Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej
Pani mgr inż. Agaty Durak-Dados
pt. „Interakcje bioaktywnych składników kawy i wybranych dodatków funkcjonalnych jako czynnik modyfikujący potencjalną aktywność biologiczną.”,
wykonanej w Katedrze Biochemii i Chemii Żywności
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
promotor prof. nadzw. UP dr hab. Urszula Gawlik-Dziki,
promotor pomocniczy dr hab. Michał Świeca

W wielu środowiskach (w tym również wśród naukowców) trudno wyobrazić sobie efektywne funkcjonowanie bez tzw. „małej czarnej”, pitej na różne sposoby, zależnie od indywidualnych preferencji nie tylko smakowych. Jej dobrze znane i naukowo potwierdzone efekty psychostymulujące sprawiają, że codziennie spożywa ją niemal 90% populacji osób dorosłych. Wokół szkodliwości picia kawy (łączonej głównie z obecnością kofeiny i związków diterpenowych). jak również potencjalnych walorów prozdrowotnych tego napoju narosło wiele mitów i nieporozumień.

Dane piśmiennictwa dotyczące związku pomiędzy piciem kawy a ryzykiem wystąpienia chorób nowotworowych i choroby wieńcowej są sprzeczne i niejednoznaczne. Z opublikowanych ostatnio badań prospektywnych przeprowadzonych metodą metaanalizy wynika wręcz, że takiego związku nie ma. Powszechnie obserwowany brak spójności wyników badań epidemiologicznych i klinicznych w tym zakresie może wskazywać na udział innych czynników nie związanych z kofeiną na obserwowane efekty zdrowotne związane z piciem kawy, jak np. czynniki genetyczne, indywidualna wrażliwość organizmu, stan fizjologiczny, rozwój tolerancji organizmu na przyjmowane wraz z kawą składniki aktywne, wpływ czynników środowiskowych, jak również możliwość występowania interakcji poszczególnych składników kawy z innymi substancjami obecnymi w pożywieniu, co z kolei może wpływać na ich biodostępność i aktywność biologiczną. Ponadto często zapomina się, że kawa jako produkt naturalny pochodzenia roślinnego poza kofeiną zawiera szereg innych składników, którym przypisuje się wielokierunkowe oddziaływanie na zdrowie. Do takich składników niewątpliwie należą polifenole roślinne, znane ze swojej aktywności antyoksydacyjnej i prewencyjnej w tzw. chorobach cywilizacyjnych, w tym krążeniowych i nowotworowych.

W tym kontekście podjęta przez Autorkę tematyka badań wychodzi na przeciw oczekiwaniom konsumenta, jest interesująca i potrzebna. Praca ma znamiona badań podstawowych stanowiących próbę wyjaśnienia wzajemnych interakcji polifenoli obecnych w kawie z innymi substancjami roślinnymi z tej grupy zawartymi w popularnych przyprawach roślinnych takich jak imbir, cynamon, kardamon i chili stosowanych nie tylko jako dodatki smakowe i aromatyzujące do napoju ale także z uwagi na ich potencjalne właściwości prozdrowotne w celu ewentualnej fortyfikacji pozytywnych efektów oddziaływania kawy na organizm ludzki.

W celu weryfikacji przyjętej hipotezy badawczej w pracy zastosowano procedurę polegającą na analizie profili polifenolowych analizowanych ekstraktów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (UPLC/MS). Uzyskane wyniki pozwoliły na identyfikację związków dominujących w poszczególnych ekstraktach, w oparciu o które tworzono układy modelowe dla każdego z analizowanych surowców roślinnych, w celu wykrycia ewentualnych różnic w aktywności pojedynczych związków wzorcowych oraz ich naturalnych odpowiedników obecnych w kompletnej żywności, a także weryfikacji ewentualnego wpływu matrycy żywności i/lub zmian w niej zachodzących podczas procesu trawienia na obserwowaną aktywność biologiczną.

Badania przeprowadzono na ekstraktach z kawy palonej oraz z wybranych przypraw o stężeniu 50mg/ml, analizując je osobno oraz w odpowiednich kombinacjach ilościowych (v/v).

Prowadzono trawienie każdej próby w symulowanym przewodzie pokarmowym według metody opracowanej wcześniej przez Gawlik-Dziki i wsp (2012). Spektrofotometrycznie oznaczano wielokierunkową aktywność antyoksydacyjną poszczególnych prób: tj. aktywność przeciwrodnikową wobec ABTS wg Re i wsp. (1999), siłę redukcji wg Oyaizu (1986), zdolność do chelatowania jonów przejściowych wg. Guo i wsp. (2001), zdolność do neutralizacji rodników hydroksylowych wg Su i wsp. (1997) i ponadtlenkowych wg Liu i wsp. (1997) a także zdolność do hamowania aktywności enzymów pro-oksydacyjnych tj. lipooksygenazy LOX wg Axelroad i wsp (1981) i oksydazy ksantynowej OX wg Sweeney i wsp. (2001). W celu oceny interakcji pomiędzy składnikami kawy i dodawanych przypraw przeprowadzono analizę izobolograficzną (Williamson, 2001) uzyskanych wyników oznaczania dla poszczególnych typów aktywności biologicznej analizowanych prób. Kształt krzywej na wykonanych dla każdego dodatku do kawy wykresach oraz wartość obliczonego współczynnika interakcji IF pozwalały na wnioskowanie o występowaniu lub braku interakcji pomiędzy analizowanymi składnikami w zakresie każdej badanej aktywności.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pod względem formalnym stanowi zwięzłe omówienie przeprowadzonych badań w ramach spójnego tematycznie cyklu czterech prac opublikowanych w latach 2014-2017, o łącznym współczynniku oddziaływania IF 9,378 (115 MNiSW), których dane bibliograficzne wymieniono poniżej:

Publikacja I: Durak A., Gawlik-Dziki U., Pecio Ł. Coffee with cinnamon - impact of phytochemicals interactions on antioxidant and anti-inflammatory in vitro activity. Food Chem. 162, 81-88.(IF 3,391, MNiSW 40)

Publikacja II: Durak A. Gawlik-Dziki U. Kowalska I.. Coffee with ginger - interactions of biologically active phytochemicals in the model system. 2015, 166, 261-269. (IF 4,052, MNiSW 40)

Publikacja III: Durak A., Gawlik-Dziki U., Kowalska I.: Evaluation of interactions between coffee and cardamom, their type, and strength in relation to interactions in a model system. CyTA- Journal of Food, 2017, 15(2), 266-276.(IF 1,18, MNiSW 20)

Publikacja IV: Durak A., Kowalska I., Gawlik-Dziki U. UPLC – MS Method for Determination of Phenolic Compounds in Chili as a Coffee Supplement and Their Impact of Phytochemicals Interactions on Antioxidant Activity In Vitro. Acta Chromatographica, 2017, http://dx.doi.org/10.1556/1326.2016.00173 (IF 0,755, MNiSW 15)

Należy podkreślić, że we wszystkich pracach doktorantka jest pierwszym autorem, co jednoznacznie wskazuje na wiodącą rolę jaką odegrała w przygotowaniu prac do druku.

Omówienie przeprowadzonych w ramach powyższych prac badań obejmuje 86 stron i zawiera: Wykazy prac Doktorantki, ze szczególnym uwzględnieniem prac stanowiących rozprawę, Spis treści, Streszczenia w języku polskim i angielskim (str. 8-16), Wstęp (str. 17-25), Cel pracy, Materiał i metody (str. 27-29), Omówienie i dyskusję wyników (str. 30-36), Podsumowanie (str. 37-38), Wnioski oraz Piśmiennictwo. Do pracy dołączono także cztery oświadczenia (str. 45-48) potwierdzające indywidualny wkład pracy wszystkich współautorów w przygotowanie poszczególnych publikacji do druku. Należy podkreślić, że procentowy udział Doktorantki w tym zakresie kształtuje się na poziomie 70-80% we wszystkich pracach, co jednoznaczne świadczy o jej dominującej roli podczas powstawania publikacji zwłaszcza w obszarze realizacji badań laboratoryjnych, opisie i analizie wyników oraz redakcji manuskryptów.

Praca zawiera także wykaz i kopie czterech publikacji (str. 49-86), stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Niestety dołączone skany publikacji są niezbyt czytelne co utrudniało ich lekturę.

We Wstępie (9 stron), mającym charakter krótkiego wprowadzenia w problematykę badawczą Doktorantka omawia znaczenie stresu oksydacyjnego w organizmie, rolę enzymów pro-oksydacyjnych takich jak lipooksygenaza oraz oksydaza ksantynowa w powstawaniu wolnych rodników oraz uszkodzeń oksydacyjnych prowadzących do zmian patologicznych odpowiedzialnych za niektóre choroby cywilizacyjne. Następnie krótko charakteryzuje składniki dietetyczne żywności z grupy fenolokwasów jako substancje

wspomagające naturalną obronę antyoksydacyjną organizmu. Opisuje także przyprawy, stanowiące źródło aktywnych biologicznie substancji (w tym fenolokwasów), które stosowała w badaniach jako środki wzbogacające skład kawy. Na zakończenie wstępu Doktorantka analizuje zagadnienia wzajemnych interakcji polifenolowych składników ekstraktów roślinnych oraz ich biodostępności warunkującej aktywność biologiczną, wykazując brak jednoznacznych i kompleksowych badań w tym zakresie.

Przedstawione w tej części treści świadczą o bardzo dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktorantki do prowadzonych badań, aczkolwiek niektóre zagadnienia omówiono w sposób zbyt pobieżny i lapidarny. Z uwagi na charakter wprowadzający tej części pracy korzystniejsze z punktu widzenia potrzeby uporządkowania treści w rozdziale byłoby opisanie go jako „Wprowadzenie" i wyodrębnienie podrozdziałów stanowiących zwięzłą charakterystykę poruszanych zagadnień. W części tej występują także pewne niedociągnięcia stylistyczne i niefortunne sformułowania oraz nieprawidłowe zwroty, jak np. cyt.1 „Cynamon może działać jako czynnik naśladujący insulinę, nasilający działanie insuliny lub stymulujący komórki metabolizmu glukozy" (s. 20), cyt.2 „roślina ta może stać się uzupełnieniem w leczeniu cukrzycy"(s. 20), cyt.3. „W badaniach na myszach doszli do wniosku..." (s.20), cyt. 4 „Imbir jako naturalny lek o wielowymiarowym działaniu"(s.20),cyt.5 „Najczęściej wykorzystuje się ekstrakty będące mieszanką kilku roślin"(s.23) – zapewne chodzi o połączone ekstrakty pozyskane z kilku gatunków roślin itd.
Sprecyzowania też wymaga pozycja systematyczna roślin, z których otrzymuje się przyprawę o nazwie kardamon. Cyt. 6 „Kardamon należy do rodzajów Elettaria i Amomum "i dalej „obie formy mają..." (s. 21), „stręki Amomum są duże..." (s.21), „Głównymi składnikami kardamonu są związki olejowe"(s.21). Zastosowana tu terminologia botaniczna i fitochemiczna wymaga poprawy. Z uwagi na zróżnicowany skład chemiczny gatunków, z których pozyskiwany jest kardamon jako przyprawa niezwykle istotna jest precyzyjna identyfikacja pod względem botanicznym materiału badawczego w pracy.

W kolejnym rozdziale zgodnie z tytułem Doktorantka przedstawia materiały i metody stosowane w pracy, omawia i szeroko dyskutuje osiągnięte wyniki na tle danych literaturowych, zwięźle podsumowując badania i prawidłowo formułując wnioski końcowe.

Najważniejszym osiągnięciem naukowym pracy doktorskiej Pani Agaty Durak-Dados jest w zakresie badań fitochemicznych określenie po raz pierwszy profili polifenolowych ekstraktów wodnych z czterech przypraw stosowanych m.in. jako dodatki do kawy. Natomiast w zakresie badań aktywności biologicznych, godnym podkreślenia jest fakt przeprowadzenia po raz pierwszy tak szerokich, wielokierunkowych i pracochłonnych badań aktywności przeciwutleniających kawy i ekstraktów z analizowanych przypraw. Po raz pierwszy również analizowano metodami statystycznymi pozyskane dane fitochemiczne i biologiczne w celu określenia ewentualnych interakcji pomiędzy poszczególnymi składnikami w dobranych wcześniej układach modelowych. Uzyskane w tym względzie wyniki

potwierdziły wielokierunkową aktywność biologiczną, zwłaszcza przeciwutleniającą analizowanych ekstraktów, oraz ich wpływ na aktywność kawy, potwierdzając celowość poszukiwania tego typu rozwiązań w celu fortyfikacji dodatkami funkcjonalnymi często spożywanych produktów spożywczych, co może nieść ze sobą dodatkowe korzyści poprzez zastosowanie w profilaktyce tzw. chorób cywilizacyjnych.Wszystkie badania zostały przeprowadzone za pomocą nowoczesnych metod analitycznych.

Treść rozprawy oraz poszczególnych publikacji wskazują na wysokie zdolności intelektualne Autorki w zakresie sformułowania zarówno koncepcji badawczej jak również rozwiązywania zarysowanych problemów naukowych poprzez umiejętne zaplanowanie doświadczenia i zastosowanie odpowiedniej metodyki umożliwiającej pozyskanie danych laboratoryjnych a następnie prawidłową interpretację tych danych. Autorka niewątpliwie wykazała się umiejętnością prowadzenia wielokierunkowych i zróżnicowanych eksperymentów badawczych, co wskazuje na jej dobre przygotowanie do prowadzenia samodzielnych badań naukowych.

Zdaniem recenzenta przedstawione w Omówieniu wyników badań (str 31) dane metodyczne dotyczące warunków rozdziału i zasad identyfikacji związków metodą LC MS powinny być przeniesione do rozdziału Materiały i metody. W części tej brakuje również wzmianki o innych metodach stosowanych w badaniach np. o sposobie oznaczania całkowitej zawartości substancji polifenolowych. Uwagi te mają charakter techniczny i nie wpływają na ocenę merytoryczną pracy.

Wykaz piśmiennictwa obejmuje 57 pozycji literaturowych, głównie anglojęzycznych i nowych z okresu ostatnich pięciu lat. Sposób wykorzystania piśmiennictwa świadczy o dobrym zrozumieniu tematyki badawczej oraz wskazuje na odpowiednie zaznajomienie się Doktorantki z najważniejszymi osiągnięciami innych autorów w tym zakresie.

Obowiązek recenzenta nakazuje mi ponownie wspomnieć w tym miejscu o kilku drobnych usterkach zauważonych w tym rozdziale jak brak konsekwencji w sposobie cytowania piśmiennictwa w tekście np. na str. 17 cytowana pozycja przywołuje nazwiska wszystkich czterech autorów zamiast zastosować przyjętą w pracy zasadę podawania w takiej sytuacji pierwszego autora tj. Uttara i in. 2009. Występuje brak w wykazie piśmiennictwa pozycji Gruenwald i in. 2010 cytowanej w treści pracy na stronie 20., Z kolei pozycja literaturowa Rein i wsp.(2012) jest umieszczona w wykazie piśmiennictwa dwukrotnie.

Chciałam podkreślić, że rozprawa ma poprawny układ i strukturę oraz napisana jest poprawnym językiem a dostrzeżone nieliczne błędy i niedociągnięcia redakcyjne nie podważają tej opinii i nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

Ocena końcowa pracy

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agaty Durak-Dados stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu, posiada elementy nowości

naukowej, a uzyskane w niej wyniki znacząco wzbogacają wiedzę na temat składu chemicznego, aktywności biologicznej i możliwych interakcji substancji polifenolowych z ekstraktów wodnych z kawy i ekstraktów z wybranych przypraw stosownych jako dodatki smakowe i prozdrowotne.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska całkowicie spełnia warunki stawiane przez obowiązująca ustawę dla tego rodzaju opracowań. Z uwagi na wartość i znaczenie otrzymanych wyników wnioskuję o jej wyróżnienie .

. Proszę zatem Wysoką Radę Wydziału Nauk Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Agaty Durak-Dados do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
dr hab. Renata Nowak

Lublin, 2017-08-29