwałego żywienia szczurów dietą wysokotłuszczowej z wysokim udziałem wytłoków nasion transgenicznego lnu W92 na zaburzenia wzrostu, zmiany homeostazy redoks, koncentracji glukozy i insuliny, profil lipidowy, stan zapalny i zmiany ultrastruktury wątroby (Eksperyment 2)

3. Wpływu długotrwałego żywienia myszy dietą wysokotłuszczową z wysokim udziałem wytłoków nasion transgenicznego lnu GT na wskaźniki wzrostowe, status redoks, profil lipidowy surowicy krwi, wskaźniki stanu zapalnego wątroby oraz strukturę i ultrasktrukturę wątroby (Eksperyment 3).

Ponieważ przedstawione publikacje ukazały się w renomowanych czasopismach, tak więc ich wartość merytoryczna nie podlega dyskusji, ograniczę się więc do omówienia części opracowania, podsumowującego przeprowadzone badania.

Streszczenia, poza drobnymi uwagami redakcyjnymi (np. nadużywanie przez Autorkę słowa suplementacja) nie budzą zastrzeżeń i stanowią wartościową część ocenianej pracy. Obejmują cały zakres badań i uzyskanych wyników.

W rozdziale ***Wstęp*** Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę badań, podkreślając istotne znaczenie w żywieniu człowieka produktów wzbogaconych w aktywne biologicznie substancje o działaniu prozdrowotnym. Wskazuje na ważną rolę biofortyfikacji roślin uprawnych, czyli zwiększanie w nich zawartości substancji aktywnych, poprzez selektywną hodowlę konwencjonalną lub przy zastosowaniu metod inżynierii genetycznej. Na tle dobrze dobranych danych literaturowych Doktorantka przedstawia charakterystykę nasion lnu pod kątem zawartości substancji o działaniu prozdrowotnym, podkreślając ważną rolę polifenoli w profilaktyce chorób wynikających z nieprawidłowej diety oraz substancji o działaniu antyodżywczym, mogących ograniczać wykorzystanie lnu w żywieniu ludzi i zwierząt. Wiele uwagi Autorka poświęca metodom poprawy walorów dietetycznych i wartości sensorycznej roślin na drodze modyfikacji genetycznych, których efektem jest m.in. nadekspresja naturalnych antyoksydantów w lnie.

Hipotezy badawcze i cel pracy przedstawione w sposób jasny i rzeczowy, zapoznają czytelnika z głównymi założeniami podjętych badań. W punkcie drugim celu należałoby jedynie zaznaczyć, że w doświadczeniu na szczurach (Eksperyment 2) badano nasiona transgenicznego lnu W92, natomiast w doświadczeniu na myszach (Eksperyment 3) - lnu – GT.

Wykonane doświadczenia nie budzą metodycznych zastrzeżeń. Dobór ocenianych wskaźników jest trafny i w pełni uzasadniony. Przyjęte metody i techniki badawcze są nowoczesne, mieszczące się w wysokich standardach badań naukowych.

Wyniki i ich ***Dyskusję*** przedstawiono w sposób uporządkowany, zachowując logiczną i merytoryczną ciągłość omawianych problemów. Nie było to łatwe zadanie, przy tak dużej ilości badanych wskaźników i ich wzajemnej zależności.

W podsumowaniu badań Doktorantka w sposób syntetyczny przedstawiła wyniki uzyskane w poszczególnych doświadczeniach. Moim zdaniem stwierdzenie „...wytłoki transgenicznego lnu korzystnie modyfikują profil lipidowy surowicy krwi", czy też „korzystnie wpływają na zawartość globulin, a niekorzystnie na poziom frakcji albumin" wymaga uściślenia, na czym ten wpływ polegał.

W cyklu przedstawionych prac Autorka wykazała, że:

-długotrwałe żywienie szczurów dietą zawierającą 30% wytłoków z tradycyjnego (*Linola*) lub transgenicznego lnu W92 o zwiększonej syntezie polifenoli nie wpływa negatywnie na stan zdrowia zwierząt.

-dodatek do diety dla szczurów i myszy transgenicznego lnu, bogatego w polifenole, zmniejsza negatywne skutki diety wysokotłuszczowej, poprzez obniżenie poziomu glukozy i insuliny oraz korzystną modyfikację profilu lipidowego w surowicy krwi – podwyższenie

poziomu frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL) i obniżenie poziomu triacylgliceroli. Wpływa również na stabilizację homeostazy procesów redoks w surowicy krwi i w wątrobie oraz hamuje rozwój stanu zapalnego wątroby.

-korzystne działanie dodatku transgenicznego lnu do diety wynika ze zmian koncentracji związków biologicznie aktywnych, komplementarnych i synergistycznych właściwości polifenoli, których zwiększona synteza była celem modyfikacji oraz obecności związków o działaniu prozdrowotnym, nieobjętych bezpośrednio modyfikacją.

-wzbogacenie diety w wytłoki transgenicznego lnu GT i W92 może stanowić element profilaktyki zdrowotnej i terapii schorzeń wynikających z nieprawidłowego żywienia ludzi i zwierząt.

Z obowiązku recenzenta pragnę przedstawić kilka uwag i wątpliwości, prosząc Doktorantkę o stosowne wyjaśnienia:

- Jakimi względami podyktowany był wybór odmiany lnu *Linola* jako wyjściowej dla transgenicznych linii W92 i GT? Olej z nasion tej odmiany jest bardziej oporny na utlenianie, w porównaniu z tradycyjnym olejem wysokolinolenowym, więc raczej ten ostatni, jako mniej trwały, wymagałby wzbogacenia w związki przeciwutleniające.

- W prezentowanych pracach nie podano profilu kwasów tłuszczowych tłuszczu w wytłokach nasion transgenicznego i tradycyjnego lnu oraz dodawanego do diet oleju lnianego. Czy był to olej z nasion lnu odmiany *Linola*? Co prawda nie stanowiło to przedmiotu ocenianej pracy, ale dane te mogłyby być pomocne przy interpretacji niektórych rezultatów.

- Brak jest informacji o wysokości dodatku smalcu wieprzowego do diet stosowanych w Eksperymencie 3. Przypuszczam, że szczegółowy skład diet nie został ujawniony przez ich producenta?

- Dodatkowych wyjaśnień wymaga zawartość tłuszczu w dietach wysokotłuszczowych dla szczurów i myszy – dlaczego przyjęto takie, a nie inne poziomy?

- W Eksperymencie 1 szczury żywiono dietą zawierającą 12,0 % białka. Czy poziom ten nie był zbyt niski dla rosnących zwierząt?

- Ułatwieniem dla czytającego byłoby uwzględnienie w oznaczeniu grup w Eksperymencie 1 (Doświadczenie 1 i 2) wielkości dodatku wytłoków lnianych do diet – w obu doświadczeniach grupy oznaczone są jednakowo.

Zamieszczone uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, którą oceniam wysoko. Przedłożona do oceny rozprawa mgr inż. Magdaleny Matusiewicz jest wartościowym opracowaniem naukowym o charakterze nowatorskim i stanowi ważne uzupełnienie badań z zakresu podjętej tematyki z pogranicza nauk o żywieniu zwierząt i ludzi. Autorka uzyskała cenne rezultaty, rzucające nowe światło na możliwość zastosowania wytłoków z transgenicznego lnu o zwiększonej zawartości polifenoli, jako składnika funkcjonalnego żywności, mogącej stanowić element profilaktyki zdrowotnej i terapii schorzeń metabolicznych u ludzi i zwierząt. Doktorantka wykazała się dużą znajomością nowoczesnych metod i procedur badawczych oraz rzetelnością w realizacji badań, co świadczy o dobrym przygotowaniu do pracy naukowej.

Reasumując stwierdzam, że oceniana rozprawa spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65 z 2003 r., poz. 595, ze zm. W Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365 oraz Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz 455). W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, wniosek o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Matusiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 10.02.2016 r.

B. Szymczyk

Prof. dr hab. Beata Szymczyk