

Prof. dr hab. Zbigniew J. Dolatowski
Instytut Biotechnologii Przemysłu
Rolno-Spożywczego PIB im. prof. Wacława Dąbrowskiego
W Warszawie

Warszawa 5.12.2022r

**Recenzja pracy Mgr inż. Moniki Czerneckiej pt. „Analiza potencjału
antyoksydacyjnego surowicy krwi z uwzględnieniem preferencji żywieniowych i stylu
życia dawców krwi” wykonanej w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywności
Człowieka UP w Lublinie.**

Przewód doktorski Mgr inż. Moniki Czerneckiej został wszczęty uchwałą Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii AR w Lublinie z dnia 17.07.2006 r. na podstawie ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami - art.179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – przepisy wprowadzające ustawę prawo o szkolnictwie wyższym i nauce - Dz. U. 2018r poz. 1669). Praca doktorska Pani Moniki Czerneckiej jest monografią, składa się ze 185 stron maszynopisu, zawiera 61 rysunków, 23 tabele, 264 pozycje cytowanej literatury.

Opinia składa się z oceny następujących elementów rozprawy doktorskiej:

A - koncepcji problemu badawczego;

B - metodyki i układu badań;

C - wyników badań i dyskusji;

D - wnioskowania.

Ad. A

Badania ostatnich lat dowiodły, że stres oksydacyjny, wywołany reaktywnymi formami tlenu może leżeć u podstaw występowania wielu chorób cywilizacyjnych. Stres oksydacyjny jest wynikiem zaburzenia równowagi między tworzeniem, a usuwaniem z organizmu wolnych rodników tlenowych. Ochronną rolę dla organizmu m.in. poprzez hamowanie wolno rodnikowych reakcji łańcuchowych i zmiatanie wolnych rodników spełnia enzymatyczny i nieenzymatyczny system antyoksydacyjny. Na podstawie tej obserwacji rozpoczęto poszukiwania czynników przeciwdziałających stresowi oksydacyjnemu, czyli różnego rodzaju przeciwutleniaczy/antyoksydantów. Ich obecność stwierdzono w wielu produktach

pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, a niedawno zauważono także ogromny potencjał antyoksydacyjny drobnoustrojów probiotycznych przewodu pokarmowego. Zagadnienia związane z wykorzystaniem w żywieniu roślinnych związków biologicznie aktywnych (polifenoli), a szczególnie ich aktywności przeciwutleniających i dużego potencjału prozdrowotnego, są przedmiotem szeroko prowadzonych badań przez jednostki badawcze zarówno krajowe jak i zagraniczne. Polifenole są rodzajem złożonych metabolitów wtórnych, szeroko występują w kwiatach, korze, korzeniach, łodygach, liściach i owocach roślin. Liczne badania wykazały, że polifenole mają różne bioaktywności ze względu na ich unikalną strukturę chemiczną, jak właściwości przeciwutleniające, przeciwdrobnoustrojowe, zapobieganie chorobom przewlekłym, sercowo-naczyniowym, nowotworom i innych. Wraz ze stopniowym rozwojem roli naturalnych produktów w żywieniu człowieka, stanowią alternatywę dla stosowanych dodatków związków chemicznych w przemyśle spożywczym. Koncepcja podjętych badań przez Panią Monikę Czernecką jest w pełni uzasadniona potrzebą szerszego poznania działania naturalnych związków biologicznie aktywnych w kształtowaniu potencjału antyoksydacyjnego krwi, moczu u zdrowych dorosłych osób. W przeglądzie piśmiennictwa (264 pozycje literatury krajowej i zagranicznej), Autorka omówiła aktualny stan wiedzy na temat poruszanych w badaniach zagadnień. Przedstawiła możliwość zwiększenia biodostępności i przyswajalności przeciwutleniaczy zawartych w żywności, a szczególnie antocyjanów czarnej porzeczki.

Ad. B

Kolejna część rozprawy zawiera cel, materiał i metody badawcze. W celu pracy przedstawiono podstawowe problemy badawcze rozprawy doktorskiej. Pani mgr inż. Monika Czernecka realizowała trzy główne zagadnienia naukowe: ocena właściwości przeciwutleniających czarnej porzeczki i wpływu warunków jej przetwarzania oraz przechowywania produktów na aktywność przeciwutleniającą. Drugim zagadnieniem przeprowadzonych badań była ocena wpływu nektaru czarnej porzeczki na potencjał oksydacyjny krwi i moczu czternastu osób (mężczyźni w wieku 19-32 lat) w badaniach *in vivo*. Kolejne zadanie pracy dotyczyło oceny potencjału oksydacyjnego krwi i moczu u zdrowych honorowych dawców krwi (52 osoby, różnej płci) z uwzględnieniem ich stylu życia. Są to osoby z dużą aktywnością fizyczną, część osób to nałogowi palacze papierosów i osoby systematycznie pijący kawę. Wszystkie realizowane zagadnienia stanowią spójną całość to jest kształtowanie potencjału oksydacyjnego krwi i moczu pod wpływem różnych czynników.

Sposób zaprogramowania i realizacji badań został dobrze opisany. Analizując założenia i cel badań, jednak recenzentowi brakuje postawionej hipotezy badawczej, która ukierunkowałaby w dyskusji ten bardzo szeroki zakres badań, ilość i zróżnicowanie wyników. Recenzent uważa, że głównym zagadnieniem badań jest ocena zmiany potencjału oksydacyjnego krwi i moczu grupy ochotników, którzy przez okres czterech tygodni żywienia do swojej diety dodawali dodatkowo nektar czarnej porzeczki 250 ml rano i taką samą ilość wieczorem. Mam pytanie do Doktorantki: dlaczego w badaniach żywieniowych in vivo wybrano sok z czarnej porzeczki? Należy podkreślić, że cel pracy jest dobrze ukierunkowany w zakresie oceny roli przeciwutleniaczy w żywieniu człowieka. Oceniając zakres badań jak i uczestników dwu grup badawczych należy podkreślić, że każda z nich została poprawnie wybrana i określona. Do badań in vivo jest to 14 ochotników w wieku 19-32 lat o zbliżonych nawykach żywieniowych. Grupa do swej diety stosowała dodatkowo napój z czarnej porzeczki rano i wieczorem z ocenioną ilością antocyjanów. Proszę o szersze uzasadnienie w prezentacji badań podczas obrony wyboru ilości nektaru w diecie jako źródła polifenoli. Dla grupy badawczej oceny wpływu sposobu żywienia i życia na poziom oksydacyjny plazmy krwi wybrano 52 honorowych dawców krwi, różnej płci w wieku 19-53 lat. Przeprowadzono ankietową charakterystyką osobowości, sposobu żywienia i ilości stosowanych używek (palenie papierosów i picie kawy). Jest to zróżnicowana grupa osób biorących udział w badaniach. Układ badań przedstawiono poprawnie, jest zrozumiały, z logiczną konsekwencją poszczególnych etapów badawczych. Część doświadczalną pracy wykonano zgodnie z ogólnymi zasadami badań, wykorzystując szerokie spektrum analityczne; od analiz technologicznych, fizykochemicznych, chromatograficznych do ocen ankietowych. Zakres metodyczny badań jest bardzo szeroki i wykonany aktualnie stosowanymi nowoczesnymi metodami analizy poszczególnych wyróżników. Nie wnoszę uwag do metodyki badań i jej zakresu. Jest ona dobrze opisana i wyjaśnione są jej potrzeby w ocenie podjętych badań. Większość informacji podana jest w sposób wyczerpujący, jednak niektóre z nich wymagają dodatkowego wyjaśnienia np. dlaczego w metodzie TBARS używa się określenia stężenia dialdehydu malonowego, a moim zdaniem powinno się używać substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym. Poprawnie przygotowano również ocenę statystyczną wyników. W analizie matematycznej oceny wyników nasuwa się kolejne pytanie: na jakiej podstawie przyjęto ocenę wartości współczynnika korelacji?.

Ad. C

Badania mgr inż. Moniki Czerneckiej w pierwszym etapie dotyczyły wpływu obróbki technologicznej i czasu przechowywania na aktywność przeciwutleniającą i zawartość substancji bioaktywnych w przetworach z czarnej porzeczki. W badaniach Autorka wykazała, że kwas askorbinowy nie jest głównym związkiem odpowiedzialny za wysoką aktywność przeciwutleniającą przetworów z czarnej porzeczki. Główną rolę, według oceny doktorantki, pełnią antocyjany. Wykazano, że ważnym czynnikiem obniżenia aktywności przeciwutleniającej jest dostęp światła. Autorka jest również świadoma, że zmniejszanie poziomu i aktywności witaminy C wynika z jej utleniania w trakcie otrzymywania nektaru. Związane to jest często z polimeryzacją lub rozkładem aktywnych biologicznie związków podczas przetwarzania i przechowywania na co wpływ ma światło, enzymy (oksydaza polifenolowa), jony metali, tlen kwasowość cukry i temperatura. Szczególnie ważną częścią badań, jak wcześniej zaznaczyłem, była ocena wpływu długookresowego systematycznego spożywania nektaru z czarnej porzeczki z dużą ilością flawonoidów na całkowitą zdolność antyoksydacyjną surowicy krwi i moczu, jako głównego markeru stresu oksydacyjnego w organizmie człowieka. Zdaniem recenzenta było to trudne zadanie, ponieważ są jeszcze nieznane szlaki biochemicznych przemian i różnych interakcji, które wpływają na biodostępność polifenoli. Wiele z nich może być metabolizowane przez mikrobiom jelitowy i w postaci innych związków wpływają na potencjał oksydacyjny. Ważnym elementem badań jest zaobserwowany wzrost potencjału antyoksydacyjnego krwi po czterech tygodniach dodatku do diety nektaru z czarnej porzeczki. Doktorantka wskazuje, że jest tutaj udział metabolitów powstałych z rozkładu antocyjanów w przewodzie pokarmowym. Wykazano, iż dzięki wielorakim mechanizmom, drobnoustroje jelitowe wykazują istotne i niepodważalne działanie przeciwrodnikowe. Mają zdolność do przetrwania wyższych niż inne mikroorganizmy stężeń reaktywnych form tlenu, przeciwdziałają ich nagromadzeniu poprzez hamowanie kaskad reakcji łańcuchowych, prowadzą do produkcji bioaktywnych związków przeciwdziałających skutkom stresu oksydacyjnego w komórkach lub regulują aktywność enzymów anty- i prooksydacyjnych., co jest związane z udziałem mikroflory jelitowej. Mają zdolność do przetrwania wyższych niż inne mikroorganizmy stężeń reaktywnych form tlenu, przeciwdziałają ich nagromadzeniu poprzez hamowanie reakcji łańcuchowych, prowadzą do produkcji bioaktywnych związków przeciwdziałających skutkom stresu oksydacyjnego w komórkach lub regulują aktywność enzymów anty- i pro- oksydacyjnych. Przeprowadzona dyskusja otrzymanych wyników nie jest łatwym zadaniem. Jest ona bardzo szeroko prowadzona z uwzględnieniem również badań wykonanych przez innych autorów. W przybliżeniu wiedzy co zdecydowało o takich wynikach badań brakuje recenzentowi ogólnej

charakterystyki diety i ewentualnego jej uzupełniania między posiłkami. Kolejnym trudnym problemem oceny jest indywidualność stresu oksydacyjnego nawet u wybranych ochotników badań. Mimo zbliżonej diety, działania organizmów osób mogą różnie reagować na inne czynniki wpływające na stres oksydacyjny. W grupie ocenianego dodatku antocyjanów czarnej porzeczki ochotnicy spożywali z żywności wiele innych związków biologicznie aktywnych w tym i innych polifenoli. Wybrane markery oceny aktywności przeciwutleniającej zaangażowanych w ochronę oksydacyjną krwi wykazywały często nie istotne zróżnicowane wartości aktywności. Nie mamy pewności czy przyczyną były inne substancje w diecie, czy może naturalne mechanizmy organizmu chroniły odpowiedni poziom oksydacyjny krwi. Na uwagę zasługują obserwowane przez doktorantkę zmiany cholesterolu i trójglicerydów, a szczególnie obniżone poziomy cholesterolu ogólnego i zawartości frakcji LDL cholesterolu we krwi badanych osób pijących nektar z czarnej porzeczki. W ocenie doktorantki jest to związane z poziomem wszystkich pochodnych przeciwutleniaczy. Zdaniem recenzenta jest to dyskusyjny problem nawet wobec znacznego udziału cukrów w nektarze z czarnej porzeczki oraz obserwowanych zmian antocyjanów i witaminy C podczas technologii przetwarzania czarnej porzeczki. Jest prawdopodobne, że pochodne tych zmian mogą wpływać na obniżenie stresu oksydacyjnego surowicy krwi i moczu. Nie mamy dostatecznej wiedzy jaką rolę w tym procesie oksydacyjnym mogą pełnić czerwone krwinki z uznawaną formą przenoszenia tlenu do komórek. W ocenie wpływu używek u honorowych dawców krwi dokonano również interesującej obserwacji. Palacze papierosów i pijący kawę mają wzrost aktywności katalazy i peroksydazy glutationowej które wskazują na podwyższony stres oksydacyjny surowicy krwi organizmu. Otrzymane wyniki wskazują, że czerwone krwinki mają wpływ na zmiany stresu oksydacyjnego u palaczy tytoniu, ponieważ utlenowanie hemoglobiny występuje w płucach. Natomiast u pijących kawę z dużą ilością polifenoli nie jest dla mnie zrozumiałą wzrost stresu oksydacyjnego. Proszę doktorantkę o próbę wyjaśnienia tego wyniku. Otrzymane wyniki oceny stresu oksydacyjnego są bardzo interesujące, ale wyższe wartości aktywności enzymów w przypadku katalazy i peroksydazy glutationowej należy sprawdzić na większej grupie ocenianych i zróżnicowanych osób. Należy podkreślić, że enzymy zwiększają swoją aktywność wobec wzrostu zagrożenia oksydacyjnego, co podkreśla doktorantka w dyskusji wyników. Organizm człowieka reaguje w celu utrzymania fizjologicznej homeostazy. Jest to potwierdzenie w wielu dotychczas prowadzonych badaniach. Należy jednak podkreślić, że w tak złożonym układzie biologicznym jakim jest człowiek na aktywność antyoksydacyjną wpływa nie tylko dieta i styl życia a może i inne nieznanne czynniki przemian fizjologicznych. Autorka szczegółowo przedyskutowała swoje wyniki z wynikami badań innych autorów,

wykorzystując w tym celu trafnie dobraną i aktualną literaturę, głównie anglojęzyczną. Dyskusja wyników świadczy o bardzo dobrym rozeznaniu Pani Magister Czerneckiej w najnowszej literaturze problemu będącego podstawą pracy doktorskiej. Może tylko szkoda, że tak mało jest cytowanej literatury krajowej.

Ad. D

Podsumowując zakres wykonanych badań stwierdzam, że założenia i koncepcja rozwiązania złożonego problemu naukowego w pracy doktorskiej mgr inż. Moniki Czerneckiej pt. „Analiza potencjału antyoksydacyjnego surowicy krwi z uwzględnieniem preferencji żywieniowych i stylu życia dawców krwi” jest poprawne i spełnia stawiane wymagania rozprawie doktorskiej. Zostały dobrze i profesjonalnie wykonane doświadczenia z materiałem żywnościowym i jego wpływu na stres oksydacyjny surowicy krwi i moczu człowieka. Uzyskane wyniki pozwoliły na pogłębienie i poszerzenie naszej wiedzy na temat roli polifenoli i ich pochodnych w żywieniu. Wyniki badań pozwalają na zwrócenie większej uwagi na rolę naturalnych substancji przeciwutleniających w żywieniu człowieka. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie w badaniach doktorantki szerokiego zakresu nowoczesnych metod analitycznych, w pełni odpowiadający profilowi prowadzonych badań. Większość informacji podana jest w sposób wyczerpujący, jednak niektóre z nich wymagają dodatkowego wyjaśnienia, dlatego recenzent postawił kilka pytań dla szerszego wyjaśnienia i przybliżenia problemu. Przedstawione uwagi, pytania nie umniejszają wartości wykonanych badań i przygotowania pracy doktorskiej. Pracę podsumowuje 11 wniosków, które wynikają z przeprowadzonych badań. Jednak zdaniem recenzenta brakuje wniosku z zaleceniem poziomu spożywanych owoców i ich przetworów (zawartość cukrów). Proszę Doktorantkę o odniesienie się do ww. kwestii w czasie prezentacji autoreferatu podczas obrony pracy doktorskiej. Stwierdzam, że będąca przedmiotem oceny praca doktorska Pani mgr inż. Moniki Czerneckiej jest oryginalnym i wartościowym osiągnięciem naukowym wpływu naturalnych przeciwutleniaczy czarnej porzeczki na poziom oksydacyjny krwi i moczu człowieka, a przedstawione uwagi, jak już zaznaczyłem, nie rzutują na jej wysoką wartość naukową. Autorka wykazała się dobrą znajomością tematyki badań, właściwie dobrała metody badawcze i poprawnie wykonała doświadczenia i analizy wykazując się umiejętnością posługiwania się nowoczesną aparaturą. Szczególnie należy podkreślić duży zakres różnorodnych i czasochłonnych analiz.

Uważam, że rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, wymienione w prawie o szkolnictwie wyższym (art.179 ust.2 i 3 Ustawy z dnia 3. lipca 2018r art.13 oraz ust.1 ustawy z dnia 14.03.2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz.595, z późn. zm. o stopniach

naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki). Proszę zatem Wysoką Radę, o dopuszczenie mgr inż. Moniki Czerneckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk rolniczych i dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M. Czernecka', written in a cursive style.