

**Prof. dr hab. Mieczysław Obiedziński**

02-549 Warszawa, ul. Madalińskiego 67bm8

## **RECENZJA**

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Aleksandry Golonko**

pt. „Wpływ modyfikacji struktury na właściwości fizykochemiczne i biologiczne wybranych naturalnych bioaktywnych związków fenolowych mających znaczenie w żywieniu człowieka „zrealizowanej w Instytucie Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowym Instytucie Badawczym pod kierunkiem prof. dr hab. Włodzimierza Lewandowskiego, promotor pomocniczy – dr inż. Katarzyna Kycia

## **FORMALNA OCENA PRACY**

Rozprawa doktorska **mgr inż. Aleksandry Golonko** dotyczy próby zbadania wielowątkowego zagadnienia dotyczącego modyfikacji strukturalnych związków fenolowych – głównie flawonoidów – w kontekście ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych istotnych dla żywienia człowieka oraz terapii przeciwnowotworowej.

Tematyka rozprawy jest aktualna, oryginalna i wpisuje się w światowe trendy badań nad żywnością funkcjonalną, nutraceutykami i chemią bioaktywnych składników roślinnych, a przedstawione wyniki mają wymiar zarówno poznawczy, jak i aplikacyjny dla dyscypliny technologia żywności i żywienia.

Zakres badań realizowanych w pracy nadaje jej charakter interdyscyplinarny, której celem było zbadanie zależności między strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną wybranych flawonoidów (resweratrol, kwercetyna, kaempferol, chryzyna, apigenina, mirycetyna) oraz ich kompleksów z jonami metali (m.in.  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ), ze szczególnym uwzględnieniem ich aktywności antyoksydacyjnej i cytotoksycznej.

Aby osiągnąć założony cel badawczy oraz zweryfikować postawione hipotezy badawcze, doktorantka w sposób metodycznie poprawny przeprowadziła serię badań, w których zastosowała szerokie spektrum metod:

- analiz spektrofotometrycznych (widmowych) (UV-Vis, FT-IR) kompleksów flawonoidów z metalami;
- obliczeń kwantowo-mechanicznych (DFT, B3LYP/6-31G(d,p)) w celu określenia energii HOMO-LUMO, potencjałów redoks, gęstości ładunku elektronowego i funkcji Fukui;

- badań biologicznych – testy cytotoksyczności na liniach komórkowych MCF-7 i MDA-MB-231, ocena wpływu na genotoksyczność i indukcję apoptozy;
- deskryptorów biodostępności w warunkach in vitro (TPSA, LogP, reguła Lipińskiego) oraz modelowanie zdolności przenikania przez błony biologiczne.

Zastosowana metodologia jest poprawna, nowoczesna i dobrze uzasadniona. Połączenie stosowanych metod chemii teoretycznej, badań spektroskopowych i testów biologicznych pozwoliło na uzyskanie spójnego obrazu mechanizmów działania badanych związków.

## **STRUKTURA I UKŁAD PRACY**

Rozprawa ma charakter hybrydowy – obejmuje cykl sześciu publikacji w czasopismach z listy JCR o łącznym IF 32,7 oraz część niepublikowaną zawierającą wyniki własne. Rozprawa jest bardzo obszernym opracowaniem (ponad 130 stron zasadniczej treści). Składa się z:

- streszczenia w języku polskim i angielskim (str. 8),
- części przeglądowej (aktualna wiedza, str. 12–30),
- celów, hipotez i zadań badawczych (str. 31–35),
- części teoretycznej i eksperymentalnej (str. 36–49),
- części metodycznej (str. 50–64)
- części wyników opublikowanych (str. 65–89),
- części wyników nieopublikowanych (str. 90–129),
- podsumowania obejmującego dyskusję wyników i weryfikację hipotez badawczych (str. 130 – 135)
- wniosków (str. 136)
- oraz bogatej bibliografii (łącznie ponad 200 pozycji).

Układ pracy jest logiczny, zachowuje ciąg przyczynowo - skutkowy i pozwala na łatwe śledzenie toku badań, chociaż należy zwrócić uwagę, że:

- część literaturowa miejscami przyjmuje formę streszczenia źródeł, zamiast ich krytycznej analizy. Tekst rozprawy miejscami jest “nadmiernie przeładowany”, a opisy metod powtarzają się (np. rozdz. 6.3 i 7.3) - skrócenie tych fragmentów znacznie poprawiłoby klarowność tego dość obszernego opracowania;
- w treści rozprawy warto byłoby dodać syntetyczny schemat mechanizmów działania flawonoidów w kontekście redoks-homeostazy – co znacznie ułatwiłoby późniejszy opis i zrozumienie uzyskanych wyników;
- ze względu na hybrydowy charakter rozprawy należałoby bardziej precyzyjnie wskazać indywidualny wkład doktorantki w publikacje współautorskie – co prawda jest on

podawany przy każdej publikacji, jednak jako praca mająca stanowić podstawę do nadania stopnia doktora, opis mógłby być jeszcze bardziej szczegółowy;

- w opisie metod obliczeniowych (B3LYP/6-31G(d,p)) brakuje uzasadnienia wyboru tej metody i porównania z innymi możliwymi funkcjonalami (np. M06-2X);
- wyniki badań cytotoksyczności nie zawierają szczegółowej analizy ograniczeń metody, np. wpływu rozpuszczalników organicznych na komórki modelowe;
- w części dotyczącej testów spektrofotometrycznych nie przedstawiono błędów pomiarowych ani testów istotności statystycznej, co z kolei osłabia wymowę uzyskanych wyników;
- bibliografia mogłaby być jednolicie sformatowana (część pozycji ma różny styl cytowania i formatowania); niewykorzystane są pozycje z najnowszej literatury (lata 2023–2024).

Ponadto należy zauważyć, że integracja wyników obliczeniowych i doświadczalnych mogłaby być pogłębiona poprzez przedstawienie korelacji statystycznych między parametrami teoretycznymi i biologicznymi. Z kolei w dyskusji wyników warto byłoby pogłębić syntetyczne porównanie uzyskanych wyników z wcześniej opublikowanymi wynikami różnych autorów.

Wnioski aplikacyjne, mimo że interesujące, mają jednak charakter bardzo ogólny, a brak konkretnych przykładów wykorzystania wyników w technologii żywności funkcjonalnej. Uwagi te mają jednak charakter redakcyjny i nie wpływają na wartość naukową pracy, warto je jednak wziąć pod uwagę przy redagowaniu kolejnych publikacji.

## OCENA MERYTORYCZNA I ORYGINALNOŚĆ UZYSKANYCH REZULTATÓW

Autorka wykazała wysoki poziom samodzielności badawczej oraz bardzo dobrą znajomość zagadnień z zakresu chemii fizycznej, biochemii i biotechnologii żywności. Uzyskane wyniki wskazują na wyraźny wpływ modyfikacji strukturalnych na potencjał redoks, stabilność kompleksów oraz aktywność antyoksydacyjną badanych związków. Opracowano także zależności pomiędzy energią przerwy HOMO-LUMO a aktywnością biologiczną flawonoidów.

Z punktu widzenia badanych zagadnień praca wnosi istotny wkład poznawczy w zrozumienie relacji struktura–aktywność naturalnych związków fenolowych. Wyniki mają potencjał aplikacyjny również o charakterze interdyscyplinarnym, a szczególnie w technologii żywności, farmakologii i nutrigenomice.

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe wynikające z realizacji wcześniej zaplanowanych przez Doktorantkę zadań badawczych można uznać:

- wykazanie, że modyfikacje strukturalne flawonoidów i ich kompleksowanie z jonami  $Zn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  zwiększają aktywność antyoksydacyjną i cytotoksyczną związków,
- zidentyfikowanie korelacji między wartościami eGAP i aktywnością redoks,

- zastosowanie modeli teoretycznych do przewidywania biodostępności flawonoidów,
- zaproponowanie wykorzystania zmodyfikowanych flawonoidów w żywności funkcjonalnej wspomagającej terapię onkologiczną.

Jako recenzent stwierdzam jednak, że Doktorantka nie uniknęła pewnych błędów i “niedociągnięć” w generowaniu wyników, ich prezentacji i opisywaniu. Co prawda nie mają one większego wpływu na końcową, merytoryczną ocenę pracy, niemniej jednak poniżej przedstawiam słabe i mocne strony rozprawy.

## **MOCNE STRONY ROZPRAWY**

- 1) **Spójność i interdyscyplinarność podejścia** – Doktorantka bardzo dobrze połączyła trzy obszary: chemię teoretyczną (DFT), analizę fizykochemiczną (spektroskopia, analiza kompleksów metalicznych) oraz badania biologiczne (cytotoksyczność, genotoksyczność). To podejście pozwoliło uzyskać pełny obraz zależności między strukturą a funkcją związków fenolowych. Dużą zaletą jest konsekwentne prowadzenie tego wątku od hipotezy po wnioski.
- 2) **Zastosowanie zaawansowanych metod obliczeniowych** - obliczenia HOMO–LUMO, eGAP, BDE, funkcji Fukui i analizy NPA wykonano z wykorzystaniem poprawnych podstaw i funkcjonału B3LYP, co umożliwiło jakościową interpretację reaktywności i stabilności badanych ligandów. Wyniki te dobrze korelują z obserwacjami biologicznymi – np. niższe eGAP odpowiada większej aktywności antyoksydacyjnej.
- 3) **Wyniki biologiczne o dużym znaczeniu praktycznym** - Doktorantka wykazała, że tworzenie kompleksów flawonoidów z jonami  $Zn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  istotnie zwiększa ich stabilność i aktywność antyoksydacyjną oraz potencjał cytotoksyczny wobec komórek MCF-7 i MDA-MB-231. To ważny wniosek aplikacyjny, wpisujący się w trend poszukiwania bioaktywnych składników żywności funkcjonalnej.
- 4) **Wysoki poziom publikacyjny wyników** - znacząca część wyników została opublikowana w renomowanych czasopismach JCR (m.in. Eur. J. Med. Chem., Cell Death & Disease, IJMS), co dowodzi ich jakości i wartości poznawczej.
- 5) **Oryginalność tematu** - połączenie badań nad flawonoidami z modelowaniem ich właściwości redoks i cytotoksycznych w kontekście żywności funkcjonalnej jest w polskich warunkach badawczych rozwiązaniem nowatorskim. Wyniki mogą stanowić punkt wyjścia dla dalszych projektów nad nutraceutykami.

## **SŁABE STRONY I OGRANICZENIA WYNIKÓW**

- 1) Ograniczona analiza błędów i istotności statystycznej - w wielu tabelach i wykresach nie podano odchyłeń standardowych ani poziomów p, co utrudnia ocenę wiarygodności różnic między badanymi układami. W pracy brak także opisu liczby powtórzeń biologicznych. Wnioski jakościowe są przekonujące, ale ilościowo nie w pełni potwierdzone.
- 2) Brak porównania metod obliczeniowych - wszystkie wyniki DFT oparto na jednym funkcyjale (modelu) (B3LYP). Brakuje choćby skrótowej analizy wrażliwości wyników na wybór metody i podstaw. Porównanie z innymi modelami (np. M06-2X) zwiększyłoby wiarygodność obliczeń redoks-owych.
- 3) Niewystarczające połączenie danych teoretycznych z biologicznym - choć autorka wskazuje na zależność między eGAP a aktywnością antyoksydacyjną, korelacje te nie zostały przedstawione ilościowo (np. regresje,  $r^2$ ). Brak analizy statystycznej utrudnia ocenę siły tej zależności.
- 4) Ograniczona interpretacja mechanizmu biologicznego - wyniki testów cytotoksyczności są poprawne, ale w dyskusji zabrakło pogłębienia mechanizmu działania – np. czy efekt wynika z generacji ROS, zaburzeń mitochondrialnych, czy interakcji z DNA.
- 5) Brak rozszerzenia o aspekty farmakokinetyczne i toksykologiczne - Doktorantka wspomina o biodostępności, lecz nie prowadzi badań modelujących metabolizm czy dystrybucję w ustroju. To ograniczenie utrudnia praktyczne przełożenie wyników na zastosowania żywieniowe.
- 6) Brak badań in vivo lub złożonych modeli biologicznych - praca opiera się na liniach komórkowych i testach in vitro; nie potwierdzono efektów w bardziej złożonych modelach. To typowe ograniczenie uzasadnione na etapie realizacji rozprawy doktorskiej, ale warto zaznaczyć chociażby w opisie.
- 7) Aspekt praktyczny pozostaje ogólny - choć Doktorantka sugeruje zastosowanie wyników w żywności funkcjonalnej, brak jest konkretnych przykładów formuł produktów, metod enkapsulacji lub stabilizacji związków.

W świetle powyższych uwag chciałbym, aby Pani Doktorantka uzupełniła i wyjaśniła kilka następujących kwestii:

1. W pracy zastosowano metodę DFT z modelem B3LYP i bazą 6-31G(d,p). Jakie były główne przesłanki wyboru właśnie tego modelu obliczeniowego? Czy rozważała Pani inne warianty metody DFT (np. M06-2X lub CAM-B3LYP) i jak mogłyby one wpłynąć na dokładność obliczeń HOMO-LUMO i energii wiązań?
2. W badaniach cytotoksyczności flawonoidów i ich kompleksów z jonami metali uzyskała Pani istotne różnice między liniami MCF-7 i MDA-MB-231. Jak Pani interpretuje te różnice – czy wynikają one głównie z odmiennych profili receptorowych komórek, czy z właściwości badanych kompleksów?
3. Jakie konkretne strategie technologiczne widzi Pani jako najbardziej obiecujące dla zwiększenia biodostępności zmodyfikowanych flawonoidów w produktach żywności

funkcjonalnej? Czy rozważała Pani formy enkapsulacji lub zastosowanie nośników lipidowych?

4. Jak Pani zdaniem można byłoby rozwinąć uzyskane wyniki w kierunku praktycznego wykorzystania w terapii wspomagającej nowotwory lub w projektowaniu nutraceutyków? Jakie byłyby kolejne kroki badawcze po uzyskaniu stopnia doktora?

## **DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTKI**

Na dzień złożenia rozprawy doktorskiej Doktorantka wykazała:

- 17 publikacji z listy JCR (w tym 6 pierwszoautorskich, IF 64,07, 1980 pkt MNiSW),
- 10 publikacji spoza JCR,
- 518 cytowań (Google Scholar, h-index 11),
- kierownictwo grantu Diamentowy Grant MNiSW (2019–2023),
- udział w 3 projektach naukowych NCN (OPUS),
- liczne wystąpienia konferencyjne,
- stypendia MNiSW i nagrody naukowe.

Taki dorobek w pełni przekracza wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora.

## **PODSUMOWANIE I WNIOSEK KOŃCOWY**

Rozprawa mgr inż. Aleksandry Golonko stanowi dojrzałe, interdyscyplinarne opracowanie naukowe, poprawna językowo i bogate w treści merytoryczne, a równocześnie łączące chemię, biotechnologię i nauki o żywności i żywieniu.

Badania wykonano z zachowaniem wysokich standardów metodologicznych, a uzyskane wyniki wnoszą oryginalny wkład do wiedzy o modyfikacjach związków fenolowych i ich potencjałe w żywieniu funkcjonalnym.

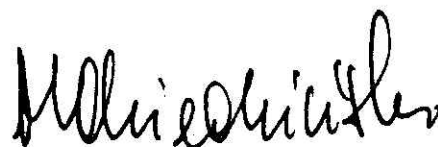
Autorka wykazała się doskonałą znajomością metod obliczeniowych i biologicznych oraz dużą samodzielnością badawczą. Wnioski końcowe są trafne, i choć są nie zawsze przedstawione w sposób wyczerpujący to potwierdzają postawione hipotezy badawcze. Drobne uwagi dotyczą jedynie kwestii redakcyjnych (ujednolicenie cytowań, skrócenie niektórych opisów metod).

Dorobek naukowy doktorantki znacznie przekracza wymagania ustawowe: 17 publikacji JCR (w tym 6 pierwszo-autorskich, IF 64,07, 1980 pkt MNiSW), indeks Hirscha 11, udział w trzech projektach NCN, kierowanie grantem Diamentowy Grant oraz liczne nagrody i stypendia naukowe.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Golonko stanowi dojrzałe, wartościowe i oryginalne opracowanie naukowe, wnoszące istotny wkład w rozwój nauk o żywności i żywienia oraz biotechnologii. Praca spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy

Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 t.j., poz. 1571). W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Golonko do publicznej obrony rozprawy doktorskiej oraz o nadanie jej stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Ponadto biorąc pod uwagę zaprezentowaną powyżej opinię, pomimo zgłoszonych pewnych niedociągnięć, głównie o charakterze redakcyjnym, wnioskuję do Rady Naukowej IBPRS-PIB o wyróżnienie pracy doktorskiej.



Prof. dr hab. inż. Mieczysław Obiedziński