



SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO W WARSZAWIE

WYDZIAŁ NAUK O ŻYWIENIU CZŁOWIEKA I KONSUMPCJI

Warszawa, 09.07.2019 r.

Prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska
Zakład Fizjologii Żywienia
Katedra Dietetyki
Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Angeliki Manterys pt.: „*Ocena przeciwniażdżycowego działania witaminy K₂ podawanej w formie syntetycznej oraz produktu żywnościowego natto u myszy ApoE/LDLR^{-/-}” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Renaty Kostogryś jako promotora i dr inż. Magdaleny Franczyk-Żarów jako promotora pomocniczego*

Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Podstawą formalno-prawną opracowania niniejszej recenzji było pismo Dziekan Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie dr hab. inż. Agnieszki Filipiak-Florkiewicz, prof. UR z dnia 04.06.2019 roku. Przedmiotem recenzji jest ocena czy rozprawa spełnia warunki ustawowe określone w art. 31 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2014 r. poz. 1852 z późn. zm.) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r. poz. 261).

Recenzja zawiera szczegółowo uzasadnioną ocenę spełnienia przez rozprawę doktorską warunków określonych w art. 13 ust. 1 ustawy, w szczególności czy stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie naukowej *technologia żywności i żywienia*.

Ocena wyboru tematyki rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska oparta jest na wynikach badań wykonanych w Katedrze Żywienia Człowieka Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie. Były to badania *in vivo* wykonane na podwójnie znokautowanym szczepie myszy ApoE/LDLR^{-/-}, które są jednym z najlepszych modeli stosowanych do badań nad etiologią miażdżycy. Doktorantka podjęła się ambitnych badań mających na celu określenie wpływu różnych izoform menachinonu, inaczej nazywanych witaminą K₂, pochodzenia zarówno syntetycznego, jak i stanowiącego integralny składnik produktu żywnościowego, na tworzenie i strukturę blaszki miażdżycowej.

Ze względu na fakt, że miażdżycy jest najczęstszą przyczyną powstawania schorzeń układu krążenia i największym „zabójcą” społeczeństw krajów Europy i obu Ameryk, poszukuje się skutecznych, możliwie mało inwazyjnych metod zapobiegania jej rozwojowi miażdżycy. W tym kontekście podjęcie przez Doktorantkę badań, których wyniki są przedstawione w niniejszej rozprawie uważam za wyjątkowo trafne i w pełni uzasadnione. Za szczególnie cenne uważam badanie wpływu zawartych w produktach żywnościowych różnych form menachinonu na zahamowanie rozwoju blaszki miażdżycowej.

Ocena ogólna i formalna rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Angeliki Manterys jest tradycyjnym, ale akceptowalnym przez znowelizowaną Ustawę *o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki*, opracowaniem w postaci zwartej całości o klasycznym układzie treści. Całość rozprawy to 165 stron tekstu wraz z rycinami i tabelami, drukowanych jednostronnie. Rozprawa podzielona została na kilka części (rozdziałów), w tym: „1. Wstęp” (1,5 strony), „2. Przegląd literatury” zawierający opis aktualnego stanu wiedzy dotyczącej prowadzonych badań (22 strony), „3. Cel pracy” (1 strona), „4. Materiały i metody” (24 strony), „5. Wyniki” (34 strony), „6. Dyskusja” (33 strony), „7. Wnioski” (1 strona i kilka wierszy), „8. Streszczenie” w języku polskim (niecałe 2 strony), „9. Abstract” w języku angielskim (1,5 strony), „10. Spis rycin” (3,5 strony), „11. Spis tabel” (1 strona i kilkanaście wierszy) oraz „12. Wykaz literatury” (371 pozycji, 22 strony). Rozdziały 2, 4, 5 i 6 podzielono na podrozdziały co sprawia, że tekst nabiera przejrzystości i łatwo się go czyta. Zasadniczą część rozprawy poprzedza wykaz stosowanych skrótów.

Bardzo pozytywnie odbieram stronę edytorską rozprawy. Jest ona napisana bardzo dobrze, ładną polszczyzną oraz, co bardzo cenię – właściwie pozbawiona błędów literowych i interpunkcyjnych. Świadczy to o starannym przygotowaniu tekstu do druku, jak też o szacunku dla czytelnika. Mocną stroną rozprawy jest także bogaty materiał ilustracyjny, który stanowi 42 ryciny (w tym 38 rycin to ilustracje wyników badań własnych Doktorantki) oraz 18 tabel (w tym 17 tabel zawiera wyniki badań własnych). Na uwagę zasługują bardzo dobre technicznie zdjęcia preparatów histologicznych

ona wymogi stawiane tego rodzaju opracowaniom, a edytorko jest to rozprawa bardzo dobrze przygotowana.

Ocena merytoryczna rozprawy

Do trafności wyboru tematyki rozprawy odniosłam się już powyżej. Opisany we Przeglądzie literatury aktualny stan wiedzy dotyczy etiologii i epidemiologii miażdżycy, a także modyfikowalnych i niemodyfikowalnych czynników ryzyka tych zmian w naczyniach tętniczych. Za szczególnie istotny uważam fragment, w którym Doktorantka opisuje zmiany kalcyfikacyjne w ścianie naczyń tętniczych. Bardzo obszernie opisane są też funkcje i metabolizm oraz źródła i pełnione w organizmie funkcje różnych związków określanych wspólną nazwą „witamina K”. Szczególnie dużo uwagi (i słusznie) poświęciła Autorka rozprawy formie długołańcuchowego menachinonu-7. Co szczególnie istotne Doktorantka zwraca uwagę na znaczenie w metabolizmie, a zwłaszcza w transporcie tego związku, apolipoproteiny E i jej polimorfizm, co może mieć bezpośrednie przełożenie na dziedziczne skłonności do pojawiania się zmian miażdżycowych w tętnicach. Sporo uwagi poświęca też Autorka ogólnej charakterystyce i właściwościom specyficznego produktu spożywczego, jakim jest soja fermentowana *natto*.

Całość tego wstępu teoretycznego do badań prowadzonych przez Autorkę rozprawy uważam za wyczerpujący, a edytorsko prawidłowo skonstruowany, ale mam też uwagi krytyczne. Nie podoba mi się określenie stosowane przez Doktorantkę stanowiące pewien rodzaj „kalki” z języka angielskiego. Chodzi mianowicie o przymiotniki określające korelacje w kontekście wzajemnych zależności pomiędzy cechami czy parametrami (zaznaczam, że nie mam tu na myśli zależności statystycznych). Doktorantka używa określenia „negatywne” lub „pozytywne”, podczas gdy kontekst zdania (np. str. 33 czy str. 102) narzuca raczej określenie „korzystne” bądź „niekorzystne”. Ponadto szkoda, że Autorka rozprawy trochę „prześlizgnęła się” po zagadnieniu fitoestrogenów zawartych w *natto* i ich wpływowi na organizm konsumenta. Jest to bardzo istotny aspekt jeżeli chodzi o ten produkt i oczekuję rozszerzenia tego tematu na obronie.

Powyższe uwagi krytyczne nie umniejszają wartości merytorycznej tej części rozprawy, którą jako recenzent oceniam wysoko.

Cel badań i hipoteza badawcza zostały sformułowane jasno, ale też mam pewną uwagę merytoryczną. W celu prowadzonych badań Autorka podaje, że oceniano między innymi „procesy antyoksydacyjne”. Nie zgadzam się z tym twierdzeniem, bowiem oceniany był tylko jeden, bardzo ogólny parametr czyli potencjał antyoksydacyjny osocza krwi i homogenatu wątroby. Tu kolejna uwaga, podana trochę przedwcześnie, bo dotyczy stosowanych metod i opisu uzyskanych wyników. Chodzi mianowicie o określenie stosowane przez Doktorantkę „tkanki wątroby” czy „tkanki wątrobowe”. Nie ma takich tkanek !!! Oznaczenia były wykonywane w homogenacie wątroby, a więc stężenia różnych związków też dotyczyły homogenatu wątroby. To też jest aspekt merytoryczny.

tego rozdziału mam jednak stosunkowo dużo uwag. Zapewne w wielu przypadkach są one polemiczne, jednak proszę o ustosunkowanie się do nich.

Badania, na podstawie których oparta oceniana dezertacja, były wykonane w trzech eksperymentach *in vivo*. Modelem doświadczalnym we wszystkich tych doświadczeniach były genetycznie modyfikowane myszy ApoE/LDLR^{-/-} z nokautem receptora LDL i apolipoproteiny E, dzięki czemu zwierzęta te spontanicznie rozwijają zmiany miażdżycowe w naczyniach (blaszkę miażdżycową) i hiperlipidemię. Eksperymenty były wykonane na zwierzętach dorosłych w wieku 16-24 tygodnie (doświadczenie I) oraz zwierzętach młodocianych w wieku 8-16 tygodni (doświadczenie II i III). Wybór szczepu i wieku myszy nie budzi zastrzeżeń ponieważ jest to model uznany i powszechnie stosowany do badań procesów aterogennych i wpływem na nie różnych czynników, m.in. żywieniowych. Należy dodać, że o przydatności tego modelu decyduje przede wszystkim podobieństwo w strukturze blaszki miażdżycowej do tej stwierdzanej u ludzi. Myszy tego szczepu w wieku 24. miesięcy mają już zaawansowane stadium blaszki miażdżycowej, a więc również z tego względu wybrany wiek zwierząt ma swoje uzasadnienie. Nie zgadzam się natomiast z twierdzeniem Doktorantki, że etiologia tych zmian u wspomnianych myszy i ludzi jest podobna (str. 35). Podwójnie znokautowane myszy ApoE/LDLR^{-/-} na skutek tej modyfikacji genetycznej spontanicznie wytwarzają określone zmiany w naczyniach, natomiast u ludzi komponenta genetyczna to stosunkowo niewielki procent niemodyfikowalnych czynników skutkujących procesem aterogennym. W większości przypadków jest wpływ różnych czynników, w tym modyfikowalnych, wśród których prym wiodą te związane z nieprawidłowym stylem życia.

Jeszcze jeden aspekt związany z zastosowanym modelem doświadczalnym budzi moje zdziwienie i o wytłumaczenie tego faktu proszę na obronie. Dlaczego do badań użyto samice? Czy i jak synchronizowane ich cykle estralne? Czy w ogóle „przejmowano się” cyklami estralnymi, związaną z nimi grą hormonalną i wpływem estrogenów na naczynia?

Kolejne moje pytanie dotyczy liczebności grup w poszczególnych doświadczeniach. Dlaczego w doświadczeniu I grupa kontrolna liczy więcej myszy? Podobnie w doświadczeniu II. Proszę o wyjaśnienie tego faktu.

Sam układ doświadczenia, schematycznie przedstawiony na rysunku nie budzi wątpliwości, niepokój budzi natomiast opis warunków w jakich były trzymane zwierzęta. To były doświadczenia żywieniowe, o czym Autorka sama pisze na str. 36 i 37 rozprawy. Dlaczego więc w trakcie doświadczeń nie kontrolowano spożycia? Jak bez oszacowania ile naprawdę zwierzęta skonsumowały można mówić o pobraniu czynnika mającego potencjalnie wpływ na proces aterogenezy, czyli witaminy K₂? Czy w tym pobieraniu i przyswajaniu pokarmu nie przeszkadzały wzbogacenia środowiska i wiórki? Jak to było wzbogacenie? Czy to nie mogło mieć wpływu na końcowe wyniki? Proszę o wyjaśnienie tej kwestii, tylko proszę nie używać jako argumentu stanowiska lokalnej komisji etycznej.

opisana, chociaż też mam tu uwagi krytyczne dotyczące przede wszystkim pobierania materiału biologicznego (str. 49): (1) dlaczego heparynę podawano dootrzewnowo (w ciągu 10 minut dwa zastrzyki dootrzewnowe!!) a nie używano probówek opłaszczonych EDTA czy właśnie heparyną? (2) jaki był powód pobierania krwi również z żyły nerkowej? Krew pobierana z prawej komory serca (to było też wykonane) jest krwią obwodową, a więc najlepszą do oznaczeń na obwodzie. I jeszcze jedno pytanie dotyczące już metod analitycznych: dlaczego stężenie glukozy we krwi, nie przeżyciowe tylko w fazie terminalnej doświadczenia oznaczano przy pomocy pasków do glukometru? To nie jest pomiar dokładny i raczej nie powinno się go stosować w oznaczeniach tego rodzaju. Jeszcze jedno: dlaczego nie wykonano oznaczenia jakiegoś markeru stanu zapalnego, jak choćby stężenia białka C-reaktywnego. Przecież proces aterogenezy to również stan zapalny.

Trzeba jednak stwierdzić, że Doktorantka bardzo napracowała się w trakcie wykonywania tych trzech doświadczeń począwszy od przygotowania *natto* zastosowanego jako dodatku do paszy zwierząt, szczegółowej charakterystyki składu tego preparatu i dalej wykonania doświadczeń i pobrania materiału biologicznego i jego chromatograficznych, spektrofotometrycznych i histologicznych oznaczeń.

Opis uzyskanych wyników jest standardowy, bogato ilustrowany wykresami i tabelami, a także, co uważam za bardzo cenne, zdjęciami preparatów histologicznych obrazujących powstałe zmiany w naczyniach. To są mocne strony rozdziału „Wyniki”, natomiast do słabych stron (to delikatnie powiedziane !!!) zaliczam nieprawidłowe opisy analizy statystycznej. Nie można twierdzić, że coś się zmieniło (np. na str. 75 i kolejnych), podczas gdy te zmiany nie były istotne. Liczne stwierdzenia Autorki rozprawy to: „było nieznacznie wyższe” lub „było nieznacznie niższe” przy braku istotności statystycznej. Na innej stronie (str. 92) „nieistotnie mniejsze”, „był nieznacznie mniejszy”. Tu możliwy był tylko wybór zero jedynekowy – albo zmiany były istotne, czyli zmiany były, albo nie były istotne, a więc tych zmian nie było. W tych przypadkach nie można nawet mówić o tendencji, bo Autorka rozprawy podaje wartości p , które o zgrozo wynoszą $p=0,09$ lub $p=0,08$. To wszystko są stwierdzenia nieprawdziwe, tworzone na okoliczność „aby coś napisać”. Należało napisać „nagą prawdę” czyli podać fakt, że takowych zmian nie stwierdzono.

Takie same błędy pojawiają się w dyskusji, np. zmiany niewielkie, ale nie istotne. A więc ich po prostu nie ma. Na stronie 96 pojawia się informacja, że „obserwowany efekt nie był zależny od spożycia diety”. Przecież nie badano spożycia, a przyrosty masy ciała nie równają się spożyciu, jak więc można przedstawiać takie argumenty. Fragment poświęcony interpretacji wyników pomiaru stężenia glukozy powinien być wzbogacony o dyskusję dotyczącą insulinooporności.

Należy jednak stwierdzić, że ta część rozprawy (Dyskusja) należy do jej mocnych stron. Jest poprowadzona logicznie, w sposób dojrzały zacierając poprzednie nie do końca pozytywne wrażenia. Ta część rozprawy jest napisana ciekawie, a to w jaki sposób jest napisana i jak ogromny zasób wiedzy zawiera świadczy o umiejętności Doktorantki korzystania z bogatej literatury

świadczy o Jej dojrzałości naukowej.

Ocenianą rozprawę wieńczy 8 wniosków, które tylko po części są wnioskami, a właściwie stanowią taką hybrydę „spozstrzeżeniowo-wnioskową”. Zdaniem recenzenta ta część dezertacji wymaga dopracowania.

Wniosek końcowy

Reasumując, rozprawa doktorska mgr Angeliki Manterys spełnia warunki określone w art. 13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2003 r. (Dziennik Ustaw nr 65 pozycja 595 z 2003 r. z późniejszymi zmianami) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 stycznia 2018 r. w *sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora* (Dz. U. z 2018 r. poz. 261).

Pomimo licznych krytycznych uwag, które w wielu aspektach mają zapewne charakter polemiczny, a biorąc pod uwagę ogrom pracy eksperymentalnej i analitycznej oraz imponujący zasób wiedzy Doktorantki, ciekawą dyskusję i bardzo dobre opracowanie edytorskie rozprawę oceniam pozytywnie. Stwierdzam, że oceniana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wnosi nową wiedzę do dyscypliny *technologia żywności i żywienia*, a Doktorantka wykazała się znajomością ogólnej wiedzy z obszaru będącego przedmiotem rozprawy oraz umiejętnością prowadzenia badań naukowych.

Wnioskuje zatem do Wysokiej Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Angeliki Manterys do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

