



**INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, tel.: (+48 89) 523 46 86
Fax (+48 89) 524 01 24; e-mail instytut@pan.olsztyn.pl; www.pan.olsztyn.pl

dr hab. inż. Małgorzata Wronkowska
Zakład Chemii i Biodynamiki Żywności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk
w Olsztynie

Olsztyn, 8 sierpień 2023 r.

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej autorstwa mgr inż. Ewy Habza-Kowalskiej
zatytułowanej**

**„Badanie interakcji efektorów peroksydazy tyroidowej oraz wybranych enzymów
prooksydacyjnych w układach modelowych”**

wykonanej w Katedrze Biochemii i Chemii Żywności,
Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie,
promotor: prof. dr hab. Urszula Gawlik-Dziki

Recenzja wykonana na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 23.06.2023r. Recenzja przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Ewy Habza-Kowalskiej składa się z oceny następujących elementów: 1) czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia; 2) czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora; 3) czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej oraz 4) oceny końcowej.

Czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia?

Dostępnych jest wiele danych literaturowych, które wskazują na bezpośrednią zależność między wielkością spożycia warzyw i owoców a redukcją ryzyka wystąpienia różnych chorób cywilizacyjnych. Często choroby takie wynikają z tzw. nowoczesnego stylu życia, między innymi zbyt małej ilości ruchu, źle zbilansowanej diety, zanieczyszczenia środowiska czy stresu. Wszystkie wymienione czynniki mogą prowadzić do naruszenia w ustroju człowieka naturalnej równowagi pomiędzy zachodzącymi w warunkach fizjologicznych

procesami utleniania a procesami przeciwutleniającymi. Zaburzenie tej równowagi prowadzi do dominacji reakcji wolnorodnikowej o charakterze utleniającym, za co odpowiadają reaktywne formy tlenu, czyli tzw. wolne rodniki, które stanowią zagrożenie dla organizmu człowieka poprzez swoje niekorzystne oddziaływanie na komórki i tkanki. Dane literaturowe wskazują, że jednym z efektów powstawania tego rodzaju form tlenu w organizmie człowieka może być rozwój przewlekłych stanów zapalnych oraz nadmierna reaktywność układu odpornościowego. W pracy doktorskiej przedstawionej do recenzji skupiono się na tych właśnie przesłankach, które mogą stanowić podstawę chorób tarczycy (zarówno nadczynności, jak i niedoczynności). Doktorantka wskazała, że sukces terapii i zapobieganie chorobom tarczycy polega na przestrzeganiu właściwego stylu życia, unikanie stresu czy odpowiedni model żywieniowy. Natomiast dieta stosowana w chorobach tarczycy powinna charakteryzować się wysokim potencjałem przeciwzapalnym i przeciwutleniającym.

Wiele jest opracowań, które zwracają uwagę na fakt, iż dieta bogata w związki fitochemiczne wspomaga organizm w dostarczanie substancji o aktywności przeciwutleniającej. Związki fenolowe to grupa metabolitów wtórnych roślin o udokumentowanej aktywności przeciwutleniającej. Związki te nie są produkowane w organizmie zwierząt, ale mogą być dostarczane przez spożywanie żywności roślinnej. Skutki zdrowotne polifenoli zależą zarówno od ich spożycia (ilościowo i jakościowo) oraz biodostępności, która może się znacznie różnić od spożytej ilości. Powszechnie znane są prozdrowotne właściwości polifenoli roślinnych, w tym działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwmiażdżycowe, przeciwcukrzycowe, przeciwalergiczne czy antymutagenne. Do mechanizmów warunkujących działanie przeciwutleniające związków flawonoidowych należą: „wygaszanie” wolnych rodników, hamowanie peroksydacji lipidów, zdolność chelatowania metali czy obniżenie aktywności enzymów odpowiedzialnych za powstawanie reaktywnych form tlenu.

Doktorantka szczegółowo omówiła związek jaki może zaistnieć pomiędzy substancjami dostarczonymi z dietą a rozwojem np. przewlekłego limfocytarnego zapalenia tarczycy, czyli choroby Hashimoto (HT). W recenzowanej pracy bardzo dobrze opisany jest wpływ składników fitochemicznych wchodzących w skład surowców roślinnych na aktywność peroksydazy tyroidowej (TPO) oraz enzymów prooksydacyjnych: lipooksygenazy (LOX) i oksydazy ksantynowej (XO). Rozprawa doktorska obejmuje również analizę interakcji składników aktywnych, co zostało wykorzystane do oceny finalnej aktywności mieszanek. Bazując na wynikach uzyskanych z wykorzystaniem modelu ludzkiego przewodu pokarmowego Pani mgr inż. Ewa Habza-Kowalska podjęła próbę wnioskowania o wpływie oddziaływań ze składnikami matrycy żywności na potencjał odżywczy i prozdrowotny zaproponowanych produktów.

Podsumowując: podjęcie przez Panią mgr inż. Ewę Habza-Kowalską w pracy doktorskiej tematyki badania wpływu polifenoli zawartych w żywności pochodzenia roślinnego na aktywność peroksydazy tyroidowej (TPO), lipooksygenazy (LOX) i oksydazy ksantynowej (XO) oraz zdolności do zapobiegania stresowi oksydacyjnemu uważam za trafne, ważne i aktualne oraz uzasadnione ze względów poznawczych i aplikacyjnych. Zebrane informacje mogą stanowić cenny wkład w dobieraniu odpowiedniej diety dla pacjentów z dysfunkcjami tarczycy. Przedstawiona do recenzji rozprawa znajduje się w nurcie bieżących zagadnień badawczych w ramach dyscypliny technologia żywności i żywienia.

Czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora?

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Ewy Habza-Kowalskiej pt. „Badanie interakcji efektorów peroksydazy tyroidowej oraz wybranych enzymów prooksydacyjnych w układach modelowych” stanowi cykl spójnych tematycznie czterech publikacji naukowych napisanych w języku angielskim, które ukazały się w latach 2019-2021 w czasopismach naukowych z listy Ministerstwa Edukacji i Nauki (Molecules; Biomolecules; International Journal of Molecular Sciences) oraz preprint, który ukazał się w roku 2023 na stronie bioRxiv. Sumaryczna liczba punktów wyodrębnionego tematycznie cyklu publikacji wynosiła 340 pkt, natomiast ich sumaryczny IF wynosił 13,557. Dołączone oświadczenia współautorów potwierdzają znaczący, indywidualny wkład Pani mgr inż. Ewy Habza-Kowalskiej we współtworzeniu koncepcji badań, opracowaniu metodologii badań, przeprowadzeniu doświadczeń, analizie uzyskanych danych oraz w opracowaniu manuskryptów. Należy podkreślić, iż prace przedstawione przez Doktorantkę znalazły już uznanie wśród naukowców o czym świadczy liczba cytowani, które wynosiły 19 wg bazy Web of Science oraz 20 wg bazy Scopus.

Cykl publikacji został opatrzony 40-stronicowym opracowaniem w języku polskim, na które składa się: streszczenie, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wprowadzenie teoretyczne, hipotezy badawcze oraz cel pracy, etapy badań, materiały i metody, omówienie wyników badań, wnioski, dalsze perspektywy badawcze oraz bibliografia. Tytuł rozprawy został sformułowany poprawnie i odpowiada przedstawionym w ramach pracy rezultatom badań. Bibliografia obejmuje 44 angielskojęzyczne opracowania naukowe, z czego 38% zostało opublikowanych w ciągu ostatnich 10-lat.

Struktura przeprowadzonych doświadczeń została scharakteryzowana poprzez omówienie etapów weryfikacji koncepcji badawczych w oparciu o publikacje, które stanowią przedmiot rozprawy doktorskiej. Pani mgr inż. Ewa Habza-Kowalska przedstawiła szczegółowo materiały, odczynniki oraz poszczególne metody zastosowane w badaniach. Wszystkie metody badań zostały omówione szczegółowo w publikacjach stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej. W dysertacji przedstawiono syntetyczny opis wszystkich zastosowanych metod także w języku polskim, co jest ważne z punktu widzenia przyszłych czytelników dysertacji i możliwości wykorzystania w/w metod badawczych. Praca, poza nielicznymi błędami stylistycznymi i interpunkcyjnymi, które nie wpływają na ogólną ocenę została napisana zrozumiałym językiem umożliwiającym śledzenie i analizę wszystkich przedstawionych wyników badań.

Podsumowując: stwierdzam, że praca spełnia wymagania formalne stawiane pracom dysertacyjnym na stopień doktora. Przedstawiona do recenzji rozprawa wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Panią mgr inż. Ewę Habza-Kowalską.

Czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej?

W rozdziale „Omówienie wyników badań” Doktorantka przedstawiła szczegółowy opis wyników badań wraz z krytyczną i naukową dyskusją. Rozdział ten zawiera wszystkie informacje niezbędne do właściwego zrozumienia badań prowadzonych przez Autorkę, które zostały dobrze przemyślane i wykonane.

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej: aut. Habza-Kowalska E., Kaczor A. A., Żuk J., Matosiuk D., Gawlik-Dziki U. pt. Thyroid Peroxidase Activity is Inhibited by Phenolic Compounds - Impact of Interaction (publikacja I); aut. Habza-Kowalska E., Gawlik-Dziki U., Dziki D. pt. Mechanism of action and interactions between thyroid peroxidase and lipoxygenase inhibitors derived from plant sources (publikacja II) oraz aut. Habza-Kowalska E., Kaczor A. A., Bartuzi D., Piłat J., Gawlik-Dziki U. pt. Some Dietary Phenolic Compounds Can Activate Thyroid Peroxidase and Inhibit Lipoxygenase-Preliminary Study in the Model Systems (publikacja III) przedstawiają wyniki badań *in vitro* dotyczące wpływu czystych polifenoli na aktywność enzymów: peroksydazy tyroidowej (TPO) i lipooksygenazy (LOX). Zastosowane w tych badaniach związki polifenolowe zostały wybrane na podstawie przeszukiwania wirtualnego (badania *in silico*) oraz badań wstępnych.

W pracy I oraz III przedstawiono wyniki analizy izobolograficznej inhibitorów TPO. Wykazano, że rutyna i kwas chlorogenowy działały synergistycznie, interakcja addytywna została stwierdzona w przypadku rutyny i kwercetyny oraz rutyny i kwasu rozmarynowego. Natomiast w przypadku kwasu chlorogenowego i kwasu rozmarynowego, kwasu chlorogenowego i kwercetyny oraz kwasu rozmarynowego i kwercetyny stwierdzono antagonizm (publikacja I). W publikacji III przedstawiono wyniki analizy izobolograficznej aktywatorów TPO, w której stwierdzono, że kwas *trans* – cynamonowy oraz kwas ferulowy działają addytywnie; kwas syringowy i kwas ferulowy wykazują silną synergię, a kwas syringowy i kwas *trans*-cynamonowy działają synergistycznie. W tej samej publikacji III przedstawiono wyniki analizy izobolograficznej, które wskazały, że w przypadku hamowania aktywności LOX kwas *trans* –cynamonowy/kwas syringowy działają antagonistycznie; z kolei kwas ferulowy/*trans*-cynamonowy oraz kwas ferulowy/kwas syringowy działają synergistycznie.

W publikacji II (aut. Habza-Kowalska E., Gawlik-Dziki U., Dziki D. pt. Mechanism of action and interactions between thyroid peroxidase and lipoxygenase inhibitors derived from plant sources) oraz publikacji IV (preprint aut. Habza-Kowalska E., Piwowarczyk K., Czyż J., Gawlik-Dziki U., Oatmeal and wheat flour are the sources of thyroid peroxidase (TPO), Lipoxygenase (LOX) and xanthine oxidase (XO) modulators potentially applicable in the prevention of inflammatory thyroid diseases) jako materiał badań zastosowano żywność pochodzenia roślinnego bogatą w związki, których zdolność do modulowania aktywności TPO i LOX analizowano w poprzednich etapach. Porównano aktywność ekstraktów etanolowych (będących ekstraktami kontrolnymi) oraz ekstraktów po symulowanym trawieniu na aktywność TPO oraz enzymów prooksydacyjnych, LOX i XO. Wykazano, że próby otrzymane po trawieniu *in vitro* pietruszki, zielonej kawy, zielonej herbaty, kminku i gorczycy aktywowały TPO, podczas gdy ekstrakty etanolowe, podobnie jak związki referencyjne, hamowały aktywność tego enzymu. W przypadku ekstraktów otrzymanych po trawieniu *in vitro* płatków owsianych i mąki pszennej stwierdzono zdolność do aktywowania TPO oraz hamowania

aktywności lipoksygenazy (LOX) i oksydazy ksantynowej (XO) podobnie jak w przypadku związku referencyjnego - kwasu ferulowego.

Doktorantka wskazała na fakt, że zdolność do hamowania aktywności LOX jest często skorelowana z aktywnością przeciwnowotworową, dlatego też rozszerzyła badania o część dotyczącą właściwości przeciwnowotworowych ekstraktów pochodzących z mąki pszennej oraz płatków owsianych. W badaniach *in vitro* zaprezentowanych w publikacji IV wykorzystano dwa modele eksperymentalne, które umożliwiły oszacowanie wpływu statusu zróżnicowania komórek raka tarczycy i/lub ekspresji TPO na ich wrażliwość na działanie substancji zawartych w ekstraktach otrzymanych z płatków owsianych i mąki pszennej. Uzyskane dane wskazały raczej na ich potencjał prewencyjny, co jednak stanowi według Doktorantki przesłankę sugerującą zasadność wprowadzenia ich do codziennej diety osób cierpiących na niedoczynność tarczycy.

Uważam, że na podstawie uzyskanych rezultatów badań Doktorantka wyciągnęła właściwe i konstruktywne wnioski. Przeprowadzone badania i sformułowane na ich podstawie wnioski kładą odpowiednie akcenty na znaczenie poznawcze i aplikacyjne oraz są adekwatne do celów określonych w pracy.

W ocenie dysertacji chciałabym zwrócić uwagę na kilka tematów które zwróciły moją uwagę i prosiłabym Doktorantkę o odniesienie się do poniższych kwestii:

1. materiałem badań były produkty roślinne, które zostały wybrane w oparciu o cyt. „zawartość polifenoli, częstotliwość spożycia oraz dostępność na rynku” – czy dane te dotyczyły tylko rynku polskiego?
2. do pomiaru aktywności przeciwutleniającej żywności stosowane są różnorodne metody badań, dlaczego wybrano metodę ABTS?
3. na uwagę zasługuje tzw. „paradoks antyoksydacyjny” (Halliwell, 2012, Br. J. Clin. Pharmacol.) wynikający z badań interwencyjnych na ludziach, w których nie udało się wykazać działania zapobiegawczego lub terapeutycznego wpływu dużych dawek suplementacji przeciwutleniaczy w diecie. Czy w opinii Doktorantki również w przypadku badań przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej podawanie żywności bogatej w polifenole, osobom borykającym się z różnymi chorobami tarczycy, może nie być tak skuteczne jak to wynika z badań *in vitro*?

Recenzowana praca doktorska stanowi wartościowe opracowanie naukowe, świadczące o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym i analitycznym mgr inż. Ewy Habza-Kowalskiej.

Podsumowując: publikacje stanowiące rozprawę wnoszą oryginalny wkład do rozwoju wiedzy z zakresu technologii żywności i żywienia oraz wpisują się doskonale w obecny nurt badań nad poszukiwaniem nowych składników do uzyskania żywności o podwyższonych walorach prozdrowotnych.

Ocena końcowa

Podsumowując, pracę doktorską oraz cykl publikacji wchodzących w skład rozprawy dysertacyjnej Pani mgr inż. Ewy Habza-Kowalskiej stwierdzam, że Autorka wykazała się dobrą znajomością tematyki badań. Poprawnie wykonała doświadczenia i analizy wykazując

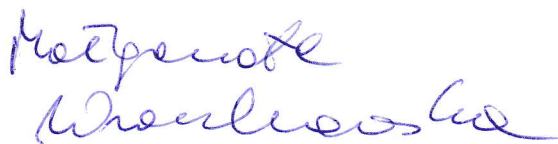
się umiejętnością posługiwania się nowoczesną aparaturą i uzyskując dużą liczbę wartościowych wyników.

Zestawienie przedstawione w pracy doktorskiej wskazuje, że dorobek naukowy Pani mgr inż. Ewy Habza-Kowalskiej obejmuje 7 publikacji w czasopismach naukowych posiadających Impact Factor, jedna publikacja ukazała się w czasopiśmie naukowym nie posiadającym IF. W dorobku Doktorantki znajduje się także współautorstwo rozdziałów w dziesięciu monografiach naukowych. Wyniki badań były również prezentowane na licznych konferencjach naukowych. Łączny dorobek Doktorantki za lata 2017-2021 wynosi 742 pkt wg MEiN (z uwzględnieniem roku wydania publikacji), a sumaryczny IF 23,094 (z uwzględnieniem roku wydania publikacji).

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Ewy Habza-Kowalskiej zatytułowana „Badanie interakcji efektorów peroksydazy tyroidowej oraz wybranych enzymów prooksydacyjnych w układach modelowych” spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o **przyjęcie rozprawy i dopuszczenie** mgr inż. Ewy Habza-Kowalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze wysoki poziom naukowy pracy i aplikacyjny charakter wyników badań oraz aktywność naukową Doktorantki składam do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia **wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej** Pani mgr inż. Ewy Habza-Kowalskiej.



dr hab. inż. Małgorzata Wronkowska