

dr hab. inż. Joanna Sadowska

Szczecin, 10.08.2017 r.

Zakład Fizjologii Żywienia Człowieka

Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominiki Sucheckiej

pt. „Antyoksydacyjne i przeciwzapalne oddziaływanie preparatu beta-glukanu z owsa
w badaniach modelowych stanu zapalnego jelita”

przygotowanej pod opieką naukową:

promotora: prof. dr hab. Joanny Gromadzkiej-Ostrowskiej

oraz promotora pomocniczego: dr hab. inż. Joanny Harasym

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl trzech recenzowanych artykułów naukowych, w skład których wchodzi:

dwie oryginalne prace twórcze, będące efektem badań przeprowadzonych w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (N N312 427440):

1. Suchecka D., Harasym J.P., Wilczak J., Gajewska M., Oczkowski M., Gudej S., Błaszczak K., Kamola D., Filip R., Gromadzka-Ostrowska J. 2015. Antioxidative and anti-inflammatory effects of high beta-glucan concentration purified aqueous extract from oat in experimental of LPS-induced chronic enteritis. *Journal of Functional Foods*, 14, 244-254 doi 10.1016/j.jff.2014.12.019 (**45 pkt. MNiSW, IF 4,269**)
2. Suchecka D., Harasym J., Wilczak J., Gromadzka-Ostrowska J. 2016. Hepato- and gastroprotective activity of purified oat 1-3, 1-4-β-d-glucans of different molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules* 91, 1177-1188 doi: 10.1016/1.ijbiomac.2016.06.062 (**35 pkt. MNiSW, IF 3,220**)

oraz jedna praca przeglądowa:

3. Suchecka D., Gromadzka-Ostrowska J., Żyła J., Harasym J.P., Oczkowski M. 2017. Selected physiological activities and health promoting properties of cereal beta-glucans. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 26, 3 xxx-xxx doi:10.22358/jafs/70066/2017 (**20 pkt. MNiSW, IF 0,751**).

Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports, znajdujących się w części A listy MNiSW. Na podkreślenie zasługują ilościowe wskaźniki charakteryzujące publikacje wchodzące w skład tego monotematycznego cyklu.

Łączna liczba punktów wyliczona w trakcie składania pracy doktorskiej wynosi 100 pkt. MNiSW, sumaryczny IF 8,240. Może ona ulec zmianie w chwili publikacji przez MNiSW listy czasopism wraz z punktacją za 2017 r., w którym planowane jest wydanie przyjętej do druku w Journal of Animal and Feed Sciences pracy przeglądowej.

Powyższe prace są autorstwa grupy badaczy - Doktorantki i trzech lub więcej współautorów. We wszystkich pracach mgr inż. Dominika Suchecka jest pierwszą autorką, a jej zadeklarowany udział w powstaniu publikacji wynosi 35-40%, co zostało potwierdzone stosownymi oświadczeniami współautorów. W jednej pracy mgr inż. Dominika Suchecka jest autorem korespondencyjnym. Wkład Doktorantki w prace oryginalne polegał głównie na przeprowadzeniu doświadczeń, wykonaniu analiz biochemicznych, opracowaniu statystycznym wyników oraz napisaniu części pracy, w tym dyskusji, oraz przygotowaniu manuskryptów prac. W artykule przeglądowym opracowała jego koncepcję, zebrała znaczną część piśmiennictwa i napisała rozdziały dotyczące działania fizjologicznego i molekularnego beta-glukanów. Z załączonych oświadczeń wynika, że mgr inż. Dominika Suchecka uzyskała efekty kształcenia przewidziane wg Europejskich Ram Kwalifikacji dla ósmego (doktoranckiego) poziomu kształcenia. Posiada umiejętność opracowania koncepcji badań, zdolność do planowania i wykonywania eksperymentów, a także opracowywania wyników oraz przygotowania artykułów do druku w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Recenzowana rozprawa jest bardzo dobrze zaplanowanym cyklem publikacji, dwa artykuły oryginalne uzupełnia praca stanowiąca kompetentny, a jednocześnie przejrzysty (co się rzadko zdarza), przegląd literatury przedmiotu.

Celem przeprowadzonych badań było zweryfikowanie postawionych przez doktorantkę dwóch hipotez badawczych:

1. suplementowanie pożywienia beta-glukanami z owsa normalizuje równowagę redox, obniżając poziom stresu oksydacyjnego i nasilając obronę antyoksydacyjną, oraz łagodzi uogólniony stan zapalny,
2. a przeciwzapalne i przeciwutleniające działanie beta-glukanów z owsa zależy od ich masy molowej.

Pierwszą z cyklu publikacji stanowi wprowadzający czytelnika w przedmiot pracy starannie przygotowany artykuł przeglądowy (*Selected physiological activities and health promoting properties of cereal beta-glucans*) dotyczący prozdrowotnego działania beta-glukanów. Przedstawiono w nim źródła i fizykochemiczne właściwości beta-glukanów,

możliwość ich wiązania z receptorami umiejscowionymi na komórkach immunologicznych, m. in. granulocytach, monocytach, makrofagach i komórkach NK. Omówiono mechanizmy działania prebiotycznego, immunomodulującego, antyoksydacyjnego i przeciwzapalnego. Dzięki temu mogą one pełnić istotną rolę w prewencji dietozależnych schorzeń wywołanych stanem zapalnym. Artykuł oparto na 60 pracach ściśle związanych z omawianym tematem, ponad połowę stanowią prace z ostatnich 5 lat, literatura jest dobrze dobrana, aktualna i starannie zgromadzona.

Druga praca (*Antioxidative and anti-inflammatory effects of high beta-glucan concentration purified aqueous extract from oat in experimental model of LPS induced chronic enteritis*) jest artykułem oryginalnym, w którym przedstawiono wyniki przeprowadzonych badań dotyczących wpływu suplementacji diety beta-glukanami o dużej i małej masie molowej na równowagę redoks i profil leukocytów krwi obwodowej szczurów z wywołanym stanem zapalnym jelit. Uzyskane wyniki wykazały, że dodatek beta-glukanów pochodzących z owsa, do spożywanego przez zwierzęta pokarmu, zmniejszał u zwierząt z wywołanym *enteritis* stres oksydacyjny mierzony we krwi obwodowej, a wpływ obu frakcji był nieco odmienny, zależny od masy molowej. Obydwie frakcje obniżały stężenie TBARS oraz normalizowały stężenie GSH, aktywność SOD oraz całkowity potencjał antyoksydacyjny DPPH. Beta-glukany o dużej masie molowej obniżały także stężenie nadtlenków lipidowych oraz oksysteroli we krwi szczurów z wywołanym *enteritis*. Korzystne zmiany potencjału antyoksydacyjnego obserwowano także u zwierząt kontrolnych, zdrowych, co wskazuje na pozytywne działanie beta-glukanów nie tylko w stanach patologicznych, ale także fizjologicznych. Obydwie frakcje beta-glukanów prowadziły także do zmniejszenia liczby limfocytów T, B, Tc oraz granulocytów, co świadczy o ich działaniu przeciwzapalnym, specyficznym jednak zależnym od masy molowej. Wpływ beta-glukanów o małej masie molowej był prawie tak silny jak beta-glukanów o dużej masie molowej.

Rozszerzeniem i uzupełnieniem realizowanego tematu jest trzeci artykuł (*Hepato- and gastroprotective activity of purified oat 1-3, 1-4-β-d-glucans of different molecular weight*), w którym zweryfikowano antyoksydacyjny wpływ beta-glukanów w stosunku do tkanek żołądka i wątroby szczurów z indukowanym *enteritis*. Uzyskane wyniki wskazują, że beta-glukany, niezależnie od masy molowej, wpływały na wzrost potencjału antyoksydacyjnego badanych tkanek i przywracały w nich równowagę redoks. Prowadziło to do zmniejszenia utleniania związków lipidowych. Wykazany w przeprowadzonych badaniach wpływ przeciwutleniający i immunomodulacyjny dla frakcji beta-glukanów o małej masie molowej

ma istotne znaczenie praktyczne, ponieważ frakcja ta może mieć szersze zastosowanie technologiczne w produkcji żywności, ze względu na większą rozpuszczalność i mniejszą gęstość jej wodnych roztworów. Niezbędne są dalsze badania, ponieważ należy potwierdzić wpływ beta-glukanów obserwowany w niniejszych badaniach modelowych, przeprowadzonych na szczurach, także u ludzi, u których mogą one mieć jednak inną aktywność biologiczną ze względu na nieco inne warunki panujące w przewodzie pokarmowym, miejsce i liczbę kępek Peyera oraz odmienną mikroflorę przewodu pokarmowego. Uzyskane wyniki są jednak bardzo obiecujące.

W omawianych artykułach uwagę zwracają liczne ryciny, które w całości odzwierciedlają omawiane tematy i jednoznacznie ilustrują wyniki badań otrzymane przez Doktorantkę.

Pan mgr inż. Dominika Suchecka załączone prace opatrzyła obszernym opisem obejmującym 32 strony maszynopisu. Opracowanie zostało przygotowane zgodnie z wymogami i podziałem stawianymi pracom doktorskim. W skład opracowania wchodzi: streszczenie w jęz. polskim i angielskim - 1 strona, wykaz stosowanych skrótów - 1 strona, wstęp - 1,5 strony, uzasadnienie podjętego tematu w oparciu o dane literaturowe - 7,5 strony, cel i zakres badań oraz hipotezy badawcze - 1 strona, metodyka badań - 3 strony, omówienie głównych wyników prac eksperymentalnych - 4 strony, podsumowanie i dyskusja - 5 stron, wnioski - 0,5 strony oraz bibliografia licząca 44 pozycje literaturowe - 4,5 strony.

Moje uwagi do tej części pracy dotyczą miejsca zamieszczenia streszczenia oraz przejrzystości rozdziału Metodyka. Dość nietypowe jest zamieszczenie streszczenia na początku opracowania, jako pierwszy punkt pracy, ale być może wynika to z zasad obowiązujących w SGGW. Natomiast zamieszczenie w rozdziale Metodyka stosownego schematu przeprowadzonego doświadczenia, które stało się podstawą do napisania pierwszego artykułu oryginalnego, którego układ był dość skomplikowany, zdecydowanie poprawiłoby czytelność tej części opracowania.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na pewne drobne błędy natury redakcyjnej czy nieścisłości dostrzeżone w maszynopisie:

*na stronie tytułowej błędnie wpisano nazwę jednostki, w której pracuję, powinno być „Zakład Fizjologii Żywienia Człowieka”

* w spisie literatury skrót GSH opisany jest jako „glutation”, wg mnie powinno być „glutation zredukowany”

- *na str. 24 w tab. 1 brakuje nagłówka w pierwszej kolumnie, proponowałabym „Właściwość”, podobnie na str. 28 w tab. 2 brakuje nagłówka w pierwszej kolumnie, proponowałabym „Składnik”, nagłówków brakuje także w tab. 3 i 4 (str. 28). W tytule tab. 3 na str. 28 zabrakło słowa „mineralnych”, przedstawia ona „Skład mieszaniny makroskładników mineralnych”, a nie jak podaje Autorka „Skład mieszaniny makroskładników”
- *w opisie Autorka powołuje się na niewłaściwe numery poszczególnych rozdziałów: na str. 25 w wierszu 4 Autorka powołuje się na rozdziały 1.2.3 i 1.2.4, w rzeczywistości dotyczy to rozdziałów 2.2.3 i 2.2.4., na str. 29 Autorka powołuje się na rozdział 1. „Uzasadnienie podjętego tematu...” podczas gdy w pracy jest to rozdział 2, podobnie na str. 30 „Metodyka” podawana jest jako rozdział 4, w pracy jest to rozdział 5
- *na str. 25 w wierszu 25 Autorka pisze, że „iniekcyjne podania LPS wywołało zmiany histopatologiczne w jelicie szczurów, przede wszystkim w odcinku jelita krętego”, powołując się na ryc. 1 ze str. 26, natomiast na cytowanej rycinie umieszczono zdjęcia mikroskopowe, które opisano jako barwione skrawki jelita grubego
- *na str. 30,32,33,34,36 (oraz w opublikowanej pracy eksperymentalnej) pojawia się nazwa 25-dihydroksycholesterol, wg mnie powinno być 25-hydroksycholesterol
- *na str. 32 pojawia się niezręczne wg mnie sformułowanie „substancji TBARS”, skrót TBARS zawiera słowo „substancje” (*Thiobarbituric acid reactive substances*)
- *nie zawsze przestrzegane są zasady interpunkcji (w streszczeniu, na str. 16,20,21,22,23,29,33,37,38), najczęściej błędy te polegają na braku przecinka po wprowadzeniu zdania wtrąconego
- *w pracy znajdują się błędy edytorskie (na str. 17 w 13 wierszu brakuje „że”; na str. 32 w 9 wierszu jest „mała” powinno być „małą”, na str. 33 w 4 wierszu od dołu jest „małej” powinno być „małej”, na str. 34 w 11 wierszu pojawia się zbędne „w”, na str. 35 w 6 wierszu od dołu jest „we obu narządach” powinno być „w obu narządach”, na str. 36 w 5 wierszu od dołu jest „frakcj” powinno być „frakcji”),
- *błędy w cytowaniu literatury:
 - na str. 17 cytowana jest poz. Butt i in. 2007 powinno być Butt i in. 2008
 - na str. 34 jest Koutroubakis i in. 2007 powinno być Koutroubakis i in. 2004
- *błędy w spisie literatury:
 - w poz. 4 po tytule pracy powinna być kropka jest przecinek
 - w poz. 18 tytuł czasopisma pisany jest małymi literami

w poz. 41 w tytule czasopisma przymyki of i and pisane są wielką literą, powinny być pisane małymi literami.

Błędy te w żaden sposób nie umniejszają jednak wartości merytorycznej pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Mam także pytanie: co Autorka miała na myśli pisząc na str. 31 w wierszach 8/9 „podawanie tej diety zwierzętom kontrolnym prowadziło do znormalizowania całkowitego statusu antyoksydacyjnego osocza TAS”?

Pragnę także podzielić się moimi wątpliwościami: dotyczą one wniosku pierwszego, w którym Autorka napisała: „beta-glukany izolowane z owsa o dużej lub małej masie molarnej stosowane jako dodatek pokarmowy wykazują w różnych narządach działanie przeciwzapalne i przeciwutleniające”, wg recenzenta na podstawie przeprowadzonych badań (*in vivo*) i wyników uzyskanych przez Autorkę można mówić o ich wpływie przeciwzapalnym i przeciwutleniającym, wywieranym pośrednio, poprzez stymulację określonych mechanizmów obrony antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej. W przeprowadzonych badaniach nie było to działanie bezpośrednie, które można zaobserwować w badaniach *in vitro*, określając bezpośredni potencjał antyoksydacyjny beta-glukanów. W tej sytuacji słowa „wpływ” i „działanie” wg mnie nie będą synonimami.

Podsumowując: część teoretyczna przedstawiona w pracy przeglądowej nie budzi zastrzeżeń. Jest dobrze osadzona w obszernej i trafnie dobranej literaturze przedmiotu. Część doświadczalna jest przedstawiona jasno i przejrzysto. Hipotezy badawcze zostały jednoznacznie sformułowane i prawidłowo zweryfikowane. Badania przeprowadzono z dużą dbałością, przy pomocy dobrze dobranych, aktualnych metod badawczych. Analizę statystyczną przeprowadzono rzetelnie, z wykorzystaniem w pełni adekwatnych metod, a interpretacja wyników, wykonana z dużą starannością, pozwoliła na sformułowanie wniosków, które nie wykraczają poza uzyskane wyniki, są wyważone i korespondują z celem badań, jaki nakreśliła sobie Doktorantka. Praca wnosi nowe elementy wiedzy z zakresu mechanizmów prozdrowotnego działania beta-glukanów o różnej masie molarnej wyizolowanych z owsa i może mieć wartość aplikacyjną. Wynika to z faktu, że dotychczasowe badania koncentrowały się głównie na beta-glukanach pochodzących z drożdży i grzybów, praktycznie nierozpuszczalnych w wodzie, co limituje możliwość ich wykorzystania w technologii żywności. Dobrze udokumentowany jest także udział beta-glukanów o dużej masie molarnej pochodzących z owsa w łagodzeniu stanów zapalnych jelit i śluzówki żołądka oraz we wzroście odporności immunologicznej. Wyniki uzyskane przez

Doktorantkę wskazują, że podobny wpływ mają także beta-glukany o małej masie molowej, które są korzystniejsze z punktu widzenia technologicznego – jest to bardzo istotny wniosek, poszerzający wiedzę z zakresu właściwości i wpływu beta-glukanów na organizm oraz świadczący o innowacyjnym charakterze badań.

Przedstawiona do oceny praca mgr inż. Dominiki Suheckiej pt. „Antyoksydacyjne i przeciwzapalne oddziaływanie preparatu beta-glukanu z owsa w badaniach modelowych stanu zapalnego jelita” spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. Ustaw nr 164 poz. 1365) wraz z późniejszymi zmianami, stawiane pracom doktorskim. Jest także zgodna z wymaganiami zamieszczonymi w Uchwale nr 3/2016 Rady Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji z dnia 7 września 2016 r. w sprawie przewodów doktorskich na Wydziale Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, SGGW w Warszawie. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, SGGW w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Dominiki Suheckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

ZAKŁAD FIZJOLOGII
Żywności Człowieka

dr hab. inż. Joanna Sadowska