

dr hab. Dorota Konopacka, prof. IO
Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa Owoców i Warzyw
Instytut Ogrodnictwa
96-100 Skierniewice
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Prymont-Przymińskiej
**pt. „Zmiany stężenia polifenoli i zdolności antyoksydacyjnej osocza
po spożyciu truskawek u zdrowych osób”**

wykonanej
w Katedrze Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Dariusza Nowaka

Wśród gatunków owoców dojrzewających w umiarkowanej strefie klimatycznej, owoce jagodowe uważa się za najbardziej wartościowe źródło naturalnych przeciwutleniaczy. Niestety nie wszystkie owoce jagodowe cieszą się uznaniem wśród konsumentów, jak choćby czarna porzeczka, która będąc teoretycznie jednym z najbardziej wartościowych źródeł witaminy C, jest akceptowana przez relatywnie niewielką grupę konsumentów. W przypadku truskawek, które pozostając owocem deserowym oferują bogactwo składników odżywczych i prozdrowotnych, szansa aby zostały zaakceptowane przez konsumentów jako ‘owoc-lekarstwo’ jest znacząco większa. Przełom XX i XXI wieku to okres, kiedy uwaga społeczeństwa, coraz bardziej doświadczonego chorobami cywilizacyjnymi, zwróciła się w stronę naturalnych źródeł składników mogących chronić organizm ludzki przed wpływem niekorzystnych czynników, w tym tych posiadających zdolność do zmiatania wolnych rodników. Spośród wielu możliwych prozdrowotnych oddziaływań fitozwiązków zawartych w truskawkach, w literaturze najczęściej wymienia się ich zdolność do hamowania rozwoju procesów zapalnych i nowotworowych oraz pozytywny wpływ na gospodarkę węglowodanową w cukrzycy typu II. Mając na względzie potencjalną możliwą rolę konsumpcji truskawek w obniżeniu ryzyka zachorowania na choroby układu sercowo-naczyniowego oraz ich dostępność dla przeciętnego konsumenta, wybór tematyki pracy uważam za bardzo celny i społecznie wartościowy.

Jako cel pracy Autorka wskazała uzyskanie odpowiedzi na pytania dotyczące wpływu interwencji dietetycznej, polegającej na wprowadzeniu do codziennej diety truskawek, na właściwości antyoksydacyjne osocza i zmiany stężenia wybranych składników polifenolowych i ich metabolitów w osoczu oraz wydalanych w moczu u zdrowych ochotników. Podstawą do osiągnięcia założonego celu było przeprowadzenie dwóch badań klinicznych. W pierwszym badaniu Doktorantka sprawdzała, czy spożycie truskawek podnosi zdolność antyoksydacyjną osocza na czczo u osób pozostających na diecie zubożonej w polifenole, zaś w drugim reakcję organizmu na spożycie truskawek u osób pozostających na swojej zwykłej diecie. W celu wyeliminowania wpływu kwasu moczowego, gromadzącego się w osoczu krwi po spożyciu truskawek w wyniku metabolizowania zawartej w nich fruktozy, oznaczenia potencjału antyoksydacyjnego wykonywano w osoczu natywnym oraz pozbawionym kwasu moczowego.

Pomimo dość obszernej literatury wskazującej na pozytywny wpływ składników bioaktywnych zawartych w truskawkach na mechanizm ich prozdrowotnego oddziaływania na żywe organizmy, opinie dotyczące wpływu spożycia truskawek na wzrost zdolności antyoksydacyjnej osocza, a w szczególności na rozmiar i trwałość tego efektu, istotnie między sobą się różnią. Przyjęty w rozprawie zakres badań klinicznych i analitycznych wydaje się być jak najbardziej adekwatny dla wyjaśnienia, na ile związki polifenolowe występujące w owocach truskawek są w stanie wpłynąć na podniesienie potencjału antyoksydacyjnego osocza i w jakim stopniu efekt ten zależy od czasu trwania interwencji dietetycznej. Uzyskanie odpowiedzi na tak postawione pytania uważam za bardzo istotne, aby można było przekazać wiarygodne informacje świadomemu konsumentowi, który chciałby wykorzystując naturalne zasoby żywieniowe lepiej dbać o swoje zdrowie.

Praca została przygotowana w staranny, czytelny i syntetyczny sposób. Maszynopis liczy 99 stron i został przygotowany w układzie typowym, jaki stosuje się w opisie prac eksperymentalnych. Właściwa część pracy uzupełniona została rozdziałami: „Spis treści” i „Wykaz stosowanych skrótów i symboli” oraz „Spis Tabel i Rycin”, a w Załączniku zamieszczono ankietę nawyków żywieniowych. W sumie w pracy zamieszczono 15 tabel i 15 rycin. Praca posiada streszczenie w języku polskim.

W liczącym 18 stron rozdziale „Wstęp” Autorka w ciekawy sposób wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy opisując pochodzenie i cechy jakościowe truskawek, uwzględniając grupy składników chemicznych kojarzone z właściwościami prozdrowotnymi omawianego gatunku. Aktualny stan piśmiennictwa wskazujący na prozdrowotny wpływ fitozwiązków zawartych w truskawkach Autorka przedstawiła w trzech obszernych tabelach. Zestawienia te pozwalają

czytelnikowi zapoznać się z zakresem oraz wynikami badań prowadzonych w omawianym temacie z wykorzystaniem metod *in vitro*, na zwierzętach oraz w badaniach klinicznych, w bardzo syntetyczny i przystępny sposób. Przyjęty w pracy numeryczny schemat przywoływania cytowanych pozycji literaturowych, z jednej strony pozwala na ograniczenie objętości pracy, z drugiej jednak strony może nastręczać trudności w weryfikowaniu listy i na taki problem natknęła się Doktorantka, przytaczając na przykład trzy prace pod dwoma numerami (14 i 19, 13 i 24 oraz 8 i 49). Z kolei numery 160 i 161 pominięto w spisie, zaś kilka innych prac wylistowanych na przykład pod numerami 89 i 91, nie zostało przywołanych w tekście. Zauważona przeze mnie niedoskonałość to tylko margines przedstawionego piśmiennictwa, które będąc zestawieniem dla pracy o charakterze interdyscyplinarnym, zostało bardzo dobrze dobrane i zrównoważone pod względem udziału charakterystyki chemicznej badanego gatunku oraz aspektów medycznych.

Kolejny rozdział opracowania to „Założenia i cel pracy”, w którym Doktorantka odnosząc się do aktualnego stanu wiedzy w zakresie metabolizmu podstawowych składników truskawek, wskazując rozbieżności literaturowe, jasno sprecyzowała obszar badań będący przedmiotem rozprawy.

Rozdział „Materiał i Metody”, liczący 22 strony rozpoczyna się od szczegółowej charakterystyki truskawek, które zostały wykorzystane w testach klinicznych. Sposób przygotowania i analizy próbek owoców został przedstawiony w wyczerpujący sposób, przekonując o wysokiej jakości i jednorodności składu chemicznego materiału roślinnego. Nasuwa się jednak pytanie, dlaczego Doktorantka użyła do testów owoców w uprawy ekologicznej, który to sposób uprawy co prawda kojarzony jest z wyższą „zdrowotnością” produktów żywnościowych, nie jest on jednak powszechny. Owoce ekologiczne są relatywnie mało dostępne dla przeciętnego konsumenta, a nawet gdy są dostępne, zwykle są droższe od owoców z upraw klasycznych. Wątek ten nie został poruszony ani we wcześniejszym wprowadzeniu, ani kontynuowany w dalszej części pracy. Pewną refleksję budzi też ilość zabezpieczonych owoców. Dlaczego Doktorantka charakteryzuje ponad 500 kg owoców, podczas gdy do zabezpieczenia badań z dużym marginesem bezpieczeństwa wystarczyłoby mniej niż połowa tej ilości. Uściślenia wydaje się też wymagać opis metod analitycznych wykorzystanych do scharakteryzowania składu chemicznego owoców. Czy naprawdę próbki po oznaczeniu zawartości kwasów i cukrów poddawano liofilizacji aby w nich oznaczyć związki polifenolowe, czy raczej robiono to na równoległych próbkach materiału.

W dalszej części metodyki Doktorantka opisuje grupę badaną, która wzięła udział w doświadczeniach klinicznych oraz przyjęte protokoły badawcze. W protokole badania 2 nie znalazłam bliższych informacji na temat zasad przyjętych przy podawaniu jednorazowej doustnej dawki witaminy C. Opis zastosowanych metod analitycznych jest przedstawiony w sposób logiczny i potwierdza dobrą znajomość warsztatu analitycznego Doktorantki, a zastosowane metody oznaczeń i detekcji odpowiadają aktualnym standardom analitycznym. Na tym tle jako dysonans przedstawia się opis obliczania wyników stężeń polifenoli, gdzie nastąpiła rozbieżność pomiędzy prezentowaniem jednostek dla wzorców w mg/l i wyrażaniem stężeń w $\mu\text{mol/l}$ lub $\mu\text{mol/g}$. Opatrzanie przywoływanych równań jednostkami ułatwiłoby prześledzenie poprawności stosowanego schematu przeliczeń. Moje inne drobne uwagi dotyczą pisowni wzorców związków polifenolowych, gdzie dla kwasu wanilinowego i homovanilinowego używano błędnie określeń ‘waniliowy’ i homovaniliowy; z kolei dla kwasu kawowego korzystne byłoby podanie również pełnej nazwy chemicznej: kwas 3,4-dihydroksycynamonowy. W pracy wymiennie używano określenia ‘kontrola negatywna’ i ‘próba ślepa’, z których to określeń częściej stosowane jest to drugie.

Dobór zastosowanych metod statystycznych i sposobu oceny istotności różnic jest prawidłowy, choć celowym byłoby uzupełnienie informacji o użytym modelu analizy wariancji, gdyż z tekstu nie wynika, czy była to ANOVA powtarzanych pomiarów. W zestawieniach tabelarycznych oprócz wyników wartości średnich podawano wartości mediany, co ułatwia interpretację wyników, jednak dla pełnej poprawności interpretacji statystycznej, w opisie tabel i rysunków zabrakło informacji, z których testów (Scheffe’a czy Friedmana) korzystano w przypadku poszczególnych zestawień.

Uzyskane w pracy wyniki zostały opisane w rozdziale zatytułowanym „Wyniki”, liczącym 20 stron. Przyjęty jednolity schemat prezentacji w postaci tabel i rycin dobrze ilustruje zaobserwowane zależności. Szukając form syntetycznego sposobu przedstawienia wyników w moim odczuciu można było rozważyć zastąpienie długich słownych form opisu protokołów badania elementami graficznymi, przynajmniej w przypadku rycin, co ułatwiłoby czytelnikowi dotarcie do właściwej interpretacji zawartych w danym obiekcie treści. Ale jest to jedynie uwaga o charakterze dyskusyjnym.

Kolejnym rozdziałem pracy jest „Dyskusja”. Rozdział ten liczy 10 stron i jest podzielony na podrozdziały, co umożliwia łatwe dotarcie do właściwego fragmentu. Autorka odnosi się do uzyskanych w swoich badaniach wyników porównując je do danych literaturowych. Czytelnikowi łatwiej byłoby podążać za tokiem myślenia, gdyby za każdym razem w tekście

podano numery tabel i rycin, których dotyczy dyskusja. W punkcie, gdzie Autorka odnosi się również do wyników swoich wcześniejszych prac, wykonywanych wspólnie z zespołem, odbiór dyskusji staje się coraz trudniejszy, zwłaszcza, że uzyskane wyniki wymagają porównań w wielu płaszczyznach. Cennym elementem Dyskusji jest przeprowadzona przez Doktorantkę synteza uzyskanych wyników. Wychodząc z teoretycznego opisu prawdopodobnego mechanizmu wzrostu zdolności antyoksydacyjnej osocza po spożyciu truskawek, Doktorantka bardzo rzeczowo interpretuje zidentyfikowane w czasie badanej przez siebie interwencji dietetycznej zjawisko obniżenia zdolności antyoksydacyjnej. Przedstawiony opis zaobserwowanych zależności jest przekonujący i wskazuje na dojrzałość badawczą Doktorantki oraz posiadanie dużej wiedzy teoretycznej. Dyskusja kończy się zastrzeżeniem o ograniczeniach, które należy uwzględnić przy interpretacji wyników, takich jak na przykład mała liczebność próby.

Na podstawie przedstawionego omówienia i dyskusji wyników Doktorantka formułuje cztery proste i uzasadnione wynikami wnioski, które w pośredni sposób odpowiadają na większość postawionych w celu pracy pytań. Pytanie o wpływ jednorazowej dawki witaminy C odpowiadającej ilości tej witaminy w 500 g truskawek w tym rozdziale pracy pozostaje bez odpowiedzi, a szkoda, bo odpowiedź na to pytanie została wcześniej zawarta w tekście. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski uważam za bardzo ciekawe i cenne z metodologicznego punktu widzenia, gdyż zwiększają aktualny stan wiedzy nad możliwym metabolizmem składników bioaktywnych truskawek i dają podstawy do konstruowania bardziej zaawansowanych i szerzej zakrojonych badań, wskazując osocze pozbawione kwasu moczowego jako optymalny materiał do monitorowania wpływu interwencji dietetycznej na całkowitą aktywność krążących antyoksydantów.

W rozdziale Piśmiennictwo zostało przywołane 159 pozycji literaturowych. Praktycznie w całości jest to literatura anglojęzyczna, aktualna i prawidłowo dobrana. W końcowej części pracy pewnemu zaburzeniu uległa numeracja cytowanych prac, co zapewne wynika z wprowadzanych kolejnych poprawek, ale oczywiście nie umniejsza to wartości merytorycznej zgromadzonego materiału źródłowego.

Pod względem językowym i edytorskim praca została przygotowana z dużą starannością. Na pewno wiele trudu kosztowało Autorkę przygotowanie tekstu specjalistycznego w taki sposób, aby mógł on być zrozumiany również przez osoby bez wykształcenia medycznego. Uważam, że jest to kwestia godna podkreślenia, szczególnie, że praca powstała w wyniku realizacji

projektu interdyscyplinarnego i jej wyniki stanowią obiekt zainteresowania specjalistów wielu dziedzin, w tym chemii, ogrodnictwa oraz dietetyków.

Pomimo niewątpliwie dużego wysiłku, jaki Autorka włożyła w przygotowanie tak syntetycznego opracowania, w pracy znalazłam pewne drobne błędy i uchybienia. O części z nich, już wspominałam omawiając poszczególne rozdziały pracy, zaś poniżej przytoczę te o charakterze edytorskim.

Niepoprawnie przytoczono nazwę związku jako 'kamferol' – powinno być kemferol. W niektórych miejscach użyto określenia 'ellagotanina' zamiast elagotanina. Analogiczny błąd wynikający z zamieszania pisowni polskiej i angielskiej dotyczy pojęcia 'eicosanoidy' zamiast 'eikozanoidy'. Dość często w maszynopisie widoczny jest błąd edytorski stosowania kropki zamiast przecinka jako znaku dziesiętnego, co nie jest prawidłowe w pisowni polskiej. Również niezgodnie z zasadami pisowni polskiej, do wyrażaniu stężeń dla jednostek litr, zamiast czcionki zwykłej, stosowano duże L, tak jak to jest przyjęte w literaturze anglojęzycznej. Autorka zaniechała też przyjętej w pisowni zasady wyróżniania kursywą słów łacińskich, takich jak *in vivo* i *in vitro*. W Tabeli 6 nie zamieszczono objaśnień dla użytych skrótów, a w równaniu krzywej kalibracyjnej nie objaśniono, co przyjęto jako zmienną niezależną. W rycinach ilustrujących wyniki badania 1 i 2 niekonsekwentnie zastosowano znaki graficzne przyjęte dla grupy badanej i kontrolnej.

Podsumowanie recenzji

Podsumowując swoją opinię o przedstawionej mi do recenzji rozprawie uważam, że praca stanowi oryginalne rozwiązanie prawidłowo zidentyfikowanego i sformułowanego celu badawczego. Właściwie dobrano metodykę badań, wyczerpująco zaprezentowano wyniki, przeprowadzono dyskusję i wyciągnięto prawidłowe wnioski. Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r., z późniejszymi zmianami (Dz. U. 2014 poz.1852). W związku z powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie pracy i dopuszczenie mgr Anny Prymont-Przymińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dorota Konopacka

Skierniewice, dnia 12.05.2017 r.