

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Czerneckiej

pt. „Analiza potencjału antyoksydacyjnego surowicy krwi z uwzględnieniem preferencji żywieniowych i stylu życia dawców krwi ”

Oceniana praca doktorska została wykonana w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie pod kierunkiem prof. dr hab. Zdzisława Targońskiego. Rozprawa obejmuje 185 stron maszynopisu wraz z aneksem, zawiera komplet wymaganych rozdziałów i ma typowy układ dla prac o charakterze doświadczalnym. Wyniki badań zostały zaprezentowane w formie tabelarycznej i graficznej. W maszynopisie rozprawy zamieszczono 27 tabel i 61 rysunków ze szczegółowymi wynikami badań.

Problematyka rozprawy jest związana z analizą potencjału przeciwutleniającego przetworów z czarnej porzeczki, szczególnie nektaru z tych owoców, oraz wpływu spożywania tego nektaru na potencjał przeciwutleniający surowicy krwi i moczu u wybranych grup konsumentów. Badania nad rolą przeciwutleniaczy w żywieniu ludzi należą do najważniejszych tematów nauk o żywności w ostatnim 20-leciu i mimo bogatego piśmiennictwa poświęconego tym zagadnieniom ciągle zachowują swoją aktualność.

Autorka poświęciła swoją uwagę zmianom aktywności antyoksydacyjnej i zmianom zawartości wybranych przeciwutleniaczy powstałym w wyniku stosowanej technologii przetwórstwa owoców czarnej porzeczki i w czasie przechowywania przetworów z tych owoców. Należy przy tym podkreślić, że czarna porzeczka należy do najważniejszych owoców miękkich zbieranych w Polsce (1/4 światowej produkcji) i jest powszechnie spożywana przez konsumentów w formie soków, nektarów, konfitur i dżemów. Owoce czarnej porzeczki są zaliczane do najbogatszych źródeł substancji biologicznie czynnych, w tym takich przeciwutleniaczy, jak antocyjany, flawonole, pochodne kwasu hydroksybenzoesowego i witamina C. W związku z tym spożywanie owoców i przetworów czarnej porzeczki jest zalecane przez dietetyków i lekarzy.



W czasie przetwarzania owoców porzeczek część przeciwutleniaczy pod wpływem zabiegów technologicznych, szczególnie wysokotemperaturowych i przebiegających w obecności tlenu, ulega rozkładowi. Wiedza na ten temat jest ciągle niepełna, stąd pogłębione badania nad tymi zagadnieniami, prezentowane w ocenianej rozprawie, są bardzo cenne.

W części teoretycznej Autorka przedstawiła przegląd stanu wiedzy na temat źródeł i mechanizmów działania reaktywnych form tlenu, antyoksydacyjnego układu ochronnego organizmu człowieka oraz metabolizmu polifenoli zawartych w żywności. Szczególnie szeroko został opisany antyoksydacyjny układ ochronny, z uwzględnieniem funkcji i mechanizmu działania przeciwutleniaczy, enzymów antyoksydacyjnych, przeciwutleniaczy nieenzymatycznych i egzogennych źródeł przeciwutleniaczy, przede wszystkim związków fenolowych pochodzenia roślinnego, a także metabolizm polifenoli zawartych w żywności przez organizm człowieka. Materiał ten jest wartościowy, pełen szczegółów i jest oparty na bogatym piśmiennictwie naukowym obejmującym łącznie 264 pozycje literaturowe, uwzględniających zarówno prace polskojęzyczne, jak i piśmiennictwo światowe.

Kolejnym rozdziałem w części teoretycznej rozprawy jest rozdział zatytułowany „Styl życia i preferencje żywieniowe a zdrowie”. Moim zdaniem nie jest on spójny, gdyż obok zagadnień czysto żywieniowych zawiera także opis czarnej porzeczek jako źródła związków bioaktywnych i biodostępność polifenoli obecnych w owocach tej rośliny. Moim zdaniem zagadnienia poświęcone bioaktywnym substancjom czarnej porzeczek powinny być wyodrębnione w oddzielnym rozdziale, bez mieszania tych treści z zagadnieniami czysto żywieniowymi, jak dieta a zdrowie, aktywność fizyczna a zdrowie oraz używki a zdrowie. W mojej opinii opis substancji bioaktywnych zawartych w czarnej porzeczkach jest ciekawy i wartościowy, natomiast zagadnienia żywieniowe, wymienione powyżej, są zarysowane bardzo ogólnikowo i powierzchownie. Brakuje mi także opisu zachowania się poszczególnych grup antyoksydantów czarnej porzeczek w trakcie przetwarzania owoców, szczególnie przy produkcji nektarów czarnej porzeczek, chociaż muszę przyznać, że zagadnienia te szeroko przedstawiono w dyskusji wyników badań.

Jeśli chodzi o uwagi stylistyczne, to w pierwszym rzędzie należy wytknąć Autorce liczne niedociągnięcia interpunkcyjne, powszechnie spotykane w maszynopisie.

W celu pracy Autorka wymienia cztery zadania szczegółowe, które miały doprowadzić do określenia zmian w potencjale przeciwutleniającym surowicy krwi u osób spożywających nektar, soki i dżem z owoców czarnej porzeczek. Jako kryteria oceny statusu przeciwutleniającego organizmu przyjęto: zmiany w całkowitym potencjale

przeciwutleniającym osocza, w stężeniu witaminy C, w aktywności enzymów przeciwutleniających (katalaza, peroksydaza glutationowa i dysmutaza ponadtlenkowa) w surowicy krwi oraz stężenie dialdehydu malonowego, jako wskaźnika uszkodzenia lipidów lub DNA.

Do badań użyto próbki krwi pobrane od 52 osób w wieku 19-53 lat, będących honorowymi dawcami krwi. Ochotnicy ci stanowili grupę kontrolną dla grupy eksperymentalnej spożywającej nektar z owoców czarnej porzeczki. Grupa eksperymentalna składała się z 14 mężczyzn w wieku 19-32 lat, prowadzących zrównoważony tryb życia (klerycy seminarium duchownego) i żyjących się w zamkniętym systemie żywienia zbiorowego. Osoby te spożywały przez 4 tygodnie nektar z czarnych porzeczek produkowany przez firmę Hortex, wytwarzany na bazie zagęszczonego soku. I tutaj mam problem, bowiem nie bardzo rozumiem po co wybrano jako próbę kontrolną grupę dawców krwi. Moim zdaniem taką grupą kontrolną mogła być sama grupa eksperymentalna, badana przez okres 4 tygodni, ale bez spożywania nektaru porzeczkowego. Bliższa charakterystyka grupy kontrolnej, dawców krwi, wskazuje, że różniła się ona istotnie od grupy eksperymentalnej (klerycy). Badania z grupą dawców krwi stanowiły pewien oddzielny wątek, moim zdaniem luźno związany z głównym nurtem badawczym w tej pracy. Myślę, że Autorka chciała mieć przybliżony obraz „przeciętnego konsumenta”, ale może krył się w tym inny cel. Podobnie nie widzę uzasadnienia do badań technologicznych odnoszących się do zmian przechowalniczych przetworów wytworzonych we własnym zakresie (soki i dżem porzeczkowy). W mojej opinii główny i zarazem spójny nurt tej pracy stanowią badania nad charakterystyką chemiczną nektaru z czarnej porzeczki, charakterystyką biochemiczną grupy eksperymentalnej oraz badania nad efektami żywieniowymi po spożyciu nektaru porzeczkowego skupione na zmianach potencjału oksydacyjnego surowicy krwi i moczu grupy eksperymentalnej. Badania z udziałem grupy dawców krwi oraz badania technologiczno-przechowalnicze były w tej pracy wątkami raczej uzupełniającymi, choć ciekawymi.

Jeśli chodzi o metodykę badań to została ona opisana bardzo szczegółowo i nie budzi moich wątpliwości. Autorka wykorzystwała uznane, nowoczesne metody badawcze i analityczne, w tym RP-HPLC-DAD. Wszystkie osoby biorące udział w badaniach szczegółowo scharakteryzowano na podstawie badań antropometrycznych i badań ankietowych. Analiza surowicy krwi objęła bardzo dużą liczbę szczegółowych wskaźników, w tym aktywność przeciwutleniającą surowicy krwi wobec rodnika DPPH i kationorodnika ABTS, stężenie cholesterolu całkowitego oraz frakcji HDL i LDL, stężenie kwasu moczowego, triglicerydów,

kwasu L-askorbinowego, związków fenolowych, dialdehydu malonowego oraz aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych.

W części wynikowej pracy Autorka przedstawiła obszerny materiał, podzielony na kilka podrozdziałów. Pierwszy etap pracy dotyczy wyników badań nad wpływem obróbki technologicznej i czasu przechowywania na aktywność przeciwutleniającą i zawartość substancji bioaktywnych w przetworach z czarnej porzeczki. Przetwory te zostały wykonane w laboratoriach Uniwersytetu i następnie były przechowywane przez okres 4 miesięcy w obecności światła i bez światła, a więc w warunkach zbliżonych do warunków panujących w handlu. Ciekawe dane przyniosły wyniki zestawione w tabeli 10, wskazujące na zaskakująco niski udział kwasu askorbinowego w całkowitym potencjale przeciwutleniającym przetworów z czarnej porzeczki. Wyniki badań potwierdziły niszczące działanie wysokotemperaturowych zabiegów technologicznych, występujących szczególnie przy produkcji dżemów i niekorzystny wpływ długotrwałego przechowywania przetworów. Uzyskane wyniki stanowią nowe, nieznane dotąd dane, poszerzające naszą wiedzę na temat stabilności chemicznej poszczególnych związków antocyjanowych zawartych w przetworach z czarnej porzeczki.

Wydaje mi się jednak, że tabela 13 powinna poprzedzać tabelę 12, gdyż odnosi się do oznaczania całkowitej zawartości antocyjanów, podczas gdy dane z tabeli 12 dotyczą poszczególnych związków wchodzących w skład sumy antocyjanów. Należy jednak zaznaczyć, że wymienione przetwory nie były wykorzystane w badaniach żywieniowych.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła charakterystykę składu nektaru z czarnej porzeczki, produkowanego przez firmę Hortex, wykorzystanego w badaniach *in vivo* z udziałem 14 ochotników. Widoczna jest dużo gorsza jakość produktu handlowego w porównaniu z produktami wytworzonymi samodzielnie przez Autorkę. Analiza nektaru jest bardzo szczegółowa i objęła najważniejsze grupy antyoksydantów, w tym skład antocyjanów i kwasów fenolowych.

Oceniając badania dotyczące potencjału antyoksydacyjnego i zawartości poszczególnych grup przeciwutleniaczy w przetworach z owoców czarnej porzeczki należy podkreślić wysokie umiejętności analityczne mgr Moniki Czerneckiej i znajomość nowoczesnych technik instrumentalnych.

Kolejny etap badań dotyczył zagadnień żywieniowych. Eksperymenty były przeprowadzone z udziałem dwóch grup ochotników, tj. honorowych dawców krwi (52 osoby, grupa kontrolna) oraz grupy młodych mężczyzn – kleryków (14 osób, grupa eksperymentalna). Wybór dawców krwi gwarantował, że w badaniach brały udział osoby zdrowe, relatywnie młode i dosyć

zróżnicowane pod względem płci, parametrów antropometrycznych i kondycji fizycznej, na co wskazują dane zamieszczone w tabeli 14. W charakterystyce tych osób uwzględniono także aktywność fizyczną tych osób, spożywanie używek (papierosy i kawa) i suplementów diety oraz ilość posiłków spożywanych w ciągu doby z udziałem świeżych owoców i warzyw. Grupa młodych mężczyzn była także pod każdym względem bardziej jednorodna.

Generalnie należy jednak stwierdzić, że jak na wymogi badań żywieniowych liczba osób uczestniczących w tych badaniach była bardzo mała, szczególnie w grupie eksperymentalnej. Także grupa dawców krwi była niewielka, jak na wymagania badań żywieniowych. Stąd podział tej grupy na jeszcze mniejsze podgrupy, wyodrębnione na podstawie dodatkowych kryteriów, jak aktywność fizyczna, palenie tytoniu czy picie kawy, budzi wątpliwości co do reprezentatywności tych grup. W tej sytuacji uzyskane wyniki należy traktować jako dane informacyjne, a badania raczej jako badania pilotażowe.

W kolejnych podrozdziałach rozprawy przedstawiono wyniki badań aktywności poszczególnych enzymów oksydo-redukcyjnych w surowicy krwi badanych podgrup ochotników. Analiza objęła aktywność peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy. Uzyskano w ten sposób bardzo szczegółowe i wartościowe dane. Na wykresach prezentowanych w tej części rozprawy brakuje średnich odnoszących się do całej grupy ochotników, co ułatwiłoby wyciąganie wniosków, na ile wyniki odnoszące się do poszczególnych podgrup różnią się od średnich dla całej grupy.

Kolejnym badanym parametrem fizjologicznym było stężenie dialdehydu malonowego w surowicy krwi badanych osób. Wybór tego wskaźnika był bardzo trafny, gdyż daje on ważne wskazania odnośnie powstawania w organizmie nadtlenków w reakcjach peroksydacji lipidów, szczególnie ich form nienasyconych. Badania wykazały, że zarówno palenie papierosów, jak i picie kawy w sposób statystycznie istotny zwiększają stężenie tego aldehydu we krwi. Zaskakują mnie wyniki odnoszące się do osób pijących kawę, bowiem czarna kawa jest uważana za produkt o dużej aktywności przeciwutleniającej (produkty reakcji Maillarda), więc powinna wzmacniać ochronę antyoksydacyjną, a tak nie było.

Kolejnym zagadnieniem badawczym była analiza zawartości związków fenolowych oraz badania nad zmianami w aktywności przeciwutleniającej surowicy krwi u ochotników pijących nektar porzeczkowy. Jako wskaźniki potencjału przeciwutleniającego surowicy krwi wykorzystano pomiar aktywności wobec rodników ABTS i DPPH. Badania wykazały duże wyrównanie stężenia związków fenolowych w surowicy krwi w grupie kontrolnej, tj. u wszystkich wyodrębnionych podgrup ochotników-dawców krwi, natomiast w grupie

spożywającej nektar z czarnej porzeczki stężenie związków fenolowych istotnie zwiększało się w miarę przedłużania czasu spożywania nektaru porzeczkowego i było większe niż w grupie kontrolnej, co należy uznać za zgodne z oczekiwaniami. Podobne zależności odnotowano w badaniach oznaczeń całościowej aktywności przeciwutleniającej (ABTS, DPPH) w surowicy krwi. Wykazały one znacznie większą aktywność surowicy krwi u osób pijących codziennie nektar z czarnej porzeczki. Wyższa też była u tych osób aktywność przeciwutleniająca oznaczona w moczu. Stwierdzono przy tym znacznie wyższe wartości całkowitej aktywności przeciwutleniającej oznaczanej wobec rodnika DPPH, od wartości mierzonych wobec kationorodnika ABTS (Rys. 31).

Kolejnym badanym parametrem surowicy krwi w obu grupach ochotników było stężenie witaminy C. W grupie kontrolnej obserwowano wyrównany poziom kwasu askorbinowego, z wyjątkiem ochotników palących tytoń. W grupie eksperymentalnej początkowe stężenie tej witaminy w osoczu było nieco niższe niż w grupie kontrolnej, ale wraz z upływem czasu spożywania nektaru wyraźnie rosło i po 4 tygodniach znacznie przewyższyło stężenie tego związku oznaczone w grupie kontrolnej. Analogiczną tendencję odnotowano przy analizie stężenia kwasu L-askorbinowego w moczu badanych grup ochotników. Zaskoczeniem stanowi jednak bardzo mały udział witaminy C w ogólnym potencjale antyoksydacyjnym nektaru.

Ciekawych danych dostarczyły badania poświęcone analizie oddziaływania długotrwałego picia nektaru porzeczkowego na gospodarkę lipidową, a przede wszystkim na stężenie cholesterolu i jego głównych frakcji oraz na poziom triglicerydów w surowicy krwi. Są to bardzo ważne wskaźniki stanu zdrowotnego człowieka i należą do podstawowych badań w diagnostyce medycznej w kierunku ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Analizy surowicy krwi ochotników należących do grupy kontrolnej wykazały wyższy poziom cholesterolu całkowitego u osób palących tytoń i pijących kawę. Osoby te miały jednocześnie podwyższony poziom lipoprotein wysokiej gęstości (frakcja HDL), co jest w tym przypadku zastanawiające. U osób pijących nektar porzeczkowych z grupy eksperymentalnej obserwowano systematyczny spadek poziomu cholesterolu całkowitego w miarę czasu spożywania nektaru oraz wyrównany poziom frakcji HDL, mieszczący się w przyjętej normie, przy jednoczesnym spadku zawartości frakcji LDL. Uzyskane wyniki należy uznać za znaczące i potwierdzające korzystny wpływ picia nektary z czarnej porzeczki dla osób ze skłonnością do cholesterolemii.

Część doświadczalną rozprawy doktorskiej zamykają rozdziały, w których przedstawiono wyniki badań nad zawartością poszczególnych antocyjanów w surowicy krwi i w moczu osób spożywających nektar z czarnej porzeczki z uwzględnieniem wektora czasowego. W mojej opinii jest to najwartościowsza część całej pracy, gdyż zawiera wiele nowości naukowych i poszerza wiedzę na temat stężenia tych związków we krwi i w moczu, co pośrednio obrazuje ich wchłanianie i metabolizm. Należy podkreślić, że uzyskane dane są bardzo szczegółowe i oparte na rzetelnym warsztacie analitycznym.

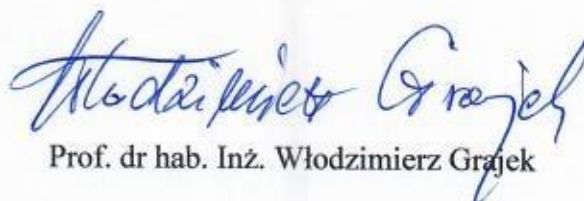
Po przedstawieniu wyników badań eksperymentalnych Autorka poddała je szerokiej i wieloaspektowej dyskusji. Jestem pod dużym wrażeniem dojrzałości naukowej mgr Moniki Czerneckiej, jej erudycji, zdolności do pogłębionej analizy naukowej wyników, świetnej znajomości specjalistycznej literatury światowej i umiejętnego cytowania i kojarzenia danych. Poza tym dyskusja jest napisana świetnym językiem.

Podsumowując moją ocenę stwierdzam, że praca obejmuje duży zakres badań i zawiera elementy nowości naukowej, a więc spełnia podstawowy wymóg stawiany pracom na stopień naukowy. Na szczególne uznanie zasługują badania nad zmianami koncentracji pojedynczych antocyjanów w surowicy krwi i w moczu osób spożywających nektar porzeczkowy.

Jeśli chodzi o wnioski wyciągnięte z uzyskanych rezultatów badań, to uważam, że wniosek 4 i 11 są zbyt ogólnikowe i można je pominąć.

Wniosek końcowy:

Biorąc pod uwagę wartość naukową pracy i zawarte w niej elementy nowości naukowej, a także szeroki zakres wykonanych badań, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr inż. Moniki Czerneckiej spełnia wymagania ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r wraz z późn. zm. (Dz. U. nr 65, poz.595) i wnoszę o jej dopuszczenie do publicznej obrony na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.


Prof. dr hab. Inż. Włodzimierz Grajek