

Warszawa, dn. 24.02.2022

Prof. dr hab. Jadwiga Hamułka
Katedra Żywienia Człowieka
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Antończyk
pt. „Wpływ syntetycznych antyoksydantów fenolowych na biodostępność i metabolizm
tłuszczów w modelach *in vitro*”.

wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Ogólnej Technologii Żywności,
na Wydziale Technologii Żywności,
Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
pod kierunkiem naukowym **dr hab. Magdaleny Mika, prof. URK**

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Podstawą prawną wykonana niniejszej recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, dr hab. inż. Marcina Łukasiewicza, prof. URK (DTŻ 520-21-216/2021, z dnia 17-12-2021) oraz rozprawa doktorska mgr inż. Anny Antończyk.

Podstawę prawną stanowi Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, art. 13.1 z późn. zm.) oraz Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669).

2. Uzasadnienie wyboru tematu rozprawy doktorskiej

Syntetyczne przeciwutleniacze fenolowe, takie jak: BHT, BHA, TBHQ-E oraz galusany ze względu, m.in. na łatwość ich pozyskiwania i niską cenę są szeroko stosowane w technologii żywności. Mogą one wchodzić w interakcje z nadtlenkami wytwarzanymi przez żywność w określonych warunkach, blokując drogę psucia się żywności dlatego odgrywają bardzo ważną rolę w poprawie stabilności żywności i wydłużeniu okresu przydatności do spożycia. Właściwe stosowanie syntetycznych przeciwutleniaczy fenolowych może nie tylko przynieść korzyści ekonomiczne producentom, ale także zapewnić bezpieczniejszą żywność konsumentom. Jednak obecne badania pokazują, że nadmierne dodawanie i niewłaściwe stosowanie przeciwutleniaczy fenolowych może mieć niekorzystny wpływ na organizm żywy, m.in. powodować uszkodzenia DNA czy apoptozę komórek. Wykazano ponadto, że metabolity przeciwutleniaczy fenolowych mogą również mieć szkodliwy wpływ na organizm, stąd też ich stosowanie powinno być ściśle monitorowane.

Biorąc powyższe pod uwagę, uważam że wybór problemu badawczego recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Antończyk dotyczący wpływu syntetycznych antyoksydantów fenolowych powszechnie stosowanych w technologii żywności na biodostępność oraz metabolizm tłuszczu stabilizowanego tymi związkami jest celowy i bardzo potrzebny, nie tylko ze względów poznawczych, ale również aplikacyjnych. Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wyniki stanowią ważne uzupełnienie brakujących danych literaturowych, co biorąc pod uwagę wzrastające zainteresowanie stosowaniem tych związków w produkcji żywności jest bardzo cenne.

3. Ogólna charakterystyka i ocena formalna pracy

Układ rozprawy doktorskiej jest typowy dla prac o charakterze doświadczalnym. Dysertacja jest klasycznym opracowaniem przedstawionym w postaci maszynopisu, liczącym 128 stron. Składa się z 6 rozdziałów oraz wykazu stosowanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spisu literatury. W pracy zamieszczono 9 tabel oraz 36 rycin, w tym bardzo ciekawe graficzne podsumowanie wpływu badanych antyoksydantów na proces syntezy chylomikronów w komórkach Caco-2 (etap II). Poszczególne rozdziały pracy są logicznie ułożone i stanowią kompleksową całość. Konstrukcję rozprawy oparto na sześciu głównych rozdziałach obejmujących wstęp, przegląd literatury zawierający 6 podrozdziałów stanowi dobre wprowadzenie w tematykę realizowanych badań, cel pracy, część doświadczalną ze szczegółowo opisaną metodyką badań i stosowanych procedur, wyniki badań i ich dyskusję oraz wnioski. Pierwsze rozdziały zawierają wstęp i przegląd literatury - część teoretyczna, stanowiąca 27% ogółu pracy, a pozostałe dotyczą części empirycznej (50%). W pracy zacytowano 313 publikacji naukowych (11%). Dobór bibliografii jest odpowiedni i obejmuje najważniejsze pozycje literaturowe z zakresu prowadzonych badań. Proporcje poszczególnych części pracy są adekwatne do charakteru pracy, a uzyskane wyniki zinterpretowano i przedyskutowano prawidłowo. Od strony formalnej praca nie budzi zastrzeżeń.

4. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy koresponduje z wyznaczonym celem i treścią rozprawy.

Wstęp stanowi dobre wprowadzenie w zakres planowanych badań, nakreślając w zarysie genezę pracy oraz zakres dokonanego przeglądu literatury.

Przegląd literatury oparty o aktualne i ważne publikacje stanowi dobry asumpt do zaplanowanych badań, nakreślając w zarysie najważniejsze kwestie związane z tematem pracy, w tym przeprowadzone w dalszej części pracy analizy (procedury badawcze). W kolejnych podrozdziałach Doktorantka przedstawiła charakterystykę syntetycznych antyoksydantów fenolowych (BHT-butylhydroksytoluen BHA – Butylhydroksyanizol, TBHQ - Tert-butylhydrochinon, GP - Galusan propylu, GO - Galusan oktylu, GD - Galusan dodecylu), w tym ich przemiany, metabolizm, wpływ na zdrowie, jak również szczegółowo

opisała AMPK - enzym regulujący metabolizm lipidów – strukturę, rozmieszczenie w tkankach, regulację aktywności i funkcje w organizmie oraz białkowe składniki lipoprotein (apoproteiny – A, B, C i E).

Cel pracy został przedstawiony precyzyjnie i łączy się w logiczną całość z wcześniejszym przeglądem literatury. Do zrealizowania celu głównego „poznanie wpływu syntetycznych antyoksydantów fenolowych (BHT, BHA, TBHQ, GP, GO, GD) stosowanych w technologii żywności na biodostępność oraz metabolizm tłuszczu stabilizowanego tymi związkami” wyznaczono trzy cele szczegółowe. Uważam, że zakres pracy jest szeroki i pozytywnie ją wyróżnia na tle innych prac z tego zakresu, a ponadto świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Pewien niedosyt budzi, moim zdaniem, brak sformułowanych w oparciu o literaturę hipotez badawczych, które byłyby dobrym wstępem do wyników badań własnych i pozwoliłyby Doktorantce na wykazanie w tym obszarze jej dojrzałości naukowej, a czytelnikowi umożliwiłyby uzyskanie pełnego obrazu szeroko zakrojonych badań.

Część doświadczalna pracy obejmuje: etapy badania, wykaz stosowanych odczynników, aparatury i sprzętu laboratoryjnego oraz szczegółowy opis stosowanych metod (procedur) badawczych (łącznie 11 stron maszynopisu). Zgodnie z przedstawionymi na rys. 10. etapami badania (moim zadaniem schematem badania) praca została zrealizowana w 3 etapach: (1) trawienie in vitro produktu modelowego, (2) transport przez enterocyty z wykorzystaniem modelu komórek Caco-2. (3) katabolizm w hepatocytach z wykorzystaniem komórek HepG2.

Na podkreślenie zasługuje konsekwentna realizacja zaplanowanych badań, co wymagało od Doktorantki dużego zaangażowania, dobrej organizacji pracy oraz umiejętności analitycznych. W pracy nie znalazłam informacji odnośnie źródeł finansowania ww badań, co przy tak szerokim zakresie analiz, stosowanych odczynników oraz sprzętu nie było bez znaczenia. Czy mogłaby się Doktorantka w czasie publicznej obrony odnieść do tej kwestii?

Rozdział ten jest napisany w sposób czytelny, skrupulatnie przedstawiając poszczególne etapy przebiegu doświadczeń. Analizując przedstawioną pracę, z mojego punktu widzenia zmieniałabym trochę kolejność opisanych procedur dostosowując je do poszczególnych etapów badania oraz ujednoliciła nazewnictwo - dotyczy zwłaszcza etapu III – przy czym jest to moja subiektywna uwaga nie wpływająca na ogólną wysoką ocenę tej części pracy.

Rozdział zatytułowany **Wyniki badań i ich dyskusja** jest najobszerniejszą częścią pracy liczącą 45 stron maszynopisu. Autorka podzieliła ten rozdział na 5 podrozdziałów, w których w sposób szczegółowy zaprezentowała wyniki badań własnych i ich omówienie. Układ i sekwencja następujących po sobie eksperymentów jest logiczna i dobrze przemyślana, co już podkreślałam wcześniej. Nazwy rozdziałów są czytelne i oddają w pełni informację dotyczącą przeprowadzonych analiz. Wyniki badań zostały zestawione w postaci 4 tabel i 25 rycin.

Zdaniem recenzenta, Autorka niepotrzebnie każdy z podrozdziałów w sekcji „Wyniki badań i ich dyskusja” rozpoczyna dość obszernym wstępem, przygotowanym na podstawie źródeł literaturowych. Fragmenty te powinny się raczej znaleźć w części „Wstęp” jako szersze

omówienie genezy badań lub w rozdziale „Przegląd literatury”, co zresztą jest częściowo prezentowane w tym rozdziale.

Połączenie dyskusji z wynikami badań własnych z jednej strony ułatwia śledzenie uzyskanych wyników, z drugiej jednak, mimo iż Autorka starała się porównać uzyskane wyniki z wynikami innych autorów i wyjaśnić mechanizmy działania nie w pełni moim zdaniem pokazują potencjał uzyskanych wyników i przejrzaną przez Doktorantkę liczną literaturę z tego zakresu. W końcowym fragmencie tego rozdziału Autorka przedstawia dwa proponowane mechanizmy regulacji aktywności AMPK w komórkach HepG2 pod wpływem badanych związków. Może wydzielenie dyskusji wyników pozwoliłoby na skonfrontowanie uzyskanych wyników własnych z wynikami innych autorów, a przede wszystkim ocenie przyczyn i potencjalnych mechanizmów zaistniałych zależności oraz wyartykułowania wpływu spożywania syntetycznych antyoksydantów fenolowych z produktami spożywczymi na zdrowie człowieka, co moim zadaniem jest bardzo ważnym aspektem recenzowanej rozprawy.

Godnym podkreślenia jest natomiast bardzo szeroki zakres badań i ich pracowitość. Badania są przemyślane i konsekwentnie realizowane, a kolejne etapy wynikają z poprzednich, co jest m.in. związane z koniecznością ustalania warunków dalszych analiz.

W rozdziale **Wnioski** Doktorantka przedstawiła 3 wnioski ogólne dotyczące najważniejszych osiągnięć wynikających z przeprowadzonych badań. Świadczą one o realizacji wyznaczonego przez Autorkę celu badań. Jediną uwagą jest sformułowanie we wniosku pierwszym „*Dodatek do żywności syntetycznych antyoksydantów fenolowych, zastosowanych w dawkach dopuszczalnych...*” wymaga wyjaśnienia ponieważ Doktorantka badała w pracy jedną wielkość dawki, tj. 100 mg/1kg tłuszczu. Ponadto we wniosku trzecim raczej proponowałabym zapis „najmniej niekorzystny wpływ na metabolizm lipidów...” zamiast „najkorzystniejszy wpływ...”, podobne w streszczeniu pracy. W tej części pracy Autorka zmieściła również 27 wniosków szczegółowych, które w mojej opinii są stwierdzeniami i stanowią swoiste podsumowanie poszczególnych etapów badań. Zdaniem recenzenta korzystniej byłoby przedstawić podsumowanie badań oraz wnioski ogólne, a na koniec wyeksponować główny wniosek (aplikacyjny) wynikający z przeprowadzonych badań i zawierający opis najkorzystniejszego rozwiązania w kontekście stosowania syntetycznych antyoksydantów fenolowych w technologii żywności i ich wpływu na zdrowie konsumenta.

Literatura – w pracy wykorzystano 313 pozycji, z czego zaledwie 2 prace stanowiły publikacje w języku polskim. Większość zamieszczonej literatury to oryginalne prace twórcze. Na uwagę zasługuje trafny dobór źródeł oraz ich aktualność, jak również fakt, że Doktorantka wykorzystywała prace pochodzące zarówno z lat wcześniejszych (lata 80-90. XX wieku), jak i najnowsze. Świadczy to o dobrym rozeznaniu literaturowym Autorki rozprawy i sięganiu do oryginalnych źródeł zwłaszcza dotyczących badań realizowanych w latach wcześniejszych.

Jak wspominałam wcześniej, oceniana dysertacja wykonana jest starannie i napisana została poprawnie pod względem językowym i merytorycznym, niemniej jednak z obowiązku

recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kilka kwestii, które zauważyłam podczas czytania pracy:

- podpis / objaśnienie pod tabelą 10 odnośnie różnic istotnych statystycznie jest niepotrzebny,
- niepoprawne sformułowania, np. „w badaniach na ludziach” – powinno być „z udziałem ludzi”; „ilość CHOL, TG...” powinno być „stężenie CHOL, TG, HDL...”; „waga” – „masa ciała” niepotrzebna jest również spacja przed %, itp.,
- pozycja literaturowa nr 232 – Hamosh 1990 – co to za publikacja?

Odnosząc się do przeprowadzonych przez Doktorantkę badań i bardzo ciekawych wyników własnych, podczas publicznej obrony pracy doktorskiej prosiłabym o ustosunkowanie się do poniższych kwestii:

- Jakie były przesłanki wyboru produktu modelowego, tj. 80% bułka pszenna kajzerka i 20% smalcu? Dlaczego zastosowano taki rodzaj tłuszczu?
- Czy Pani zdaniem byłoby możliwe oszacowanie spożycia badanych związków z dietą w warunkach polskich; czy były prowadzone takie badania (symulacje)?
- Jakie są możliwości i jednocześnie ograniczenia wykorzystania uzyskanych wyników? Czy ma Pani może jakieś dalsze plany naukowe, w kontekście zrealizowanych badań?

5. Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Anny Antończyk wpisuje się w nurt badań dotyczących wykorzystania syntetycznych antyoksydantów fenolowych w przemyśle spożywczym i ich wpływu na zdrowie. Podjęty problem badawczy ma duże znaczenie, zarówno w wymiarze poznawczym, jak i aplikacyjnym. Ten obszar wiedzy nadal wymaga dalszych wnikliwych badań i poszukiwania związków przyczynowo-skutkowych między stosowanymi dodatkami do żywności, w tym syntetycznymi antyoksydantami a stanem zdrowia, w celu wyjaśnienia mechanizmów ich oddziaływania na organizm. Przedstawiona w pracy część teoretyczna nie budzi zastrzeżeń. Jest dobrze osadzona w obszernej, aktualnej i trafnie dobranej literaturze przedmiotu. Część eksperymentalna została przeprowadzona konsekwentnie zgodnie z zaplanowanymi procedurami i przy pomocy dobrze dobranych oraz aktualnych (nowoczesnych) metod badawczych z wykorzystaniem bardzo dobrze wyposażonego zaplecza badawczego Wydziału Technologii Żywności/ Katedry Biotechnologii i Ogólnej Technologii Żywności UR w Krakowie.

Z powyższych danych oraz analizy przedłożonej dysertacji wynika, że mgr Anna Antończyk uzyskała efekty kształcenia przewidziane wg Polskich Ram Kwalifikacji dla ósmego (doktoranckiego) poziomu kształcenia, tj. posiada umiejętność opracowania koncepcji badań, zdolność do planowania i wykonywania eksperymentów badawczych, a także

opracowywania wyników i konfrontowania ich z wynikami innych badaczy. A moje uwagi/sugestie mają jedynie charakter dyskusji.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Anny Antończyk pt. „*Wpływ syntetycznych antyoksydantów fenolowych na biodostępność i metabolizm tłuszczów w modelach in vitro*” zrealizowanej pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Mika, prof. URK w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim w myśl Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, art. 13.1 z późn. zm.). Doktorantka wykazała się dobrą znajomością tematu, zrealizowała postawione sobie cele badawcze i umiejętnie zinterpretowała uzyskane wyniki, wnosząc nowe dane do nauki o żywności i żywieniu. W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny technologia żywności i żywienia Wydziału Technologii Żywności, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Antończyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę podjętą tematykę, wpisującą się w nurt najnowszych badań z zakresu technologii żywności i żywienia oraz szeroki zakres dobrze zaplanowanych i konsekwentnie zrealizowanych badań oraz wnikliwą analizę uzyskanych wyników i znaczący wkład w poszerzenie dotychczasowej wiedzy wnoszę do Wysokiej Rady o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Antończyk pt. „Wpływ syntetycznych antyoksydantów fenolowych na biodostępność i metabolizm tłuszczów w modelach in vitro”**.

