

Prof. Marek Wesołowski
Katedra i Zakład Chemii Analitycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Magdaleny Zając pt.:

Zastosowanie metody anodowej woltamperometrii strippingowej do badania stopnia uwalniania cynku z materiału grzybowego do sztucznych soków trawiennych,
wykonanej w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem promotorów:
dr hab. Włodzimierza Opoki, prof. UJ oraz dr hab. Bożeny Muszyńskiej

Mgr Magdalena Zając zajęła się tematem ciekawym i interesującym z punktu widzenia suplementacji organizmu człowieka w niezbędne składniki mineralne, a polegającym na ocenie przydatności owocników grzybów jadalnych jako potencjalnego źródła Zn w diecie człowieka, wykorzystując w tym celu odpowiednie narzędzia analityczne, w tym różnicową impulsową anodową woltamperometrię strippingową z rtęciową elektrodą o kontrolowanym wzroście kropli w roli elektrody pracującej. Znaczenie tego tematu wynika m.in. z trudnej do przecenienia roli biopierwiastków w prawidłowym funkcjonowaniu organizmów żywych, w tym szczególnie ich wpływu na zdrowie i życie człowieka. Funkcje, jakie pełnią w organizmie człowieka pierwiastki biogenne (O, C, H, N, P, S) są powszechnie znane, podobnie jak znaczenie biologiczne makroelementów (Ca, K, Na, Cl, Mg). Natomiast stosunkowo najmniej wiadomo o roli grupy pierwiastków, do której zakwalifikowano Zn, tj. o mikroelementach. Jest to liczna grupa pierwiastków znajdujących się w organizmie człowieka w śladowych ilościach (Fe, F, Zn, Si, I, Cu, Mn, Cr, Se, B, Mo, Ni, V, Sn, As, Co, Sr i inne), wchodzących najczęściej w skład centrów aktywnych enzymów regulujących wiele funkcji organizmu, występujących w niektórych hormonach (tarczyca) i wiążących się z aminokwasami, a ponadto uczestniczących w różnych etapach syntezy białek.

Liczne doniesienia literaturowe wskazują jednak, że zarówno niedobór jak i nadmiar biopierwiastków może być bardzo niebezpieczny dla człowieka. Dla przykładu, niedobór Zn wywołuje depresję i ataki lękowe, zaburzenia rogowacenia skóry, karłowatość i hipogonadyzm u mężczyzn, a np. odkładanie się Al, Cu lub Fe w mózgu człowieka związane jest z osłabieniem pamięci i chorobą Alzheimera. Ta groźna choroba neurodegeneracyjna dotyka 10% populacji

ludzkiej po 65. roku życia oraz 50% po 80. roku życia, znajduje się też na czwartym miejscu w statystykach obejmujących przyczyny zgonu osób po sześćdziesiątce. Wskazuje to, jak ważnym zagadnieniem jest zbilansowanie codziennej diety człowieka biorąc pod uwagę biodostępne dla organizmu formy pierwiastków śladowych. Z tego względu problematyka badawcza podjęta w rozprawie doktorskiej przez mgr M. Zając jest wielce pożądanym krokiem we właściwym kierunku, może przyczynić się do lepszego poznania powszechnie niedocenianego źródła składników mineralnych dla człowieka, jakim są owocniki grzybów jadalnych. Oszacowanie biodostępnej ilości Zn w badanych produktach naturalnych oraz opracowanie szybkiej i wiarygodnej procedury analitycznej do oznaczania niskich stężeń tytułowego biopierwiastka wnosi istotny wkład do piśmiennictwa światowego w tym temacie, a ponadto może przyczynić się do tego, iż grzyby jadalne będą wymieniane obok tzw. owoców morza – krewetek, ostryg, małży i homarów, jako bogate i jednocześnie wyjątkowo tanie oraz powszechnie dostępne źródło biodostępnego Zn dla organizmów żywych.

Dokonując formalnej oceny przedstawionej do oceny rozprawy należy stwierdzić, iż licząca 135. stron dysertacja posiada układ klasyczny, na który składa się 12. rozdziałów, w tym Wstęp, Cel badań podjętych w ramach pracy doktorskiej oraz Opis badań. Kolejne cztery rozdziały poświęcono przygotowaniu próbek do oznaczania jonów cynku uwolnionego do sztucznych soków trawiennych metodą DP ASV z wybranych gatunków grzybów jadalnych. Przedstawiono w nich wyniki badań uwalniania jonów Zn w temperaturze 25°C z wybranych gatunków grzybów, z nieprzetworzonych i przetworzonych termicznie owocników oraz z kultur *in vitro* *Agaricus bisporus* (pieczarki dwuzarodnikowej). Tę część pracy doktorskiej zamyka Podsumowanie, Piśmiennictwo i półtorastronicowe streszczenia w języku polskim i angielskim. Pisząc ten ważny fragment każdej pracy naukowej, Doktorantka wykazała się umiejętnością zawarcia w bardzo krótkim tekście najważniejszych osiągnięć własnych, kilkuletnich badań naukowych, co wcale nie jest rzeczą łatwą. Właściwą treść pracy poprzedza z kolei strona tytułowa, podziękowania, wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej oraz szczegółowy spis treści.

Kserokopie czterech artykułów będących podstawą rozprawy doktorskiej mgr M. Zając zamieściła w ostatnim, XII rozdziale. Prace te zostały opublikowane bądź przyjęte do druku w międzynarodowych czasopismach naukowych indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports*, tj. w periodykach z tzw. *Impact factor*. Łącznym IF tych prac to 6,421, a punktacja MNiSW wynosi 90. Wysoką ocenę osiągnięć naukowych Doktorantki potwierdza fakt, iż dwie spośród tych prac zostały opublikowane w wydawnictwach o IF powyżej 2, tj. w *LWT – Food Science and Technology* oraz *Polish Journal of Physiology and Pharmacology*, odznaczających się wartościami IF odpowiednio; 2,416 oraz 2,386. Fakt akceptacji do druku części wyników pracy doktorskiej w recenzowanych czasopismach o obiegu międzynarodowym świadczy o wysokim poziomie naukowym tych prac, poprawności merytorycznej i dużym zainteresowaniu tematyką badań. Wobec takiego dorobku publikacyjnego, zadanie Recenzenta staje się swego rodzaju formalnością.

Realizację zasadniczego celu pracy Doktorantka poprzedziła 15. stronicowym wstępem teoretycznym, w którym zwięźle scharakteryzowała instrumentalne narzędzia analityczne wykorzystywane do oznaczania śladowych ilości biopierwiastków w materiale biologicznym, w tym w grzybach wieloowocnikowych oraz wykazała się wiedzą o ważniejszych pierwiastkach obecnych w owocnikach grzybów jadalnych i odznaczających się działaniem prozdrowotnym. Spośród zaawansowanych technik analitycznych wymieniła absorpcyjną (AAS) i emisyjną (AES) spektrometrię atomową, emisyjną spektrometrię atomową ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-AES) i w zestawieniu ze spektrometrem mas (ICP-MS), atomową spektrometrię fluorescencyjną (AFS), a ponadto neutronową analizę aktywacyjną (NAA) oraz anodową (ASV) i katodową (CSV) woltamperometrię stripingową. Charakteryzując te techniki zwracała szczególną uwagę na możliwość wykonania analizy wielopierwiastkowej, granicę wykrywalności, selektywność oraz objętość próbki konieczną do analizy. Wykazała, że spośród omawianych technik, wyjątkowo dużą przydatnością do oznaczania niskich stężeń jonów Zn uwolnionych w różnych warunkach eksperymentu do sztucznych soków trawiennych odznacza się różnicowa impulsowa anodowa woltamperometria stripingowa (DP ASV), z uwagi na niską granicę wykrywalności, wysoką odporność na obecność interferentów i możliwość wykonania analizy w objętości próbki rzędu kilku – kilkudziesięciu mikrolitrów.

Odrębne podrozdziały Doktorantka poświęciła pierwiastkom akumulowanym przez grzyby jadalne. Opierając się na doniesieniach literaturowych omówiła znaczenie grzybów jako składników diety człowieka i ich rolę w medycynie ludowej. Zwróciła szczególną uwagę na zdolność grzybów do akumulacji pierwiastków, wielokrotnie większą niż w przypadku roślin, wskazując przy tym na owocniki grzybów i ich zarodniki jako odznaczające się największą zdolnością do kumulowania mikro- i makroelementów poprzez wiązanie ich z metalotioneiną. Największą uwagę zwróciła na te pierwiastki, których niedobór, z uwagi na ich właściwości antyoksydacyjne i udział w licznych szlakach metabolicznych, jest szczególnie niebezpieczny dla organizmu człowieka. Do pierwiastków tych zaliczyła Zn, Se, Cu, Mg i Fe. Poświęcając najwięcej miejsca cynkowi, przedstawiła dostępne dane o zawartości tych biopierwiastków w grzybach jadalnych i scharakteryzowała ich właściwości biologiczne podając podstawowe źródła pierwiastków dla organizmu człowieka, wielkość dziennego zapotrzebowania oraz skutki niedoboru i zatrucia tymi pierwiastkami.

Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, że została właściwie zredagowana i spełniła swoją rolę jako uzasadnienie celu badań sformułowanego na kolejnych stronach dysertacji. Z celu wynika, że nadrzędnym zadaniem jakie postawiła sobie Doktorantka było opracowanie efektywnego sposobu przygotowania próbek z materiału grzybowego do oznaczenia ilości Zn uwalnianego do sztucznych soków trawiennych i walidacja opracowanej procedury analitycznej opartej na technice różnicowej impulsowej anodowej woltamperometrii stripingowej. Mgr M. Zając badała uwalnianie jonów Zn z wybranych owocników rosnących dziko grzybów jadalnych: *Boletus badius* (podgrzybek brunatny), *Boletus edulis* (borowik szlachetny), *Cantharellus cibarius* (pieprznik jadalny), *Leccinum scabrum* (koźlarz babka), *Pleurotus ostreatus* (bocznik ostrygowaty), *Suillus bovinus* (maślak sitarz), owocników

grzybów jadalnych pochodzących z upraw komercyjnych: *Agaricus bisporus* (pieczarka dwuzarodnikowa), oraz z biomasy (grzybni) *Agaricus bisporus* uzyskanej z kultur *in vitro* na podłożu płynnym wg. Oddoux, do sztucznych soków trawiennych (śliny, soku żołądkowego, soku jelitowego). W szczegółowym ujęciu program badań obejmował:

- (a) opracowanie schematu postępowania analitycznego z użyciem techniki DP ASV w celu oznaczenia Zn uwolnionego z owocników podgrzybka brunatnego do sztucznych soków trawiennych, wraz z oceną wpływu sposobu mineralizacji i typu aparatu do ekstrakcji na wynik analizy oraz walidacją zoptymalizowanej procedury analitycznej,
- (b) określenie stopnia uwalniania Zn z liofilizowanych owocników wybranych gatunków grzybów jadalnych – pieczarki dwuzarodnikowej, podgrzybka brunatnego i pieprznika jadalnego do sztucznych soków trawiennych w temp. 25°C, zmieniając czas inkubacji badanego materiału w sztucznym soku żołądkowym w przedziale od 15 do 120 min,
- (c) określenie stopnia uwalniania Zn z liofilizowanych owocników 6. dziko rosnących gatunków grzybów jadalnych do sztucznych soków trawiennych w temperaturze ciała człowieka (37°C), z materiału przed i po obróbce termicznej naśladującej procedury przygotowania potraw z grzybów, zmieniając czas inkubacji próbek w sztucznym soku żołądkowym w przedziale 15 – 120 min,
- (d) oraz, uzyskanie biomasy *Agaricus bisporus* z kultur *in vitro* na podłożu płynnym, bez dodatku i z dodatkiem organicznych i nieorganicznych związków cynku, w celu oszacowania ich wpływu na poziom jonów Zn uwalnianych z biomasy do soków trawiennych, z uwzględnieniem różnego czasu inkubacji w soku żołądkowym.

Opis procedur badawczych oraz wyniki wykonanych z ich udziałem prac, mgr M. Zając zamieściła w pięciu kolejnych rozdziałach liczących łącznie 37. stron, przedstawiając uzyskane dane w formie 9. tabel, 6. rycin i 4. fotografii. Przedstawiony materiał faktograficzny dobrze dokumentuje wyniki przeprowadzonych badań i przekonuje, że warsztat badawczy Doktorantki został dobrze skonstruowany, oczywiście, przy istotnym merytorycznym udziale Promotorów, prof. Włodzimierza Opoki i dr hab. Bożeny Muszyńskiej. Właściwa interpretacja wyników znajduje odzwierciedlenie w logicznie i zwięźle ujętym podsumowaniu.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć nowatorskie podejście do problemu oszacowania biologicznie dostępnej ilości Zn z materiału grzybowego, poprzez opracowanie warunków badań imitujących zachowanie się liofilizowanych owocników grzybów w przewodzie pokarmowym człowieka. W związku z tym, do ekstrakcji analitu z badanych próbek mgr M. Zając wykorzystwała dwa urządzenia skonstruowane w macierzystej Katedrze; aparat Gastroel 2014 umożliwiający uwalnianie Zn z tego samego materiału kolejno do śliny, soku żołądkowego i ostatecznie do soku jelitowego z zachowaniem czasu inkubacji w soku trawiennym charakterystycznego dla przebywania pokarmu w tym soku w organizmie człowieka, oraz aparat G-flow-2015 zapewniający dwukierunkowy, pulsacyjny przepływ soku trawiennego. Uwzględniła też w badaniach próbki przed i po obróbce termicznej naśladującej

procedury przygotowania potraw z grzybów. Tym sposobem Doktorantka uzupełniła dane literaturowe o całkowitej zawartości biopierwiastków w owocnikach grzybów jadalnych o dane odnoszące się do poziomów Zn realnie ekstrahowanych do śliny, soku żołądkowego i soku jelitowego z uwzględnieniem wpływu na całkowitą zawartość biodostępnego Zn różnego czasu przebywania próbek w sztucznym soku żołądkowym. Udowodniła też, że spośród badanych gatunków grzybów jadalnych, gatunki z taksonu *Boletaceae* (podgrzybek brunatny, borowik szlachetny), są najlepszym źródłem biodostępnego cynku.

Istotnym osiągnięciem mgr M. Zając są również nowatorskie badania nad wpływem suplementacji różnymi dawkami wodorosparaginianu cynku i siarczanu(VI) cynku podłoża płynnego użytego do produkcji biomasy z kultur *in vitro* *A. bisporus*, na ilość Zn uwolnionego z liofilizowanej biomasy pieczarki dwuzarodnikowej. Badania wykazały, iż cynk związany w formie kompleksu organicznego jest lepiej przyswajalny przez biomasę uwalniając większe ilości pierwiastka do sztucznych soków trawiennych.

Uwagę zwraca też poprawnie wykonana walidacja procedury analitycznej, zgodnie z wymaganiami dokumentu ICH Q2(R1). Doktorantka wyznaczyła takie parametry poprawności pomiarów analitycznych jak liniowość, precyzja, dokładność, czułość wyrażona jako granica wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) oraz specyficzność, poprzez zbadanie wpływu jonów Cu(II), Cd(II) i Pb(II) na wyniki oznaczeń śladowych ilości jonów Zn(II). Parametry walidacyjne obliczono na podstawie 9. pomiarów wykonanych dla trzech różnych sposobów mineralizacji ekstraktów; tj. mineralizując próbki za pomocą mineralizatora z lampą UV, mineralizatora mikrofalowego oraz w piecu muflowym. Dokładność jako procent odzysku określono metodą dodatku wzorca w ilości 50, 100 i 150% w stosunku do spodziewanej zawartości analitu w badanej próbce. Walidacja wykazała, że opracowana metoda DP ASV oznaczania jonów Zn uwalnianego do sztucznych soków nadaje się do założonego celu i zapewnia budzące zaufanie wyniki, o czym świadczą m.in. wysoka wartość współczynnika korelacji Pearsona dla krzywej kalibracji ($> 0,98$), niskie wartości LOD i LOQ oraz dobra dokładność oznaczeń, przekładająca się na odzysk powyżej 95% w przypadku mineralizacji w mineralizatorze mikrofalowym.

Całości dysertacji dopełnia zamieszczone na końcu pracy Piśmiennictwo, z pełnymi tytułami cytowanych publikacji. Stanowi ono zestaw 138. pozycji, w zdecydowanej większości profesjonalnych, angielskojęzycznych prac naukowych i monografii. Należy podkreślić aktualność zebranego piśmiennictwa, więcej niż 1/3 cytowanych artykułów pochodzi z lat 2010-2015. Najstarsza cytowana pozycja wydana została w roku 1957. Zebrane piśmiennictwo przekonuje, że przed rozpoczęciem badań mgr M. Zając dobrze rozpoznała problematykę, jaką będzie się zajmowała w trakcie realizacji doktoratu. Potwierdza też dobre przygotowanie teoretyczne Autorki do prowadzenia prac doświadczalnych w tym zakresie i dobrze rokuje co do poprawności interpretacji wyników badań własnych. Doktorantka nie uniknęła jednak drobnych błędów, np. pozycja 4 i 5 to ta sama praca. To samo dotyczy pozycji 30 i 40 – ta sama praca jest cytowana raz pod nazwiskiem, a w drugim przypadku pod imieniem Autora pracy. W niektórych przypadkach dane bibliograficzne są niepełne, np. pozycja 17 (brak danych o

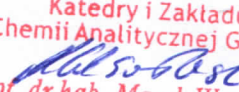
konferencji), 24 (czasopismo czy monografia), oraz inne pozycje, w których nazwiska współautorów zastąpiono określeniem et al.

W tekście pracy napotkałem na pewne nieścisłości i drobne usterki redakcyjne. Autorka podaje, że w badaniach wykorzystwała dziko rosnące grzyby *Lactarius deliciosus* (mleczaj rydz) i pochodzący z hodowli komercyjnej *Lentinula edodes* (twardziak jadalny), podczas gdy w pracy doktorskiej brak jest jakiegokolwiek informacji o wynikach uzyskanych dla tych grzybów. W rozdziale „Materiały do badań” nie wymieniła natomiast *Pleurotus ostreatus* (bocznika ostrygowatego), którego owocniki użyła do oceny stopnia uwalniania Zn do sztucznych soków trawiennych w temperaturze ciała człowieka. Nieprawidłowo podała nazwy technik AAS i AES, powinno być Spectrometry w miejsce Spectrophotometry (str. 7). Limit detekcji należy zastąpić polskim terminem – granica wykrywalności (str. 8, 38). Trudno wskazać, do której ryciny odnosi się określenie Fig. 2 na str. 59, na pewno nie do ryciny 2 na stronie 36. Ponadto, na str. 59 Autorka odwołuje się do Tabeli 4, a powinna do Tabel 13 i 14.

Oceniana praca doktorska świadczy o dobrym przygotowaniu Autorki do prowadzenia badań naukowych. Doktorantka swobodnie operuje terminologią chemiczną, umiejętnie korzysta ze specjalistycznej aparatury badawczej, a ponadto w dużym stopniu opanowała umiejętność krytycznej oceny wyników, wykazując się nie tylko dobrym zrozumieniem zagadnień teoretycznych, ale również doświadczeniem analitycznym. W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny pracy doktorskiej mgr Magdaleny Zajac pt.: „Zastosowanie metody anodowej woltamperometrii strippingowej do badania stopnia uwalniania cynku z materiału grzybowego do sztucznych soków trawiennych” stwierdzam, że w pełni odpowiada ona warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Magdaleny Zajac do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na nowatorskie podejście do problemu oszacowania biodostępnej formy cynku uwalnianego z liofilizowanego materiału grzybowego do sztucznych soków trawiennych imitujących przewód pokarmowy człowieka oraz opublikowanie wyników w czasopiśmie indeksowanych w bazie JCR, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Magdaleny Zajac.

Gdańsk, dnia 18 kwietnia 2016 r.

K I E R O W N I K
Katedry i Zakładu
Chemii Analitycznej GUMed

prof. dr hab. Marek Wesolowski