

Lublin, 18.12.2016

Prof. dr hab. Barbara Baraniak
Katedra Biochemii i Chemii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Józwik-Dolęby
pt. „Antyutleniające właściwości mieszanin związków fenolowych”
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja L. Dawidowicza
w Zakładzie Metod Chromatograficznych
Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie**

W ostatnich latach uwaga badaczy zwrócona jest na badanie fizjologicznie czynnych składników żywności, a najwięcej prac dotyczy ich właściwości przeciwutleniających, ponieważ powszechnie uważa się, że stres oksydacyjny jest przyczyną wielu schorzeń w tym tzw. chorób cywilizacyjnych. Działanie przeciwutleniaczy determinowane jest przede wszystkim ich strukturą chemiczną, a w metodach badania aktywności przeciwutleniającej wykorzystywane są różnorodne mechanizmy przebiegu reakcji. Na otrzymane wyniki mają jednak wpływ dodatkowe parametry, takie jak: stężenie substratów i stosowanych przeciwutleniaczy, medium reakcyjne i jego odczyn, temperatura, a w układach wieloczynnikowych oddziaływania poszczególnych przeciwutleniaczy zarówno wzajemne, jak i ze składnikami badanej matrycy. Te ostatnie są szczególnie istotne we właściwym doborze przeciwutleniaczy wprowadzanych do środków spożywczych, ponieważ występujące w żywności składniki mogą także posiadać właściwości przeciwutleniające. Do badania aktywności przeciwutleniającej zarówno pojedynczych substancji, jak i ich mieszanin wyizolowanych z różnorodnych matryc, wykorzystywanych jest wiele metod analitycznych, dlatego w ostatnich latach prowadzone są prace nad oceną stosowanych procedur, co pozwoli na standaryzację stosowanych rozpuszczalników i warunków wykonywania pomiarów.

Przedstawiona do oceny praca wpisuje się w nowoczesny kierunek badań związany z określeniem tych parametrów układu reakcyjnego, które mogą modyfikować otrzymane wyniki przeprowadzanych analiz.

Dysertacja doktorska obejmuje 251 stron tekstu, w tym 24 tabele i 137 rysunków. Autorka podała 293 pozycje literatury związanej z zagadnieniem (w tym dwa źródła internetowe i 1 Rozporządzenie Ministra Zdrowia). Cytowana literatura jest na ogół obcojęzyczna (35 pozycji w języku polskim) i jej większość, bo 59% to prace opublikowane na przestrzeni ostatnich 15 lat.

Dysertacja składa się z ośmiu ponumerowanych rozdziałów, poprzedzonych spisem treści i wstępem, zakończona podsumowaniem, wykazem literatury i wykazem skrótów (który powinien być umieszczony w na początku pracy). Brak jest streszczenia zarówno w języku polskim jak i angielskim, brak jest również wyodrębnionych wniosków wynikających z przeprowadzonych badań. Układ pracy jest na ogół typowy dla rozpraw doktorskich (wstęp, cel pracy i podsumowanie powinny być wyodrębnione jako rozdziały). Szczegółowy spis treści umożliwia szybkie odnalezienie odpowiedniego fragmentu pracy.

W przeglądzie literatury określonej jak „część literaturowa” obejmującym 59 stron, Autorka omawia reaktywne formy tlenu (wolne rodniki zaliczane są do reaktywnych form tlenu, a nie odwrotnie) – ich źródła, mechanizm powstawania i oddziaływanie na organizm człowieka, przeciwutleniacze naturalne i syntetyczne (a nie „sztuczne”) i metody oznaczania właściwości przeciwutleniających. W rozdziale tym należało rozszerzyć treści dotyczące charakterystyki i mechanizmów działania mieszanin przeciwutleniaczy objętych w części eksperymentalnej badaniami (przykłady literaturowe zostały przedstawione w tabeli 5, z czasami niezrozumiałymi wyjaśnieniami ich interakcji – np. „ekstrakt o odpowiedniej kombinacji polifenoli uzyskany w odpowiedni sposób”). Niepotrzebna jest moim zdaniem charakterystyka przeciwutleniaczy takich jak: witaminy C, A, E, kwasu foliowego, koenzymu Q czy wybranych pierwiastków. Zbędne są również schematy i szczegółowe opisy wewnątrzkomórkowych źródeł powstawania wolnych rodników (rys. 4, 5 i 6).

W rozdziale tym wyjaśnienia lub korekty wymagają następujące sformułowania:

- jak należy rozumieć „niszczenie kwasów tłuszczowych” str. 31
- enzymy katalizują przebieg reakcji np. redukcji a nie „redukują”
- boksany czy troboksany – str. 29

- na czym polega modyfikacja aparatu genetycznego komórki a na czym uszkodzanie kwasów dezoksyrybonukleinowych? str. 30
- utleniającej substancji czy utlenianej substancji? str. 32
- „kwaśne pH” str. 68
- nie należy w pracy naukowej stosować określeń potocznych, np. doniesienia, wchodzi ze sobą w reakcje, wpasowywać się w definicję, zmiatanie, zmiatacze, zajście reakcji, panuje moda, itp.
- bezpośrednio po cytatach należy podawać ich źródło

Dwie ostatnie uwagi odnoszą się także do pozostałych części pracy.

Niesformułowana hipoteza badawcza pracy zakłada, że końcowy oznaczony efekt przeciwutleniający związków wprowadzanych w charakterze przeciwutleniaczy (głównie w przemyśle spożywczym) w mieszaninie, jest, obok metody wykorzystanej do oznaczania aktywności przeciwutleniającej i warunków jej przeprowadzenia, uzależniony od interakcji składników wprowadzanej mieszaniny. W tym celu mgr Małgorzata Józwick-Dolęba oznaczyła właściwości przeciwutleniające syntetycznych i naturalnych przeciwutleniaczy i ich mieszanin, stosując różnorodne metody analityczne i zmienne warunki wykonywania oznaczeń, co przedstawiła szczegółowo w części „Cel pracy”, gdzie niepotrzebne jest tabela 10 oraz omówienia teoretyczne, ponieważ cel pracy powinien bezpośrednio wynikać z dokonanego przeglądu literatury.

W rozdziale „Materiały i metody wykorzystywane (raczej wykorzystane) w badaniach” mgr Małgorzata Józwick-Dolęba podaje wykorzystane odczynniki, opisuje skład układów pomiarowych, stosowane w pracy metody i techniki analityczne. Nasuwa się pytanie jaki był powód zastosowania w badaniach propofolu, który stosowany jest jako lek usypiający?

Część pracy „Wyniki i dyskusja” jest najobszerniejsza, bo licząca 130 stron i została podzielona na cztery rozdziały zawierające podrozdziały, w których wyodrębniono dodatkowe podrozdziały. Połączenie przedstawienia wyników z ich dyskusją znacznie zubożyło przeprowadzenie tej ostatniej. Pomimo cytowania aż 293 pozycji literaturowych Autorka stosunkowo rzadko porównuje własne wyniki z osiągnięciami innych badaczy i nie poszukuje przyczyn otrzymanych różnic czy podobieństw.

Koncepcja przedstawienia wyników i ich interpretacji należy do Autora dysertacji i Jego Opiekuna naukowego, jednak przynajmniej część wyników można było przedstawić w formie tabel, co pozwoliłoby na wykluczenie zbędnych powtórzeń i być może ułatwiłoby samej Autorce ich interpretację. Liczba przeprowadzonych wariantów eksperymentów jest bardzo duża – oznaczenia aktywności BHT i BHA i ich mieszanin o dwóch różnych wyjściowych stężeniach przeciwutleniaczy oznaczono pięcioma różnymi metodami, natomiast do oznaczenia wpływu pozostałych stężeń, rodzaju rozpuszczalnika, temperatury, pH zastosowano pomiar stopnia neutralizowania wolnego rodnika DPPH (tylko wpływ pH badano stosując także metodę pomiaru stopnia neutralizowania rodnika ABTS). Tą ostatnią metodą badano przeciwutleniający potencjał mieszaniny BHT/tymol; kwasu chlorogenowego, kwercetyny i mieszanin tych związków; kwasu galusowego, kawowego, ferulowego oraz ich dwu- i trójskładnikowych mieszanin, a w badaniach właściwości przeciwutleniających tymolu, karwakrolu i ich mieszanin zastosowano metodę pomiaru neutralizowania rodnika DPPH. Proszę o podanie kryteriów wyboru metody, jak również kryterium stosowania zróżnicowanych stężeń badanych przeciwutleniaczy w poszczególnych metodach. Wydaje się, że wykorzystanie takich samych warunków doświadczenia i stosowanie tych samych metod analitycznych znacznie ułatwia porównanie uzyskanych wyników i postulowanie przyczyn, a ponadto wyklucza wskazywanie wybranych parametrów jako przyczynę tłumaczenia zróżnicowanych wyników otrzymanych dla różnych rozpuszczalników.

Do tej części pracy nasuwają się dodatkowe uwagi:

- zadaniem Autora pracy jest omówić, przytoczyć i porównać wyniki, a nie odsyłać recenzenta do tabel czy wykresów
- podany jest niewłaściwy tytuł podrozdziału 3. 1.2.3. – opis dotyczy składników a nie struktur komórkowych
- nie można stosować określenia „metody mierzące”
- jakie było stężenie BHT w eksperymencie opisanym na rysunku 49 -0,4 mg/ml czy 4 mg/ml?- str. 120
- „przebieg pierwszego mechanizmu” str. 172 – to nie mechanizm przebiega, tylko reakcja zgodnie z poznanym mechanizmem
- prostaglandyna i histamina nie są enzymami tylko hormonami – str. 182
- skoro w wynikach i dyskusji w tytułach podrozdziałów stawiane są pytania, to należy oczekiwać udzielenia na nie odpowiedzi

Część podsumowująca, obejmująca 7 stron zawiera wiele powtórzeń z poprzednich części pracy – brakuje wyodrębnionych wniosków, które równocześnie powinny zawierać odpowiedź na pytania postawione w formie tytułów rozdziałów w części wyniki i dyskusja.

Uwagi przedstawione w ocenie pracy mają charakter redakcyjny, część z nich dyskusyjny i nie mają wpływu na pozytywną ocenę merytoryczną pracy. Oryginalność pracy polega na wykazaniu potrzeby ujednoczenia stosowania warunków i metod w celu oznaczenia aktywności przeciwutleniającej mieszanin wybranych związków poprzez badanie efektów ich współdziałania (synergizm, addytywizm czy antagonizm). Na podkreślenie zasługuje wykonanie oznaczeń pozostałości antyutleniacza w mieszaninie reakcyjnej, co pozwoliło na potwierdzenie efektów współdziałania przeciwutleniaczy uzyskanych pomiarami spektrofotometrycznymi. Badania wykonane w układach modelowych wnoszą nowe wartości w procesie wyjaśniania mechanizmów interakcji i postulowania, ale tylko postulowania ewentualnych ich działań w organizmie człowieka. Wskazanie bowiem tych oddziaływań wymaga uwzględnienia działania enzymów przewodu pokarmowego, oraz określenia oddziaływań wprowadzonych i/lub naturalnie występujących przeciwutleniaczy z natywną matrycą określonego środka spożywczego i produktów jej enzymatycznej hydrolizy w przewodzie pokarmowym.

W zastosowanych układach modelowych mgr Małgorzata Józwick-Doleba wykazała antagonistyczne oddziaływania przeciwutleniające pary syntetycznych przeciwutleniaczy BHT/BHA niezależnie od zastosowanej metody pomiaru, które ulega przekształceniu w efekt addytywny lub synergistyczny po zmianie medium reakcyjnego, pH czy temperatury. W przypadku mieszanin dwuskładnikowych przeciwutleniaczy naturalnie występujących w surowcach roślinnych (kwas chlorogenowy/kwercetyna, tymol/karwakrol) zmiana oddziaływań jest uzależniona od stosunku stężeń wyjściowych komponentów, natomiast kwasy fenolowe (ferulowy, kawowy i galusowy) w mieszaninach dwuskładnikowych wykazują efekt addytywny (bez względu na stosunek stężeń), a w układach trójskładnikowych efekt antagonistyczny. Te wyniki posiadają charakter aplikacyjny, ponieważ mogą być wykorzystane w projektowaniu środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego.

Badania zostały wykonane dużym nakładem pracy i inwencji twórczej, z wykorzystaniem nowoczesnych technik analitycznych.

Podsumowując stwierdzam, że wyniki uzyskane w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej są wartościowe i stanowią wkład w analizę działania przeciwutleniaczy stosowanych w mieszaninach (tak jak to ma miejsce w naturalnych surowcach i otrzymanych z nich produktach) oraz z uwagi na zastosowanie w badaniach poprawnych i nowoczesnych technik analitycznych.

Reasumując uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Małgorzaty Józwik-Dolęby pt. „Antyutleniające właściwości mieszanin związków fenolowych” spełnia wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnoszę o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Barbara Banasiewicz