UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w Lublinie | WYDZIAŁ NAUK O ZWIERZĘTACH I BIOGOSPODARKI

INSTYTUT ŻYWIENIA ZWIERZĄT I BROMATOLOGII

Prof. dr hab. Bożena Kiczorowska
Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa
Instytut Żywienia Zwierząt i Bromatologii

Lublin, 14.11.2023r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Klary Zglińskiej
pt.: " Wpływ ekstraktów z oliwnika baldaszkowatego i raka pręgowatego na zmiany wywołane stresem oksydacyjnym w fibroblastach HFFF-2"
"The effect of extracts from autumn olive and spiny-cheek crayfish on oxidative stress-induced changes in HFFF-2 fibroblasts"

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Tomasza Niemca, prof. SGGW,
Instytut Nauk o Zwierzętach, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Podstawa prawna i ocena formalna

Podstawę formalno-prawną wykonania recenzji stanowi decyzja Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach (WNZ.5100.12.2019, INZ-64/2023) Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dnia 15 kwietnia 2019 powołująca mnie na recenzenta w postępowaniu doktorskim Klary Zglińskiej. Ocenę rozprawy wykonano zgodnie z wymogami określonym art. 13 ust. 1 ustawy, z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki" (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). Materiały zostały przygotowane przejrzyście, umożliwiające zapoznanie się z osiągnięciem naukowym oraz jego właściwą i pełną ocenę.

Problem naukowy i znaczenie badań

Stres oksydacyjny powstający w żywym organizmie, może być wywołany czynnikami środowiskowymi, jak m.in.: zakażenia mikroorganizmami patogennymi, toksyczne działanie

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE, WYDZIAŁ NAUK O ZWIERZĘTACH I BIOGOSPODARKI
INSTYTUT ŻYWIENIA ZWIERZĄT I BROMATOLOGII
ul. Akademicka 13, Lublin 20-950;
tel. (+ 081) 445-69-15, fax (+81) 533-35-49;
e-mail: bozena.kiczorowska@up.lublin.pl

mikotoksyn, stres cieplny oraz narażenie na oddziaływanie promieniowania ultrafioletowego. Również stres emocjonalny może być przyczyną indukowania stresu oksydacyjnego. Oddziaływanie stresorów zewnętrznych może prowadzić do zakłócenia statusu zdrowotnego zwierząt, co wiąże się m.in. z naruszeniem dobrostanu zwierząt, zaburzeniem ich behawioru, a także obniżeniem efektywności odchowu, czy produkcyjności. W stresie oksydacyjnym na poziomie molekularnym dochodzi do nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu, związanej również ze nasiloną peroksydacją lipidów (szczególnie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych), uszkodzeniem funkcji białek wynikające z ich zmian strukturalnych, a nawet uszkodzeniem DNA, co może prowadzić do nieprawidłowych mutacji. Zwierzęta wytworzyły naturalne mechanizmy chroniące je przed nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu poprzez produkcję enzymów antyoksydacyjnych, jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) i peroksydaza glutationowa (GPX). Wsparciem w walce ze stresem oksydacyjnym są niskocząsteczkowe związki o działaniu przeciwutleniającym, które mogą być wytworzone w organizmie lub pobierane wraz z pokarmem. Do tej grupy należą zarówno antyoksydanty rozpuszczalne w wodzie i tłuszczach. Taką rolę mogą również pełnić substancje biologicznie czynne naturalnie występujące w surowcach roślinnych i zwierzęcych.

Do nich należą zarówno materiały pochodzenia roślinnego, jak np.: oliwnik baldaszkowaty o udowodnionych właściwościach przeciwzapalnych, czy zwierzęcego, których przykładem jest rak pręgowany o wysokich zdolnościach syntetyzowania z β-karotenu bardzo silnego antyoksydantu – astaksantynę.

Podjęta przez Autorkę tematyka bardzo dobrze wpisuje się w obecny problem poszukiwania możliwości efektywnego wykorzystania naturalnych, roślinnych i zwierzęcych źródeł substancji bioaktywnych o charakterze antyoksydacyjnym w hodowli i produkcji zwierząt. Temat rozprawy doktorskiej mgr. Klary Zglińskiej należy więc uznać za trafny, aktualny i znajdujący swoje uzasadnienie w sferze naukowej.

Opis i ocena pracy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Klary Zglińskiej jest cyklem publikacji, w której skład wchodzą trzy oryginalne prace twórcze, opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych indeksowanym przez Journal Citation Report posiadających Impact Factor (IF) o wartościach: 1,03, 3,06 i 2,84 (IF – w roku wydania publikacji), którym Doktorantka nadała zbiorczy tytuł: **„Wpływ ekstraktów z oliwnika baldaszkowatego i raka pręgowatego na**

zmiany wywołane stresem oksydacyjnym w fibroblastach HFFF-2".

Cykl prac składa się z następujących publikacji:

1. **Zglińska, K.,** Rygało-Galewska, A., Bryś J., Koczoń, P., Borek, K., Roguski M., Niemiec, T.: *Elaeagnus Umbellata* Fruit - Chemical Composition, Bioactive Compounds, and Kinetic of DPPH Inhibition Compared to Standard Antioxidants". Emirates Journal of Food and Agriculture, 2021, 33 (8): 639-46. doi: https://doi. org/10.9755/ejfa. 2021.v33.i8.2738
   IF - 1,03,
   MNiSW – 40 pkt.
2. **Zglińska, K.,** Niemiec, T., Łozicki, A., Matusiewicz, M., Szczepaniak, J., Puppel, K., Kutwin, M., Jaworski, S., Rygało-Galewska, A., Koczoń, P.: Effect of *Elaeagnus umbellata* (Thunb.) fruit extract on H_2O_2-induced oxidative and inflammatory responses in normal fibroblast cells. PeerJ. 9:e10760 doi: doi.org/10.7717/peerj.10760
   IF - 3,06,
   MNiSW – 100 pkt.
3. **Zglińska, K.,** Jaworski, S., Rygało-Galewska, A., Łozicki, A., Roguski, M., Matusiewicz,. M, Niemiec, T.: Effect of Spiny-Cheek Crayfish (*Faxonius limosus*) on H_2O_2-Induced Oxidative Stress in Normal Fibroblast Cells. Applied Sciences. 2022; 12(17):8546. doi: doi.org/10.3390/app12178546
   IF - 2,84,
   MNiSW – 100 pkt.

Oceniając cykl prac należy stwierdzić, że stanowią one zwarty, jednorodny cykl nowatorskich i wartościowych prac badawczych. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, o procentowym jej udziale - 70%. Zostało to potwierdzone w oświadczeniach dołączonych do rozprawy doktorskiej. Współautorzy poświadczają, że udział jej w publikacjach dotyczył: konceptualizacji, udziale w projektowaniu i prowadzenia doświadczenia nr.3, wykonywaniu większości oznaczeń, interpretacji wyników oraz napisaniu pierwszej wersji manuskryptów. Wskazuje to na bardzo duże jej zaangażowanie w cały proces powstawania i wydawania publikacji.

Rozprawa doktorska - trzy wskazane przez Doktorantkę prace charakteryzują się następującymi wskaźnikami bibliometrycznymi: sumaryczny **IF = 6,93**, punkty oceny parametrycznej **Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) = 240.** Dane bibliometryczne przedstawionych publikacji są mierzalne, obiektywne i jednoznacznie świadczą o wysokiej jakości i znaczeniu dla nauki wyników badań zawartych w rozprawie doktorskiej Klary Zglińskiej.

Integralną częścią rozprawy doktorskiej jest opracowanie liczącego 48 str., w którym wyodrębniono rozdziały charakterystyczne dla tego typu opracowań: Strona tytułowa, Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wstęp, Hipoteza badawcza cel i zakres pracy, Metodyka badań, Omówienie głównych wyników badań, Podsumowanie wyników oraz Literatura. Ponadto zostały dołączone publikacje naukowe stanowiące przedmiot rozprawy i oświadczenia autorów.

Mgr Klara Zglińska w oparciu o dobrze wybraną literaturę na 6 stronach, nakreśliła problem badawczy i uzasadniła potrzebę podjęcia badań. Szczegółowo opisała tło swoich badań traktując je wieloaspektowo: od charakterystyki chemicznej ekstraktów z owoców oliwnika baldaszkowatego i raków pręgowatych, ze szczególnym uwzględnieniem składników bioaktywnych do oceny ich aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej w stresie oksydacyjnym w komórkach fibroblastów linii HFFF-2. Świadczy to o dobrym przygotowaniu Autorki do pracy badawczej i dużym własnym zaangażowaniu przy tak szczegółowym studiowaniu literatury. W opracowaniu wykorzystano 52 pozycje literatury, dobrze dobrane do tematyki pracy, z czego około 80% opublikowanych w ostatnich 15 latach. To potwierdza dobre usytuowanie podjętej tematyki na tle współcześnie prowadzonych badań.

Cel Naukowy Pracy i Hipotezy Badawcze

Cel pracy oraz cele szczegółowe zostały przedstawione jasno i precyzyjnie. Ważnym elementem rozprawy doktorskiej jest sformułowanie dla całego cyklu 3 doświadczeń wspólnej hipotezy badawczej. Podkreśla ona spójność koncepcji naukowej, którą zrealizowano w szeroko prowadzonych działaniach eksperymentalnych.

Założenia Metodyczne Pracy

W rozdziale „Metodyka badań" Autorka szczegółowo przedstawiła założenia metodyczne rozprawy doktorskiej. Zakres eksperymentalny przedłożonej do oceny dysertacji doktorskiej jest obszerny i obejmuje 3 doświadczenia:

1. Określenie składu chemicznego oraz ocena aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej ekstraktu z owoców oliwnika baldaszkowatego;
2. Charakterystyka chemiczna ekstraktu z oliwnika pod kątem wybranych substancji bioaktywnych oraz ocena jego wpływu na indukowany nadtlenkiem wodoru stres oksydacyjny w komórkach fibroblastów;
3. Charakterystyka chemiczna ekstraktu z raków pręgowanych pod kątem wybranych

substancji bioaktywnych oraz ocena jego wpływu na indukowany nadtlenkiem wodoru stres oksydacyjny w komórkach fibroblastów.

W **doświadczeniu nr.1** określono podstawowy skład chemiczny owoców oliwnika baldaszkowatego, profil kwasów tłuszczowych oraz zawartość fenoli, witamin rozpuszczalnych w tłuszczach i karotenoidów. W ekstrakcie z owoców oliwnika określono aktywność antyoksydacyjną z wykorzystaniem 0,1 M DPPH. Wyniki przedstawiono jako IC50 – stężenie, przy którym zahamowane jest 50% aktywności DPPH. W drugim etapie badań właściwości antyoksydacyjnych również zastosowano metodę z użyciem rodnika DPPH oraz standardy antyoksydantów (BHT i witamina C) o stężeniu 100 μg/ml. Wyniki przedstawiono jako % hamowania rodnika DPPH na skali czasu

W **doświadczeniu nr.2** Autorka przeanalizowała ekstrakt z oliwnika pod kątem zawartości: całkowitej liczby fenoli, witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (D, E, K), witaminy C i karotenoidów (β-karoten, likopen) oraz jego właściwości antyoksydacyjnych. Właściwości antyoksydacyjne ekstraktu o stężeniu 100, 500 i 1000 μg/ml mierzono za pomocą testu wychwytywania wolnych rodników (DPPH) z wykorzystaniem substancji wzorcowych (α-tokoferol i kwas L-askorbinowy). Wyniki wyrażono jako % hamowania DPPH. Ocenę wpływu ekstraktu na indukowany nadtlenkiem wodoru stres oksydacyjny w komórkach fibroblastów prowadzono w zakresie: analizy ekspresji RFT przez fibroblasty, aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), żywotności i proliferacji oraz typów śmierci komórek HFFF-2, a także ekspresję wybranych cytokin.

W **doświadczeniu nr.3** w przygotowanym ekstrakcie z raków pręgowanych przeprowadzono oznaczenia zawartości β-karotenu, witamin rozpuszczalnych w tłuszczach i całkowitych fenoli oraz określono chemiczny miernik jakości białka (Chemical Score). Podobnie jak w doświadczeniu nr 2. prowadzono ocenę wpływu ekstraktu na indukowany nadtlenkiem wodoru stres oksydacyjny w komórkach fibroblastów w zakresie: analizy ekspresji RFT przez fibroblasty, morfologii, żywotności i proliferacji śmierci komórek HFFF-2 oraz aktywność kaspazy-3.

Układ przeprowadzonych doświadczeń, liczba obserwacji oraz wykorzystane metody analityczne nie odbiegają od przyjętych standardów i pozwoliły na pełną realizację założonych celów. W opracowaniu zastosowano prawidłowe metody statystyczne.

Omówienie wyników i dyskusja

Doktorantka w ocenianej pracy szczegółowo i rzeczowo omawia uzyskane wyniki na tle dobrze dobranego piśmiennictwa. Z dużą starannością i dojrzałością naukową przeprowadza analizę wyników własnych. W doświadczeniu 1. (**publikacja nr.1.:** ***Zglińska, K.,*** *Rygało-Galewska, A., Bryś J., Koczoń, P., Borek, K., Roguski M., Niemiec, T. Elaeagnus Umbellata Fruit - Chemical Composition, Bioactive Compounds, and Kinetic of DPPH. Inhibition Compared to Standard Antioxidants". Emirates Journal of Food and Agriculture, Vol.33, nr. 8, 2021, s. 639-46*) Doktorantka wykazała, że owoce oliwnika baldaszkowatego pochodzące z Polski mają podobny profil substancji bioaktywnych do owoców rosnących na terenie Azji i Ameryki Północnej. Charakteryzują się licznymi składnikami bioaktywnymi oraz właściwościami antyoksydacyjnymi, co sprawia, że mogą być pożądanym surowcem do produkcji dodatków paszowych dla zwierząt towarzyszących narażonych na stres oksydacyjny i stan zapalny.

W doświadczeniu 2. (**publikacja nr.2.:** ***Zglińska, K.***, *Niemiec, T., Łozicki, A., Matusiewicz, M., Szczepaniak, J., Puppel, K., Kutwin, M., Jaworski, S., Rygało-Galewska, A., Koczoń, P. Effect of Elaeagnus umbellata (Thunb.) fruit extract on H_2O_2-induced oxidative and inflammatory responses in normal fibroblast cells. PeerJ 9:e10760 3)* Autorka udowadnia, że metanolowo-acetonowy ekstrakt z owoców oliwnika baldaszkowatego ma działanie antyoksydacyjne, proliferacyjne oraz prawdopodobnie przeciwzapalne. Natomiast ekstrakt z raków pręgowatych badany w **doświadczeniu nr.3**. jest cennym źródłem składników bioaktywnych, a także białka o wysokiej jakości (**publikacja nr.3.:** ***Zglińska, K.***, *Jaworski, S., Rygało-Galewska, A., Łozicki, A., Roguski, M., Matusiewicz,. M, Niemiec, T. Effect of Spiny-Cheek Crayfish (Faxonius limosus) on H_2O_2 - Induced Oxidative Stress in Normal Fibroblast Cells. Applied Sciences. 2022; 12(17):8546.*). Ponadto ekstrakt z raków wykazuje właściwości antyoksydacyjne i ochronne w stosunku do fibroblastów narażonych na stres oksydacyjny. Doktorantka zwraca również uwagę na jego działanie proliferacyjne. Ekstrakt z raków pręgowatych zwiększał nawet ośmiokrotnie ilość żywych komórek w stosunku do kontroli. Autorka wskazuje na możliwość wykorzystania ekstraktu w terapiach regeneracyjnych.

Rozdział "Wnioski" jest logicznym efektem uzyskanych wyników badań. Świadczą o dużej zdolności Doktorantki do syntetycznej analizy uzyskanych wyników na tle dotychczasowych badań.

Oceniając prac doktorską nasunęło mi się kilka pytań do Doktorantki:

1. Jakie poziomy ekstraktów z owoców oliwnika i raka pręgowanego wykazywały optymalne właściwości antyoksydacyjne?
2. W pracy wspomina Pani o możliwości żywieniowego wykorzystania tych ekstraktów w hodowli zwierząt towarzyszących. Czy widzi Pani potencjał w stosowaniu tych ekstraktów także w żywieniu innych gatunków zwierząt? A jeśli tak, to w jakim zakresie?
3. W opracowaniu pojawiają się również sugestie poza-żywieniowego stosowania badanych ekstraktów, np.: w kosmetologii. Proszę wyjaśnić w jakim zakresie w tym aspekcie można je wykorzystać w hodowli zwierząt?

Rozprawa doktorska przedstawiona do oceny jest wykonana wyjątkowo starannie. Jednak w tak obszernym opracowaniu nieuniknione są na drobne niejasności i niedociągnięcia, na które z obowiązku recenzenta zwracam uwagę:

- na str 12. oraz w publikacji nr.1. cytowana jest pozycja „Khanzadi, 2012", której nie ma w spisie literatury opracowania oraz dołączonych publikacji,
- na str 17. cytowana jest pozycja „AOAC" bez podania roku. Źródło cytowane jest również w publikacjach, ale nie jest uwzględnione w spisie literatury opracowania i dołączonych publikacji,
- na str 29. cytowana jest pozycja „Bondet i sp., 1997", której nie ma w spisie literatury w opracowaniu, ale znajduje się w publikacji nr.1,
- w publikacji nr.1 umieszczono opis medotyki oznaczania oraz wyniki analiz chemicznych zawartości elementów mineralnych: Cu, Fe, Mg, P, Se i Zn w owocach oliwnika, ale tych informacji nie uwzględniono w opracowaniu,
- w opracowaniu umieszczono 12 obiektów graficznych opisanych jako ryciny, wśród których znalazły się 3 ryciny (schematy i zdjęcia) oraz 9 wykresów.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska w części opisowej jest o obszernym opracowaniem naukowym liczącym 48 strony, zawiera 19 tabel, 12 rycin, 52 pozycje piśmiennictwa naukowego. Przyjęta struktura treści w tego typu opracowaniach - nie budzi zastrzeżeń. Całość jest estetyczna, logiczna i przejrzysta, a kolejne rozdziały składają się w konsekwentną całość.

Przedstawiona praca do oceny stanowi rzetelne i aktualne, wieloaspektowe źródło wiedzy z zakresu możliwości wykorzystania roślinnych i zwierzęcych źródeł substancji antyoksydacyjnych w hodowli zwierząt. Jest całościowym i oryginalnym rozwiązaniem problemu badawczego i jednocześnie dowodem rozległej oraz ugruntowanej wiedzy Autorki. Charakteryzuje się wysokim

poziomem merytorycznym. **Rozprawa wnosi istotny wkład w rozwój Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo oraz posiada duże znaczenie aplikacyjne.** Wykonanie badań wymagało dużego zaangażowania, wkładu pracy, współpracy oraz bardzo dobrej znajomości technik i metod badawczych.

Reasumując stwierdzam, że oceniana praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym art. 13 ust. 1 ustawy, z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki" (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i na tej podstawie przekładam Radzie Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo SGGW w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr. Klary Zglińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bożena Kiczorowska

Lublin, 14.11.2023

Prof. dr hab. Bożena Kiczorowska