



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Zakład Chemii Medycznej
Wydział Farmacji, Biotechnologii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej
Adres: 70-111 Szczecin, Al. Powstańców Wlkp. 72
Tel./fax: (91) 466-16-44 / 466-16-41
Kierownik: prof. dr hab. Izabela Gutowska

Szczecin, 10.11.2024

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Nikoli Sadowskiej pod tytułem:

" Wpływ kultur probiotycznych i biofortyfikacji mleka selenem na biodostępność i stężenie tego pierwiastka i jego wybranych antagonistów w mlecznych napojach fermentowanych "

Promotor rozprawy: prof. dr hab. inż. Agnieszka Tomza-Marciniak

Narażenie organizmów żywych na działanie toksycznych pierwiastków związane jest z ich wnikaniem do ustroju z powietrzem, wodą i żywnością. Ich szkodliwe działanie głównie wynika z wypierania metali II wartościowych z miejsc aktywnych enzymów i blokowania ich działania oraz z wytwarzania reaktywnych form tlenu m.in. w reakcji Fentona. Dlatego zdolność mikroelementów, w tym Se, do redukcji toksyczności niektórych metali jest obiektem badań od wielu lat. Se wykazuje zdolność tworzenia z jonami metali ciężkich równomolowych kompleksów, które są selektywnie wiązane z białkami osocza. Wydaje się, że tworzenie określonego kompleksu Se-metal - białko może skutkować przekierowaniem skompleksowanego metalu na inne szlaki metaboliczne niż te, którymi podążają jego wolne formy, a tym samym zmianę dystrybucji narządowej danego metalu. Również organiczne związki Se mają zdolność wiązania metali ciężkich, dzięki obecności zjonizowanej postaci tego pierwiastka. Przykładem może być tutaj selenocysteina, która jest silnym nukleofilem i z łatwością przyłącza do swojej cząsteczki metale elektrofilowe, takie jak rtęć (Hg), ołów (Pb) czy kadm (Cd). Natomiast dzięki wbudowaniu Se w cząsteczkę tzw. selenobiałek, wykazujących właściwości antyoksydacyjne (np. GPx czy TrxR) uczestniczy on w usuwaniu nadtlenków, tym samym chroniąc tkanki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi wywołanymi przez metale toksyczne. Wydawać by się mogło, że suplementacja Se określana często jako efektywna terapia przeciwdziałająca toksycznemu działaniu pierwiastków w ustroju jest najłatwiejszą drogą dostarczania tego pierwiastka do organizmu. Jednak tylko niewielka część Se w formie nieorganicznej, pobrana wraz z dietą wchłaniana jest do organizmu na drodze dyfuzji biernej i zostaje zmagazynowana jako rezerwa tkankowa, reszta natomiast zostaje wydalona przez organizm wraz z moczem i kałem. Dlatego też bez względu na formę i pochodzenie, Se musi zostać poddany przemianie

metabolicznej zanim zostanie wykorzystany do syntezy selenoprotein, białek o wielu ważnych dla organizmu funkcjach. Z tego też względu wzbogacanie produktów spożywczych w łatwo przyswajalne formy tego pierwiastka jest ważnym działaniem, a istotnym wkładem do wiedzy poświęconej tym interesującym zagadnieniom jest rozprawa doktorska mgr Nikoli Sadowskiej.

Układ przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej jest klasyczny i posiada powszechnie akceptowalny układ. Praca obejmuje 148 stron oprawionego, jednostronnego wydruku komputerowego formatu A4. Składa się z 23-stronicowego Wstępu, 1-stronicowego Celu pracy, rozdziału „Materiał i metody” obejmującego 15 stron, opisu uzyskanych wyników przedstawionego na 64 stronach, 13-stronicowej dyskusji, stwierdzeń i wniosków przedstawionych na 1 stronie. Rozprawę zamyka obszerny wykaz cytowanego piśmiennictwa w liczbie 272 pozycji. Pracę uzupełnia streszczenie w języku polskim i angielskim. Praca została przedstawiona w sposób staranny, nie mam zastrzeżeń do jej kompozycji oraz szaty graficznej.

We wstępie przedłożonej dysertacji Doktorantka bardzo szczegółowo charakteryzuje zagadnienia dotyczące tematu rozprawy, niezbędne do zrozumienia uzyskanych wyników badań. Posługuje się informacjami zaczerpniętymi z najnowszych doniesień naukowych. Wstęp został podzielony na podrozdziały (sześć głównych), wzbogacone o 1 rycinę oraz 2 tabele. W pierwszych trzech podrozdziałach Autorka w merytoryczny i przystępny sposób omawia właściwości chemiczne i biologiczne selenu, jego metabolizm oraz interakcje z innymi pierwiastkami, głównie wybranymi metalami toksycznymi. W kolejnych dwóch podrozdziałach skupia się na przybliżeniu czytelnikowi metabolicznych konsekwencji niedoboru oraz nadmiernego stężenia selenu w organizmie. Natomiast w ostatnim podrozdziale omawia pokarmowe źródła tego pierwiastka i czynniki wpływające na jego wchłanianie i dystrybucję w organizmie. Według Autorki produkty mleczne mogą być cennym źródłem Se w diecie człowieka, tym bardziej, że obecny w nich Se charakteryzuje się wysoką biodostępnością, wynoszącą około 50%, co wynika z wbudowania tego pierwiastka w aminokwasy – cysteinę i metioninę. Oznacza to, że bioprzyswajalność Se bezpośrednio związana jest ze stężeniem m.in. SeMet, a nie stężeniem całkowitym Se w spożywanych produktach spożywczych. Pani Magister zauważa, że efektywność wchłaniania Se zależy nie tylko od formy chemicznej i stężenia tego pierwiastka, ale również od zawartości innych pierwiastków oraz składników diety, które reagują z tym pierwiastkiem. Pokarmy wysokobiałkowe charakteryzują się relatywnie dużymi stężeniami selenu o dużej biodostępności, dlatego mleko oraz produkty mleczne są dobrym źródłem Se w diecie ludzi.

Podsumowując uważam, że część teoretyczna rozprawy napisana jest bardzo dobrze, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy w zakresie omawianych zagadnień i ma istotny związek z dalszą częścią badawczą rozprawy. W jasny i przystępny sposób Doktorantka uzasadnia wybór tematu rozprawy doktorskiej, a informacje przedstawione we wstępie świadczą o Jej odczytaniu i dużej wiedzy oraz dobrej znajomości i umiejętności wykorzystania aktualnej literatury polsko- i anglojęzycznej. Badania podjęte przez mgr Nikołą Sadowską są uzasadnione i stanowią ważny problem naukowy ze względu na poszukiwanie nowych, tanich i ogólnie dostępnych produktów spożywczych mogących zapobiegać niedoborom żywieniowym i w dłuższej perspektywie wpływać na poprawę zdrowia społeczeństwa.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawia „Cele pracy”. Mgr Nikola Sadowska w swoich badaniach podjęła się sprawdzenia, czy biofortyfikacja mleka selenem, a następnie poddanie takiego mleka działaniu bakterii probiotycznych wpływa na biodostępność i stężenie formy ogólnej Se w mleku i w mlecznych napojach fermentowanych z niego sporządzonych (kefirach i jogurtach) oraz na

biodostępność i stężenie w nich wybranych pierwiastków toksycznych. W rozdziale tym zostają również prawidłowo sformułowane hipotezy badawcze wynikające z krytycznej analizy piśmiennictwa naukowego.

Kolejny rozdział (3) zatytułowany: „Materiał i metodyka” składa się z podrozdziałów, w których w bardzo szczegółowy sposób scharakteryzowano grupę badawczą, czyli zwierzęta biorące udział w badaniu, a następnie opisano proces suplementacji zwierząt selenem, pozyskiwania od nich mleka oraz wykorzystywania takiego mleka do przygotowania produktów fermentowanych przy wykorzystaniu odpowiednich szczepów bakterii. Następnie bardzo szczegółowo opisano fizykochemiczne metody analityczne służące do charakterystyki jakościowej i ilościowej uzyskanych produktów oraz metodę, dzięki której możliwe było określenie biodostępności badanego selenu, a także wybranych pierwiastków, w tym toksycznych. Rozdział kończy omówienie etapów analizy statystycznej i kryteriów doboru odpowiednich testów statystycznych. Wszystkie zastosowane laboratoryjne metody badawcze są obecnie powszechnie wykorzystywane w badaniu jakości produktów spożywczych i zostały prawidłowo dobrane oraz opisane, co gwarantuje wiarygodność uzyskanych wyników. Umiejętność przeprowadzenia tak różnorodnych oznaczeń świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do dalszej pracy naukowej. Analiza statystyczna również została przeprowadzona i opisana prawidłowo. Dodatkowo rozdział ten został wzbogacony o przygotowany przez Doktorantkę schemat symulowanego trawienia *in vitro*, znacznie ułatwiając zrozumienie opisanych procedur. Rozdział ten został rzetelnie przygotowany, a informacje w nim zawarte stanowią doskonale wprowadzenie czytelnika do śledzenia późniejszej dyskusji otrzymanych wyników.

Suplementacja krów Se odbyła się za zgodą lekarza weterynarii, który u krów zdiagnozował niedobór tego pierwiastka. Ponieważ doustna suplementacja Se nie jest procedurą w rozumieniu ustawy o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych [Dz.U.2015, poz. 266], badania te nie wymagały zgody komisji etycznej ds. badań na zwierzętach, co zostało przez Doktorantkę wskazane w dysertacji.

Mam jednak kilka uwag do tej części pracy. W tej części pracy zamieszczono tabelę z częścią wyników analiz fizykochemicznych mleka uzyskanego od krów przed i po suplementacji selenem. Według recenzenta tabela ta powinna znaleźć się już w rozdziale „Wyniki”, gdyż znajdują się w niej rezultaty stanowiące pierwszy etap doświadczenia, określający m.in. długość procesu suplementacji zwierząt w celu uzyskania odpowiedniego stężenia selenu w mleku, które jest wyjściowym substratem do produkcji produktów fermentowanych.

Podrozdział „3.6 Odczynniki” został zamieszczony przed rozdziałem opisującym metodę określania biodostępności pierwiastków. Zwyczajowo taki podrozdział rozpoczyna część metodyczną pracy i zawiera opis wszystkich zastosowanych odczynników z określeniem firm, dzięki czemu w dalszej części pracy nie jest już konieczne umieszczanie przy każdym opisie używanych odczynników ich pochodzenia i taki tekst staje się łatwiejszy do czytania.

Prosiłabym również o wyjaśnienie, dlaczego w analizie statystycznej w przypadku oznaczenia stężeń pierwiastków będących poniżej granicy wykrywalności (LoD) do obliczeń stosowano wartość stanowiącą połowę LoD dla danego pierwiastka. Nie zostało to wyjaśnione i uzasadnione.

Podsumowując tę część pracy należy podkreślić, że grupy badane oraz materiał i metodyka badań zostały właściwie dobrane i pozwoliły na rozwiązanie założonego problemu badawczego. Badania te wpisują się w nurt poszukiwania i tworzenia żywności funkcjonalnej, która w łatwy i prosty, ale także bezpieczny sposób uzupełniałaby niedobory żywieniowe człowieka, wpływając na poprawę i utrzymanie dobrego stanu zdrowia, a umiejętność zaplanowania i przeprowadzenia takich badań wskazuje na wysoki potencjał Doktorantki w obszarze działalności naukowej.

Wszystkie procedury eksperymentalne zostały wyczerpująco opisane, a analiza statystyczna wyników została przeprowadzona prawidłowo.

Rozdział „Wyniki” zawiera dużo cennych danych, które stanowią bardzo dobry materiał do publikacji w znaczących czasopismach z Impact Factor. Tak szeroki wachlarz podjętych badań pozwolił uzyskać interesujące wyniki przedstawione na 22 starannie przygotowanych rycinach oraz w 39 tabelach. Autorka opisała je w sposób przejrzysty. Bardzo dobrym pomysłem było również podzielenie tego rozdziału na podrozdziały, w których skupiono się na omówieniu wyników poszczególnych aspektów pracy, co ułatwia śledzenie i analizowanie uzyskanych wyników. Na uwagę zasługuje ogrom pracy, jaką Doktorantka włożyła w pobór i przygotowanie próbek do badań, a następnie w wykonanie ogromnej ilości analiz laboratoryjnych. Wskazuje to na dobre przygotowanie mgr Nikoli Sadowskiej do pracy laboratoryjnej i naukowej.

Uwagi do tej części pracy dotyczą tylko nielicznych błędów stylistycznych popełnionych przez Autorkę

Podsumowując tę część pracy należy stwierdzić, że Doktorantka dobrze poradziła sobie z interpretacją tak wielu parametrów oraz zależności między nimi. Również sposób prezentowania wyników jest przejrzysty i ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z rezultatami przeprowadzonych analiz (np. używanie wartości procentowych przy omawianiu stężenia badanych pierwiastków w produktach przed i po suplementacji selenem).

Według Recenzenta najważniejszym merytorycznym kryterium oceny pracy doktorskiej jest umiejętność krytycznej oceny uzyskanych wyników badań własnych na tle dostępnego piśmiennictwa naukowego oraz wyciągnięcie wniosków będących odpowiedzią na postawione hipotezy badawcze / pytania badawcze. Doktorantka tę część pracy w rozdziale „Dyskusja” przeprowadziła rzetelnie i na bardzo dobrym poziomie naukowym, a uzyskane wyniki prawidłowo zinterpretowała. To, co zasługuje na podkreślenie to fakt, że Autorka przeprowadziła bardzo szeroki panel badań, a w związku z tym, przedyskutowanie tak zróżnicowanych wyników nie było łatwe. W dyskusji dokonano wyczerpującej interpretacji poczynionych spostrzeżeń przy jednoczesnym zachowaniu krytycyzmu naukowego. Przeprowadzona przez mgr Nikolę Sadowską dyskusja na tle bogatego piśmiennictwa świadczy o bardzo dobrej znajomości analizowanej tematyki badawczej.

W Rozdziale 6. przedłożonej dysertacji zatytułowanym „Stwierdzenia i Wnioski” Doktorantka sformułowała pięć stwierdzeń oraz 1 wniosek końcowy wynikający z przeprowadzonych badań. Stwierdzenia mogą stanowić pewnego rodzaju podsumowanie uzyskanych wyników i wskazanie najważniejszych zależności, co jest dobrym pomysłem szczególnie przy uzyskaniu tak dużej liczby rezultatów i przeprowadzeniu szeregu analiz statystycznych. Mgr Nikola Sadowska wykazała się w tym przypadku cenną dla każdego badacza umiejętnością wyławiania z ogromnej masy danych tylko istotnych informacji z punktu widzenia rozwiązania problemu badawczego. Ważne jest również krytyczne podejście do potwierdzenia założonych na początku hipotez badawczych, co Doktorantka zrobiła, wskazując, że przeprowadzone badania pozwoliły na potwierdzenie jedynie pierwszej hipotezy zakładającej zwiększenie stężenia biodostępnej formy Se w kefirach i jogurtach po biofortyfikacji mleka tym pierwiastkiem. Natomiast nie udało się w pełni potwierdzić dwóch pozostałych hipotez, mówiących o zmniejszeniu biodostępności Cu, Fe i Zn oraz metali toksycznych w produktach fermentowanych po biofortyfikacji mleka Se i zastosowaniem kultur probiotycznych.

Cytowane piśmiennictwo obejmuje 272 pozycje literaturowe, głównie anglojęzyczne, w większości z ostatnich kilku lat, chociaż Doktorantka doceniła także znaczące dla literatury przedmiotu prace starsze. Zostały one prawidłowo dobrane i zacytowane w tekście.

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska mgr Nikoli Sadowskiej ma dużą wartość praktyczną. Badania te wpisują się w nowoczesne trendy żywieniowe, zwracające coraz większą uwagę na korzystne właściwości fermentowanych produktów, w tym produktów mlecznych, których spożycie na całym świecie systematycznie rośnie. Dodatkowo biofortyfikacja takich produktów niesie ze sobą niezaprzeczalne korzyści odżywcze i zdrowotne związane z ich konsumpcją, sprawiając, że stają się żywnością funkcjonalną. Procesy zachodzące podczas fermentacji skutkują poprawą wartości odżywczej produktu, a także zwiększają biodostępność jego składników takich jak np. mikroelementy, witaminy czy substancje o charakterze antyoksydacyjnym. Umiejętność przeprowadzenia takich badań wskazuje na wysoki potencjał Doktorantki w obszarze działalności naukowej. Praca została przygotowana bardzo starannie, a forma edytorska nie budzi zastrzeżeń, poza drobnymi błędami, nie wpływającymi na ogólną wartość naukową pracy. Rozprawę doktorską oceniam w pełni pozytywnie. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością samodzielnego rozwiązania problemu naukowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia warunki ustawowe określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). W oparciu o powyższą opinię mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady Dyscypliny Zootechniki i Rybactwa, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Nikoli Sadowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Nikoli Sadowskiej.

Uzasadnienie wniosku: Oceniana rozprawa doktorska mgr Nikoli Sadowskiej ma dużą wartość praktyczną. Badania te wpisują się w nowoczesne trendy żywieniowe zwracające coraz większą uwagę na zdrowotne korzyści konsumpcji fermentowanych produktów, w tym produktów mlecznych. Dodatkowo biofortyfikacja takich produktów selenem wpisuje się w najnowsze osiągnięcia naukowe badaczy zajmujących się analizą korelacji pomiędzy stężeniem tego pierwiastka w surowicy a ryzykiem zachorowania na nowotwory.

Prof. dr hab. inż. Izabela Gutowska
Zakład Chemii Medycznej
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Medycznej
prof. dr hab. inż. z.c.r. Izabela Gutowska

