

Kraków, dnia 30 maja 2016 r.

Prof. dr hab. inż. Ewa Cieślik
Katedra Technologii Gastronomicznej
i Konsumpcji, Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

RECENZJA
rozprawy doktorskiej Pani mgr Izabeli Czyżyńskiej-Cichoń

pt. „Ocena naczynio- i hepatoprotekcyjnych właściwości naparu z kawy i 1,4-dimetylopirydyny przy zastosowaniu diety niskowęglowodanowej wysokobiałkowej w badaniach *in vivo*”, wykonanej w Katedrze Żywienia Człowieka pod kierunkiem dr hab. Renaty B. Kostogrys, prof. UR

Podstawa prawna: pismo Dziekana Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (DTŻ 520-18-122/2016, z dnia 9 maja 2016 r.)

Wstępnie stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Izabeli Czyżyńskiej-Cichoń pt. „Ocena naczynio- i hepatoprotekcyjnych właściwości naparu z kawy i 1,4-dimetylopirydyny przy zastosowaniu diety niskowęglowodanowej wysokobiałkowej w badaniach *in vivo*” została przedstawiona w postaci druku zwartej, liczącej ogółem 135 stron tekstu. W rozprawie zamieszczono 48 rycin oraz 34 tabele ilustrujące szczegółowo wyniki badań. Rozprawa posiada klasyczny układ pracy doktorskiej.

Temat rozprawy jest aktualny – poświęcony ważnym zagadnieniom dotyczącym dysfunkcji śródbłonna, która towarzyszy wielu chorobom m.in. cukrzycy, stłuszczeniu wątroby, nowotworom czy chorobom układu krążenia. Większość spośród schorzeń sercowo-naczyniowych ma podłoże miażdżycowe, którego pierwotną przyczyną jest dysfunkcja śródbłonna. Blaszką miażdżycową rozwija się głównie w odpowiedzi na nieprawidłowy sposób żywienia (przewaga tłuszczów nasyconych oraz cukrów prostych w diecie). Również nadmierne spożycie białka, przy równocześnie niskiej podaży węglowodanów może prowadzić do zaburzeń lipidowych oraz intensyfikacji procesów aterogenezy.

W szeregu badań dotyczących śródbłonna wykazano, że niektóre związki (dimetylopirydyny) powstające w trakcie procesu palenia ziaren kawy mogą posiadać właściwości naczynioprotekcyjne. W tym aspekcie wybór tematu pracy przez Doktorantkę uważam za trafny i bardzo ważny.

Tytuł pracy

Tytuł pracy nie budzi moich zastrzeżeń, chociaż proponowałabym zamianę spójnika "i" na "oraz", tj. „Ocena naczynio- i hepatoprotekcyjnych właściwości naparu z kawy oraz 1,4-dimetylopirydyny przy zastosowaniu diety niskowęglowodanowej wysokobiałkowej w badaniach *in vivo*”.

Przegląd literatury

Doktorantka na 18 stronach tekstu omówiła przejrzyście tło naukowe swej rozprawy. Najpierw, w oparciu o aktualną i bogatą literaturę przedmiotu, przedstawiła funkcjonowanie śródbłonna naczyniowego - wysoce wyspecjalizowanego narządu wewnątrzwydzielniczego, pełniącego kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy naczyniowej.

W drugiej części przeglądu, dotyczącej charakterystyki miażdżycy, Pani mgr Izabela Czyżyńska-Cichoń opisała etapy rozwoju blaszki miażdżycowej, a następnie omówiła czynniki ryzyka miażdżycy: modyfikowalne (hiperlipidemię, cukrzycę, nadciśnienie tętnicze, otyłość, palenie papierosów, niewłaściwe nawyki żywieniowe i brak aktywności fizycznej) oraz niemodyfikowalne (wiek, płeć, predyspozycje genetyczne).

W kolejnej części tego rozdziału Doktorantka przedstawiła niealkoholową stłuszczeniową chorobę wątroby, która obejmuje różne stany przewlekłej patologii narządowej.

Następne części przeglądu Pani mgr Izabela Czyżyńska-Cichoń poświęciła składnikom odżywczym żywności w aspekcie występowania przewlekłych chorób niezakaźnych, jak również omówieniu diety niskowęglowodanowej wysokobiałkowej. W ostatnim podrozdziale scharakteryzowała Ona kawę jako źródło substancji bioaktywnych i podkreśliła, że kawa oraz 1,4-dimetylopirydyna posiadają potencjał naczynioprotekcyjny, który mógłby zostać wykorzystany w prewencji i terapii miażdżycy oraz niealkoholowego stłuszczenia wątroby – chorób o podłożu śródbłonkowym.

Rozdział ten jest bogato poparty cytacjami literaturowymi, co świadczy o opanowaniu wiedzy z tego zakresu i znajomości problematyki przez Autorkę. Zdaniem Recenzenta, Doktorantka w "Przeglądzie literatury" poruszyła bardzo ważne problemy będące podstawą jej hipotez badawczych. Uczyniła to w sposób syntetyczny, zwięzły i klarowny.

Cel pracy

Celem pracy była charakterystyka diety niskowęglowodanowej wysokobiałkowej w aspekcie jej wpływu na metabolizm lipidowy, rozwój zmian miażdżycowych oraz progresję niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby w organizmie myszy (2 modele

doświadczalne). Ponadto Autorka poddała ocenie potencjalne właściwości naczynioprotekcyjne i hepatoprotekcyjne naparu z kawy naturalnej oraz 1,4-dimetylopirydyny.

Doktorantka właściwie sformułowała hipotezy badawcze i postawiła zasadne pytania badawcze. W tej części pracy Autorka przedstawiła zakres pracy badawczej w postaci 5 zaplanowanych zadań.

Material i metody

Zgodnie z zamysłem niniejszej rozprawy, Doktorantka przeprowadziła 6 doświadczeń żywieniowych z udziałem samic dwóch szczepów myszy laboratoryjnych – C57BL/6 (zwierzęta zdrowe) oraz apoE/LDLR^{-/-} (model miażdżycowy). W rozdziale tym został omówiony układ doświadczeń żywieniowych, skład diet doświadczalnych, pobranie materiału biologicznego i jego przygotowanie do analiz, analizy biochemiczne, instrumentalne, histologiczne oraz obliczenia statystyczne.

Śledząc skład diet zauważyłam, że w diecie eksperymentalnej zastosowano modyfikację diety standardowej AIN-93G, polegającą na zwiększeniu w niej poziomu białka i tłuszczu. Pojawia się jednak pytanie, czy zmiana źródła tłuszczu (olej na masło) i jego ilości (7 g vs. 20 g) nie była dodatkowym czynnikiem, który mógł wpłynąć na uzyskane rezultaty badań?

W ocenie tego rozdziału chcę podkreślić istotną - jeśli nie najważniejszą - jego zaletę, którą jest w mojej opinii wieloaspektowe podejście do tematu, wymagające od Doktorantki opanowania różnych metod badawczych, w tym skomplikowanych, służących: ocenie zmian miażdżycowych w początkowym odcinku aorty wstępującej, ocenie histologicznej wątroby, analizie ekspresji genów metabolizmu lipidowego. Ogólnie, dobór materiału badawczego i zastosowane metody badawcze były poprawne.

Wyniki

Doktorantka zawarła wyniki swych badań na 50 stronach w 27 tabelach i zilustrowała je 25 wykresami/rycinami. Ponadto umieściła 10 fotografii, niepotrzebnie nazywając je również rycinami, co wprowadziło zbyteczne zamieszanie.

Rozdział ten został podzielony na 6 podrozdziałów dotyczących charakterystyki zaburzeń metabolizmu lipidowego, progresji miażdżycy oraz rozwoju niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby, a także oceny wpływu naparu kawy i 1,4-dimetylopirydyny na parametry tych zaburzeń w organizmach dwóch użytych szczepów myszy żywionych dietą

niskowęglowodanową wysokobiałkową. W obszernej i wyczerpującej charakterystyce uzyskanych wyników Doktorantka jasno i przejrzysto je udokumentowała.

W rozdziale tym mam kilka uwag:

- na str. 49 zostały podane wartości dotyczące zawartości tłuszczu w wątrobach zwierząt 7,9% oraz 1,74% poparte cytowaniem ryc.17, jednakże rycina 17 to fotografia;
- w podrozdziale aktywność enzymów wątrobowych napisała Pani: „aktywność aminotransferazy asparaginianowej u myszy otrzymujących dietę AIN-93G kształtowała się na poziomie $156,09 \pm 24,67$ U/l, natomiast w grupie LCHP na poziomie $90,01 \pm 15,90$ U/l”. Dlaczego nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych przy tak dużym zróżnicowaniu otrzymanych wyników? Czy chodzi tutaj o dużą zmienność materiału biologicznego, czy raczej o małą liczebność grup?

Dyskusja

W rozdziale „Dyskusja” zwrócono uwagę na fakt, że dieta niskowęglowodanowa wysokobiałkowa prowadzi do zaburzeń metabolizmu białek i kwasów tłuszczowych w organizmie. W konsekwencji dochodzi do niekorzystnych zmian w profilu lipidowym oraz akumulacji tłuszczu w hepatocytach. Zastosowanie ww. diety u myszy obu szczepów jednoznacznie wskazuje na jej aterogenny charakter, który sprzyja również rozwojowi niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby. Doktorantka stwierdziła, że dodatek kawy do diety zwierząt nie zmieniał korzystnie poziomu badanych parametrów lipidowych w zastosowanym układzie doświadczalnym, natomiast przyczyniał się do nieznacznego ograniczenia rozmiarów blaszki miażdżycowej i zmniejszenia akumulacji tłuszczu w hepatocytach. Tymczasem 1,4-dimetylopirydyna wykazuje słaby charakter naczynioprotekcyjny i przeciwmiażdżycowy. W kontekście stłuszczenia wątroby korzystne działanie 1,4-DMP jest wyraźne zarówno na poziomie morfologicznym, jak i biochemicznym.

Na podstawie wszystkich uzyskanych rezultatów można wnioskować, że w badanych modelach doświadczalnych napar z kawy posiada nieznacznie większy potencjał terapeutyczny w kontekście miażdżycy i dyslipidemii w porównaniu do 1,4-dimetylopirydyny. W aspekcie poprawy parametrów stłuszczenia wątroby znacznie większą efektywnością charakteryzuje się 1,4-DMP.

Należy podkreślić, że Doktorantka umiejętnie wyeksponowała swe główne spostrzeżenia i dogłębnie przeanalizowała otrzymane wyniki. Następnie obszernie je przedyskutowała z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów, co świadczy o jej wiedzy i umiejętności krytycznej interpretacji

zachodzących przemian. Zdaniem Recenzenta warto podkreślić odwagę Autorki w przeciwstawianiu się wynikom innych badaczy.

Podsumowanie i wnioski

W rozdziałach tych zaprezentowano obszerne podsumowanie w formie 12 stwierdzeń, które znajdują uzasadnienie w uzyskanych wynikach. Następnie sformułowano 4 wnioski ogólne, w których zweryfikowano postawione hipotezy badawcze.

W mojej opinii nie jest zasadne przedstawianie podsumowania w formie wypunktowanych stwierdzeń, a następnie formułowanie ogólnych wniosków (również w punktach). Wydaje się, że wystarczyłoby przedstawienie najważniejszych rezultatów syntetycznie, ale w jednym z ww. rozdziałów.

Piśmiennictwo

Odnotowuję właściwy dobór cytowanych pozycji. Wykaz literatury obejmuje 204 pozycje, przy czym większość stanowią publikacje obcojęzyczne. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka w zasadzie wykorzystała najnowsze pozycje literatury światowej.

Do nielicznych uchybień redakcyjnych zaliczyłabym:

- częste używanie słowa kontekst – proponowałabym aspekt,
- „badania prowadzono na dwóch modelach zwierzęcych” – z udziałem zwierząt,
- „w badanym kontekście” zamiast w kontekście prowadzonych badań,
- stosowanie określenia „znamienny wzrost” – istotny lub nie!
- cytowanie autorów Kostogrys i in., lub Kostogrys i wsp. – należy ujednoczyć,
- lipidogram – profil?
- osoczowy profil – to raczej skrót myślowy.

Podsumowując niniejszą recenzję wyrażam pogląd, że pomimo nielicznych uchybień redakcyjnych, merytoryczne kryteria oceny pracy pozwalają w pełni stwierdzić bardzo dobre przygotowanie Doktorantki do prowadzenia prac badawczych, poczynwszy od znajomości przedmiotu oraz warsztatu badań, a skończywszy na umiejętności formułowania logicznych wniosków w oparciu o uzyskane wyniki. Zwraca uwagę bardzo wysoki poziom pracy i wieloaspektowość poruszanych zagadnień. Doktorantka wykorzystała dwa modele doświadczalne, w tym szczep apoE/LDLR^{-/-} stanowiący uznany model miażdżycowy. Przeprowadziła szereg analiz, prezentując szerokie i nowatorskie podejście do realizacji założonego celu pracy. Na podkreślenie zasługuje także umiejętność zaprezentowania i

dyskusji uzyskanych rezultatów, świadcząca o dużej orientacji Doktorantki w poruszanej w dysertacji tematyce.

Na tej podstawie, zwracam się do Pani Dziekan i Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Izabeli Czyżyńskiej-Cichoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto proponuję wyróżnienie pracy doktorskiej.

E. Cichoń