UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w Lublinie
WYDZIAŁ BIOLOGII I HODOWLI ZWIERZĄT
INSTYTUT ŻYWIENIA ZWIERZĄT I BROMATOLOGII

Lublin, 11.02.2016

Dr hab. Renata Klebaniuk, *prof. nadzw. UP*
Instytut Żywienia Zwierząt i Bromatologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzja

pracy doktorskiej pt.: **Wpływ transgenicznego lnu o wzmocnionej syntezie polifenoli na metaboliczne skutki diety wysokotłuszczowej** *(The influence of transgenic flax with enhanced polyphenol synthesis on metabolic effects of high-fat diet)* wykonanej przez Panią mgr inż. Magdalenę Matusiewicz w Katedrze Żywienia i Biotechnologii Zwierząt Wydziału Nauk o Zwierzętach, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Len (*Linum usitatissimum*) to popularna roślina, której nasiona odmian oleistych są od lat uznawane za paszę, ale przede wszystkim składnik żywności o wysokiej wartości odżywczej i dietetycznej. Są źródłem białka (ok. 18-24%), węglowodanów (27-30%), ale przede wszystkim tłuszczu (ok. 35-45%), a zwłaszcza niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) należących do rodziny n-3 (kwas α-linolenowy – α-LNA, C18:3) oraz n-6 (kwas linolowy – LA, C18:2). Kwasy te w tkankach organizmu ssaków nie są syntezowane i muszą być dostarczane wraz z pokarmem. Za wysoką wartość dietetyczną nasion lnu odpowiada także znaczący udział rozpuszczalnych frakcji włókna oraz obecność wielu substancji biologicznie czynnych (lignany, kwasy fenolowe, flawonoidy i inne polifenole).

W diecie, polifenole chronią przed negatywnymi zmianami wywoływanymi przez stres oksydacyjny czy też zaburzeniami metabolizmu, których efektem mogą być choroby sercowo-naczyniowe. Mogą także hamować wzrost tkanki tłuszczowej, przeciwdziałać infekcjom, nowotworom, procesom neurodegeneracyjnym i autoimmunologicznym. Flawonoidy i kwasy fenolowe, związki należące do polifenoli, wykazują również aktywność antyoksydacyjną, hipolipidemiczną i antyzapalną. Determinującym wartość dietetyczną roślin flawonoidem jest kwercetyna. W żywności występuje w różnych formach o różnej biodostępności, stąd też zwiększenie jej stężenia w osoczu, wpływającego korzystnie na funkcje organizmu konsumenta, wymaga ciągłej suplementacji.

Ograniczenie problemów zdrowotnych wynikających z błędów żywieniowych jest możliwe dzięki wzbogaceniu diety nie tylko o właściwie zbilansowane składniki pokarmowe, ale także substancje bioaktywne o działaniu prozdrowotnym. Obecnie takie wzbogacanie jest powszechnie stosowane w produkcji przetworzonej żywności, stanowiąc duży segment rynku żywności funkcjonalnej. Aby ograniczyć stosowanie

syntetycznych dodatków do przetwarzanych produktów żywnościowych wykorzystuje się rośliny uprawne bogatsze w składniki odżywcze dzięki stosowaniu odpowiednich metod agrotechnicznych, technik hodowlanych lub metod inżynierii genetycznej, prowadzących do zainicjowania syntezy i zwiększenia akumulacji związków istotnych pod względem żywieniowym i/lub ograniczających ilość substancji antyodżywczych.

Genetyczna modyfikacja lnu, prowadząca do optymalizacji wartości dietetycznej nasion roślin transgenicznych wydaje się być jedną z bardziej efektywnych metod, bowiem w wyniku transgenezy uzyskano przede wszystkim wzrost pojemności antyoksydacyjnej nasion lnu i akumulację nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Zdecydowana większość plonów roślin transgenicznych wykorzystywana jest na paszę i żywność. Obecnie rośliny o zmienionej wartości odżywczej, zmienionym składzie, druga generacja roślin transgenicznych, to stosunkowo niewielki odsetek upraw, mimo to wydaje się, że właśnie takie rośliny transgeniczne mogą być wartościowym komponentem diety. Zagadnienie wymaga jednak w dalszym ciągu szerokich, szczegółowych badań. Na tym tle przedłożona do oceny dysertacja doktorska pt.: **Wpływ transgenicznego lnu o wzmocnionej syntezie polifenoli na metaboliczne skutki diety wysokotłuszczowej**, jest w pełni uzasadniona i celowa.

Podstawę przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej stanowi zestaw opublikowanych w latach 2014-2015 trzech prac twórczych:

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)*

stanowiących zwarty blok tematyczny. Prace zamieszczono w wydawnictwach znajdujących się w części A wykazu czasopism naukowych Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z grudnia 2014 r., natomiast IF – Impact Factor (Współczynnik Wpływu) według Journal Citation Reports (Thomson Reuters) z czerwca 2014 r. lub 2015 r. (zgodnie z rokiem publikacji). Sumaryczna liczba punktów wg Listy czasopism punktowanych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego za publikacje wchodzące w skład rozprawy wyniosła łącznie 105. IF równał się 9,681. We wszystkich pracach, będących podstawą ocenianej dysertacji, Doktorantka jest pierwszym współautorem, a zgodnie z deklaracjami pozostałych współautorów, wkład własny mgr Matusiewicz w opracowanie tych publikacji stanowi 54,3 %, odpowiednio: 60, 52 i 51 %

w poszczególnych pracach. Daje to Doktorantce 57 punktów MNiSzW i IF = 5,193. Należy podkreślić, że w omawianych - oryginalnych pracach twórczych - Doktorantka ma główny udział w realizacji badań, analizie i opracowaniu wyników. Natomiast obecność współautorów w tych publikacjach (od 3 do 4) jest w pełni uzasadniona i niezbędna. Świadczy o złożoności i kompleksowości realizowanych badań, jak również o kompetencjach (umiejętność pracy w zespole, organizacja ciągłości prac procesu badawczego) samej Doktorantki.

Przedstawiona do recenzji praca napisana jest zgodnie z wymogami stawianymi tego rodzaju pracom doktorskim. W ramach rozdziałów wyszczególniono podrozdziały, co czyni pracę czytelną. Napisana jest językiem poprawnym i zrozumiałym. **Spis treści** i **spis skrótów** - pomocne dla czytelnika, dodatkowo zwiększają przejrzystość i czytelność pracy. Zasadniczą część pracy poprzedzają **streszczenia:** w języku polskim i angielskim oraz **oświadczenia**: Promotora i Autora pracy.

Praca jest zwarta, a poszczególne jej rozdziały (wstęp, hipotezy badawcze, cel i zakres badań, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz bibliografia) tworzą logiczną i spójną sekwencję. Dysertacja zawiera część opisową (67 stron) oraz pełne publikacje będące podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej, a także oświadczenia wszystkich współautorów publikacji, dotyczące udziału w ich realizacji.

Wstęp będący w znacznym stopniu przeglądem piśmiennictwa stanowi szerokie wprowadzenie w problematykę badawczą całej dysertacji. Autorka stopniowo zgłębia zagadnienia dotyczące podjętego tematu badawczego: z jednej strony przybliża podstawowe informacje dotyczące prozdrowotnych właściwości nasion lnu oleistego, z drugiej szczegółowo i z dużą precyzją (co świadczy o głębokiej znajomości poruszanego tematu) analizuje wiedzę i osiągnięcia inżynierii genetycznej w zakresie poprawy właściwości odżywczych, dietetycznych i prozdrowotnych nasion lnu. Podczas czytania tej części pracy nasuwa się pytanie:

1. Czy wszystkie zwierzęta (ssaki, ewentualnie ptaki) są w jednakowym stopniu podatne na antyodżywcze działanie linamaryny i/lub związków pokrewnych?

2. Na stronie 20 Autorka podaje: *„....Flawonoidy są uznawane za substancje chemiczne o niewielkiej toksyczności, jednak w literaturze można spotkać wyniki badań wykazujących negatywne skutki ich oddziaływania....".* Kiedy? Jakie?

W kolejnym rozdziale Autorka zamieszcza właściwie sformułowane **hipotezy badawcze** oraz **cel badań**, prawidłowo odniesione do podjętego zakresu tematycznego i odpowiednio uzasadnione w aspekcie naukowym i aplikacyjnym. W rezultacie ta część opracowania pozwala na właściwą orientację w omawianej problematyce, a jednocześnie świadczy o właściwym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki do prowadzenia tego typu badań. Pojawiają się jednak nie w pełni jasne określenia o których wyjaśnienie proszę. Np. str. 21: *„....Długotrwałe podawanie mieszanek*

zawierających stosunkowo duży dodatek wytłoków lnu...." Stosunkowo duży? W stosunku do czego? Stosunkowo duży, tzn. ile?

Całość badań przedstawionych w dysertacji złożona jest z dwóch części.

Celem pierwszej było określenie czy długotrwałe podawanie znacznej ilości wytłoków transgenicznego i nietransgenicznego lnu w diecie może wpłynąć na zdrowie. Dotyczyła sprawdzenia czy efekt działania substancji antyodżywczych zawartych w lnie, zwłaszcza linamaryny, może przewyższyć działanie zawartych w nim prozdrowotnych substancji biologicznie czynnych (polifenolowych antyoksydantów).

Celem drugiej części była ocena wpływu podawania wytłoków nasion transgenicznego lnu W92 i GT, o wzmocnionej syntezie polifenoli, na zakłócenia metabolizmu wywołane przez żywienie szczurów - modeli otyłości oraz myszy dietą wysokotłuszczową. Część ta dotyczyła weryfikacji hipotez, zgodnie z którymi podawanie diety wysokotłuszczowej zwierzętom może prowadzić do zmian metabolicznych, których następstwem mogą być zaburzenia procesów redoks oraz rozwój stanu zapalnego, natomiast uzupełnienie diety o transgeniczny len o zwiększonej syntezie polifenoli może przeciwdziałać rozwojowi niekorzystnych zmian.

Przyjęta **metodyka badań** zaprezentowana w kolejnym rozdziale jest w aspekcie przyjętego celu w pełni zasadna merytorycznie. *W rozdziale tym, opisując szczegółowo stosowane metody, Autorka cytuje pozycje piśmiennictwa, ale podaje w wykazie piśmiennictwa wszystkie, za wyjątkiem trzech prac stanowiących dysertację doktorską. Dlaczego? Zastanawia też fakt korzystania (jak podaje Autorka) z procedur AOAC z 1999, a nawet 1996 roku (w jednej z publikacji wchodzących w skład dysertacji), podczas gdy całość prezentowanych badań jest elementem jednej z młodszych nauk, badań zrealizowanych w ostatnich latach i wręcz niemożliwe wydaje się nieskorzystanie z aktualnych procedur (2007, 2011).*

Bardzo ważnymi rozdziałami każdej pracy naukowej, w tym dysertacji doktorskiej jest rozdział **Wyniki,** a zwłaszcza **Dyskusja.** Doktorantka w podrozdziałach rozdziału wyniki szczegółowo i rzeczowo zestawia dane uzyskane w poszczególnych eksperymentach, mimo że w przeważającej większości prezentowane są one w publikacjach stanowiących dysertację doktorską. W rozdziale **Dyskusja** natomiast przeprowadza analizę własnych wyników, omawiając je z dużą starannością i dojrzałością naukową. Nie unika krytycznego, ale rzeczowego spojrzenia. W sposób dojrzały konfrontuje uzyskane wyniki z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów.

W zakończeniu pracy Doktorantka zamieszcza obszerne **podsumowanie i wnioski.** Podsumowanie przygotowane poprawnie, daje obraz przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników, ale ze względu na swoją objętość nie precyzuje uzyskanych efektów. W końcowej części tego rozdziału Doktorantka stwierdza, że zastosowanie w diecie, w 90-dniowym doświadczeniu, 30% dawki wytłoków transgenicznego lnu W92, który jednocześnie nadeksprymował trzy główne enzymy ścieżki biosyntezy flawonoidów oraz wytłoków nietransgenicznego lnu Linola, nie wywarło, wynikającego z obecności

antyodżywczych substancji, niepożądanego wpływu na stan zdrowia szczurów i może być uznane za bezpieczne dla zdrowia zwierząt. Natomiast uzupełnienie diety transgenicznym lnem W92 i GT, o wzmocnionej syntezie polifenoli i ich glukozydów, korzystnie wpływa na metaboliczne skutki diety wysokotłuszczowej, poprzez poprawę profilu węglowodanowego i lipidowego surowicy, stabilizację homeostazy procesów redoks w surowicy krwi i tkance wątroby, hamowanie rozwoju stanu zapalnego wątroby i zachowanie jej prawidłowej struktury. Wzbogacenie diety w wytłoki transgenicznego lnu W92 i GT może stanowić element profilaktyki zdrowotnej i terapii schorzeń wynikających z nieprawidłowej diety ludzi i zwierząt. Wytłoki natomiast mogą stanowić wartościowy komponent żywności funkcjonalnej dla osób z dysfunkcjami metabolizmu wywołanymi otyłością.

W ocenie końcowej stwierdzam, że przedstawiona dysertacja jest profesjonalnie przygotowana pod względem merytorycznym i językowym. Należy podkreślić trafność sformułowania założeń i celu badań, rzeczowe i staranne wykonanie z dużym nakładem pracy wielu pomiarów, analiz chemicznych i biochemicznych. Tak duża ilość oznaczeń różnorodnych wskaźników mogła być wykonana i / lub opracowana przez Doktorantkę jedynie dzięki Jej pilności i zaangażowaniu. Cykl przedstawionych publikacji stanowi cenne opracowanie naukowe o dużych walorach poznawczych. Na uwagę zasługuje wielka dokładność i staranność opracowania. Występujące nieliczne usterki (np. „literówki" czy błędy interpunkcyjne, wartości liczbowe podane z kropkami, a praca jest w języku polskim więc powinny być przecinki) zaznaczono w tekście. Nie mają one jednak wpływu na wartość pracy.

Reasumując wyrażam opinię, że przedłożona przez mgr inż. Magdalenę Matusiewicz rozprawa, z uwagi na zaprezentowany poziom naukowy, w pełni odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim (ustawa z dnia 14.03.2003 o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki - Dz. U. nr 65, poz. 595, ze zmianami w Dz. U. z 2005r. nr 164, poz. 1365).

W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Matusiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. inż. Renata KLEBANIUK
Klebaniuk Renata
prof. nadzw. UP