



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Płatosz pt. „Przenikanie antocyjanów aronii i kapusty czerwonej oraz ich metabolitów przez barierę krew-płyn mózgowordzeniowy w badaniach modelowych na owcach”

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Podstawą formalną opracowania recenzji uchwała Rady Naukowej IRZiBŻ PAN w Olsztynie powołująca mnie w dniu 15 grudnia 2022 r. na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr **Natalii Płatosz**. Przewód został wszczęty w obszarze nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

2. Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej

Bariera krew-płyn mózgowo-rdzeniowy (krew-PMR), obok bariery krew-mózg jest drugą ważną barierą występującą w mózgu. Stanowi ona kompilację cech anatomicznych i fizjologicznych utworzoną w celu ochrony układu nerwowego. Ich zadaniem jest zapewnienie homeostazy środowiska w OUN oraz ochrona przed związkami toksycznymi. Z tego też powodu przenikalność związków biologicznie aktywnych do OUN stanowi od lat przedmiot szeroko zakrojonych badań zarówno *in silico*, *in vitro* jak i *in vivo*. Aktualny stan wiedzy na temat zdolności antocyjanów przez w/w bariery jest niepełny i zagadnienie to rodzi nadal więcej pytań niż odpowiedzi, stąd też podjęta przez Doktorantkę tematyka badań jest bardzo aktualna i ważna nie tylko z punktu widzenia badań podstawowych, ale również, w dalszej perspektywie, może mieć znaczenie aplikacyjne. Za szczególnie ważne i cenne aspekty uważam próbę odpowiedzi na pytania w jaki sposób struktura chemiczna natywnych antocyjanów wpływa na ich zdolność do przenikania bariery krew-PMR? Jaka jest rola liczby i rodzaju podstawników? Czy bariera krew-PMR jest selektywna dla antocyjanów nieacylowanych i acylowanych fenolokwasami?

3. Ogólna charakterystyka rozprawy

Na rozprawę składa się cykl trzech publikacji wydanych w czasopismach naukowych o łącznej punktacji MNiSW wynoszącej 480 punktów i sumarycznym wskaźniku Impact Factor 20,991. Dwie z prac wchodzących w skład Osiągnięcia zostały opublikowane w *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, jedna w *Food Chemistry*. We wszystkich

pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, W dwóch pracach jej udział wynosi 50%, w jednej – 42 %. Zaznaczyć należy, iż prace te są bardzo obszerne, otrzymanie i opracowanie wyników z nich zamieszczonych wymagało olbrzymich nakładów pracy nie tylko analitycznej (laboratoryjnej) ale również *in silico*.

We wstępie, w oparciu o aktualną literaturę tematu, Doktorantka syntetycznie przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat występowania, właściwości, aktywności biologicznej oraz potencjalnej biodostępności związków antocyjanowych. Trafnie wskazała na luki i postawiła szereg pytań, na które odpowiedzieć ma niniejsza dysertacja. Tę część pracy oceniam bardzo wysoko, umiejętność ukierunkowanej analizy olbrzymiej ilości publikacji z szeroko pojętego zakresu rozprawy, jej syntezy i trafnego zlokalizowania luk w istniejącej wiedzy świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Celem podjętych badań było określenie zdolności antocyjanów i ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-PMR po dożwaczowym podaniu owcom preparatów z aronii i kapusty czerwonej, określenie zdolności do przenikania pochodnych cyjanidyny i ich metabolitów II fazy przez barierę krew-PMR po dożylnym podaniu owcom preparatu zawierającego mieszaninę 3-galaktozydu cyjanidyny (Cy3gal) i 3-diglukozydu-5-glukozydu cyjanidyny (Cy3diG5G) oraz ustalenie, czy struktura chemiczna antocyjanów może wpływać na przenikanie tych związków przez barierę krew-PMR. Weryfikacji poddano trzy hipotezy badawcze. Wątpliwości budzi hipoteza pierwsza, zakładająca, iż po dożwaczowym podaniu preparatów z aronii i kapusty czerwonej profil natywnych antocyjanów oraz ich metabolitów II fazy w osoczu krwi i moczu owiec zbliżony jest do profilu tych związków u ludzi.

Hipoteza ta nie znajduje odzwierciedlenia ani w celach ogólnych ani szczegółowych, co więcej, w dysertacji nie znajdujemy odpowiedzi, choćby w oparciu o dane literaturowe, na sformułowany w niej problem. Według mnie jest ona całkowicie zbędna, lub po prostu w rozprawie brakuje pracy podejmującej ten temat. W ocenie recenzenta postawione cele główne są adekwatne do dwóch hipotez (2 i 3) oraz tytułu pracy. Hipoteza 1 powinna zostać usunięta.

Realizacji postawionych celów przyporządkowano cztery zadania badawcze. Niestety, żadne z nich nie mogło posłużyć weryfikacji hipotezy 1, natomiast bardzo dobrze wpisywały się w hipotezy 2 i 3.

Kolejnym rozdziałem ocenianej dysertacji są **Materiały i Metody**.

O ile metody analityczne nie budzą zastrzeżeń, metodologia jest adekwatna do zaplanowanych badań, wątpliwości budzi wybór owiec jako zwierząt modelowych. W dalszej części rozprawy Doktorantka sama zwraca uwagę na zasadnicze różnice w budowie przewodu

pokarmowego owiec i ludzi, stąd też prośba o wyjaśnienie tej kwestii. Jest to tym bardziej zastanawiające, iż nie zaplanowano/przeprowadzono badań na ludziach potwierdzających prawidłowość takiego założenia, nie przeprowadzono również studiów literaturowych, które mogłyby choć w części rozwiązać pojawiające się wątpliwości. Kolejną kwestią jest problem aktywności przeciwneurogeneracyjnych antocyjanów. Zagadnienie to pojawia się jedna z pierwszych kwestii w rozdziale Wyniki i Dyskusja. Rozumiem intencje Doktorantki, jednakże takie sformułowanie w sposób naturalny rodzi pytanie o badania, które mają potwierdzić taką aktywność. Tymczasem w żadnej z prac wchodzących w skład dysertacji nie przeprowadzono stosownych badań, choćby *in vitro* (proste testy antyoksydacyjne, do których można było wykorzystać uzyskane próby osocza, PMR czy moczu oraz ekstrakty z badanych surowców).

Pierwszym z problemów poruszonych w tej części pracy jest określenie zdolności antocyjanów i ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-PRM po dożwaczowym podaniu owcom preparatu z aronii będącego przedmiotem pierwszej z prac wchodzących w skład Dysertacji. Na wstępie dokonano ilościowo-jakościowej analizy antocyjanów w surowcu roślinnym metodą mikro-HPLC-MS/MS wykazując obecność czterech pochodnych cyjanidyny. Dominującym był Cy3gal, który stanowił 68,52% całej puli antocyjanów. Bardzo ciekawym aspektem o który wzbogacono badania była ocena wpływu podstawnika glikozydowego w cząsteczce cyjanidyny na zdolność do przenikania przez barierę krew-PRM.

W płynach fizjologicznych owiec po dożwaczowym podaniu preparatu z aronii zidentyfikowano 4 związki natywne oraz 17 ich metabolitów. Kilka z metabolitów II fazy (Cysulf, mCysulf oraz trzy różne formy mCyglcsulf) zostało znalezione po raz pierwszy.

Autorka przeprowadziła analizę wyników w kontekście istniejącej literatury tematu i zaproponowała uzupełnienie istniejącej w aktualnej wiedzy luki na temat mechanizmu przenikania antocyjanów przez bariery mózgowe wskazując na rolę bilitranslokazy, glikoproteiny P oraz uwarunkowań wynikających z budowy i natury chemicznej antocyjanów (ilość wiązań wodorowych, występowanie i liczba grup hydroksylowych i ugrupowań lipofilowych). Doktorantka stwierdziła, iż po dożwaczowym podaniu aronii antocyjany były wchłaniane i występowały w osoczu krwi w postaci natywnej oraz w postaci metabolitów II fazy. Wnioskując po czasie identyfikacji pochodnych cyjanidyny (około 30 minut od podania) wywnioskowała, iż wchłanianie antocyjanów u owiec, podobnie jak u ludzi, zaczyna się już w górnych odcinkach przewodu pokarmowego. Autorka znaczną część podrozdziału 4.1.2.1. poświęca na omówienie i wyjaśnienie różnic pomiędzy procesami wchłaniania antocyjanów u ludzi i owiec, tłumacząc to szczegółowo i tym samym podważając niefortunna hipotezę 1.

Proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do tej kwestii, zwłaszcza o wskazanie podobieństw w metabolizmie antocyjanów u ludzi i owiec.

Kolejną kwestią poruszoną przez Doktorantkę w tej części dysertacji był profil i stężenie antocyjanów aronii i ich metabolitów II fazy w moczu zwierząt. Autorka szczegółowo omawia czas pojawienia się oraz profil związków (natywnych i ich metabolitów) w moczu zwierząt. Otrzymane wyniki wskazują na odzwierciedlenie procesów metabolicznych antocyjanów zachodzących na poziomie wchłaniania do krwi i metabolizmu w wątrobie. Autorka stawia hipotezę, iż decydującymi obszarami biotransformacji antocyjanów są żołądek, jelito cienkie oraz wątroba, natomiast biotransformacja zachodząca w nerkach jest mniej intensywna.

Ostatnim zagadnieniem tej części Dysertacji jest profil i stężenie antocyjanów aronii i ich metabolitów II fazy w płynie mózgowo-rdzeniowym. Autorka stwierdziła, iż antocyjany docierały do PMR po dożwaczowym podaniu preparatu z aronii, a ich profil i stężenie istotnie zmieniały się w czasie. Interesujący jest fakt, iż natywne związki obecne były w PMR w stężeniu niższym niż w osoczu krwi, co może wskazywać na a) niższą zdolność do przenikania przez barierę krew-PMR związków natywnych w porównaniu do ich metabolitów, b) natychmiastowy metabolizm natywnych antocyjanów przez komórki bariery, c) hydrolizę natywnych glikozydowych pochodnych antocyjanów w komórkach bariery krew-PMR. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, iż w PMR występują głównie metabolity II fazy. Rzeczywiste chwilowe stężenie antocyjanów i ich metabolitów II fazy w PRM może kształtować się w wyniku zmian stężenia tych związków w osoczu krwi, procesów napływu i wypływu przez barierę krew-PMR oraz intensywności i kierunku metabolizmu w komórkach barierowych.

Kolejna praca wchodząca w skład dysertacji dotyczy zdolności antocyjanów i ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-PMR po dożwaczowym podaniu owcom preparatu z kapusty czerwonej. Podobnie jak poprzednio, pierwszym krokiem była charakterystyka jakościowo-ilościowa związków antocyjanowych kapusty czerwonej.

Doktorantka wykazała, iż podstawową strukturą antocyjanów występujących w tym warzywie jest nieacylowana forma Cy3diG5G, która stanowiła 10,3% całkowitej zawartości antocyjanów. 89% stanowiły natomiast mono- i di-acylowane pochodne Cy3diG5G (osiemnaście form). Z uwagi na unikalny profil antocyjanów kapusta czerwona jest naturalną matrycą umożliwiającą zbadanie zależności między występowaniem acylacji w strukturach antocyjanów a procesami zachodzącymi w organizmie po ich spożyciu. Próba wyjaśnienia tego zagadnienia bardzo podnosi wartość poznawczą pracy.

W płynach fizjologicznych owiec zidentyfikowano 34 pochodne antocyjanów. Głównymi natywnymi antocyjanami zidentyfikowanymi w osoczu krwi były Cy3di G5G, Cy 3(sin)(sin)diG5G, 3-(*p*-kumaroilo)-diglukozyd-5-glukozyd cyjanidyny oraz Cy3(sin)diG5G, a ich najwyższe stężenia wykryto po 1,5-2,5 godziny od podania preparatu. Pochodne nieacylowane stanowiły ponad 25%, a pochodne acylowane prawie 75% wszystkich antocyjanów natywnych występujących w osoczu krwi. Przewagę pochodnych natywnych zaobserwowano po 0,5-4 h po podaniu, w drugim okresie (4,5h) odnotowano podobny udział natywnych antocyjanów i ich metabolitów II fazy, natomiast po 5-10 h po podaniu ponad 87% antocyjanów występowało w postaci metabolitów II fazy. Po 10 godzinach od podania preparatu stężenie antocyjanów w osoczu krwi owiec wyniosło 17.03 nmol/L w porównaniu do maksymalnego stężenia 45.89 nmol/L zaobserwowanego po 7,5 h po podaniu preparatu.

Pochodne nieacylowane stanowiły około 40%, natomiast acylowane prawie 60% związków natywnych występujących w moczu owiec. Dominującymi formami były związki deglukozylowane (95%) i glukuronidowane (82%). Formy metylowane stanowiły 46% a siarczanowane 1%. Podobnie jak w przypadku osocza krwi, w moczu owiec ujawniono trzy stadia o odmiennym stosunku form natywnych do metabolitów II fazy. Antocyjany natywne w przewodzie występowały do 3 h po podaniu preparatu, później dominowały metabolity II fazy. Wykazano, iż kształt, zakres i profil wydalania antocyjanów z moczem w znacznym stopniu odzwierciedla dane opisane dla osocza krwi. Co więcej, podobne zjawisko zaobserwowano po podaniu preparatu z aronii.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż po raz pierwszy opisano obecność 12 pochodnych cyjanidyny w PMR owiec po dożwaczowym podaniu kapusty czerwonej. Co ciekawe, w PMR wykryto tylko jeden związek natywny – Cy3G5G. Nie znaleziono natomiast w nim Cy3diG5G oraz acylowanych pochodnych cyjanidyny. Spośród 17 metabolitów fazy II (pochodnych cyjanidyny) zidentyfikowanych w osoczu krwi, aż 11 wykryto również w PMR, przy czym ich profil i stężenie zmieniały się istotnie w czasie. Zarówno w osoczu krwi jak i w PMR najczęściej przeważały pochodne deglukozylowane, następnie metylowane oraz glukuronowane. Analizując otrzymane wyniki Doktorantka poddaje pod dyskusję dwa możliwe wyjaśnienia tego stanu rzeczy konkludując, iż acylowane pochodne cyjanidyny nie miały możliwości przeniknięcia przez barierę krew-PMR, podczas gdy związki nieacylowane swobodnie ją pokonywały. Podsumowując stwierdza, iż tylko nieacylowane pochodne antocyjanów były obecne w PMR, co jednoznacznie wskazuje na fakt, iż bariera krew-PMR jest selektywna dla poszczególnych antocyjanów.

Ostania z prac wchodzących w skład Dysertacji dotyczy badań zawartości 3-galaktozydy cyjanidyny oraz 3-diglukozydu cyjanidyny i ich metabolitów II fazy w płynach fizjologicznych owiec. Po dożylnym podaniu mieszaniny tych związków zidentyfikowano 19 pochodnych. Maksymalne stężenia pochodnych cyjanidyny we wszystkich badanych płynach fizjologicznych wystąpiło w ciągu 2 godzin od podania preparatu. Uzyskane wyniki wykazały, iż pochodne cyjanidyny obecne w osoczu krwi, moczu i PMR były reprezentowane głównie przez metabolity II fazy. Za szczególnie wartościowe uważam dane dotyczące możliwych ścieżek biotransformacji związków natywnych i porównanie zdolności 3-galaktozydu cyjanidyny i 3-diglukozydu 5-glukozydu cyjanidyny oraz ich metabolitów II fazy do przenikania przez barierę krew-PMR. Ta część pracy potwierdza dużą wiedzę Doktorantki oraz jej wyjątkową wnikliwość. Na szczególne podkreślenie zasługuje wręcz imponująca umiejętność Doktorantki dokonywania twórczej analizy i syntezy istniejącej wiedzy, wnikliwej dyskusji, stawiania problemów i formułowanie ich prawdopodobnych wyjaśnień. Właśnie dyskusję wyników badań uważam za najbardziej wartościową część przedstawionej do oceny Dysertacji, wskazuje ona bowiem na dużą dojrzałość naukową oraz perfekcyjne opanowanie warsztatu naukowego przez tak młodą osobę jaką jest pani mgr Natalia Płatosz.

Praca podsumowana jest dziewięcioma wnioskami, z których większość logicznie wynika z przeprowadzonych badań. Zastrzeżenia budzą dwa wnioski – pierwszy i ostatni. Wniosek nr 1 stwierdzający iż aronia i kapusta czerwona są bogatym źródłem antocyjanów jest zbyt lakoniczny i nie wnosi wartości do Dysertacji. Fakt ten jest znany od lat i nie wymaga przeprowadzania badań zawartych w ocenianej pracy. Bez szkody dla całości rozprawy mógłby zostać pominięty, ewentualnie doprecyzowany – przykładowo – aronia i czerwona kapusta są bogatym źródłem biodostępnych antocyjanów zdolnych do przenikania bariery krew-mózg i krew PRM w badaniach modelowych.

Wniosek 9 nie wynika z badań przeprowadzonych przez Doktorantkę i nie znajduje odzwierciedlenia w żadnej z opublikowanych prac; nie potwierdziła Ona właściwości przeciwutleniającej zarówno związków natywnych jak i ich metabolitów występujących w badanych płynach fizjologicznych owiec. Oczywiście stwierdzenie zawarte we wniosku jest prawdopodobne, jednak żadnym miejscu dysertacji nie poruszono tematyki aktywności przeciwutleniającej, więc opiera się tylko na przesłankach literaturowych.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Natalii Płatosz pt. „Przenikanie antocyjanów aronii i kapusty czerwonej oraz ich metabolitów przez barierę krew-płyn mózgowordzeniowy w badaniach modelowych na owcach” stanowi oryginalne

rozwiązanie problemu badawczego i spełnia wymagania stawiona rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.), zgodnie z ustawą dnia 20 lipca 2018 roku. Zgodnie z przepisami wprowadzającymi – *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20-go września 2018 roku. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin artystycznych. Zwracam się zatem do Rady Naukowej Rady Naukowej IRZiBŻ PAN w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr Natalii Płatosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Andrzej Górecki-Dzieli