



UNIwersYTET PRZYRODNICZY WE WROCLAWIU

Prof. dr hab. inż. Joanna Wyka
Katedra Żywnienia Człowieka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, dn. 08.05.2023r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani **mgr inż. Eweliny Kukielki-Gastoł**

pt.: "Wpływ jonów magnezu oraz rodzaju zastosowanego tłuszczu na wybrane parametry metabolizmu glukozy oraz lipidów w organizmie szczura Wistar" w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia wykonanej pod kierunkiem promotora Pani prof. dr hab. inż. Anety Kopec z Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Podstawa prawna: Uchwała Nr 11/2023 Rady dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie z dnia 1 marca 2023 roku w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Kukielki-Gastoł, na podstawie art. 14 ust. 1 pkt. 1 oraz ust. 2 pkt. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2014 r., poz. 1852 z późn. zm.), w zw. z art. 179 ust. 2 oraz ust. 3 pkt. 2 lit. b ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.)

Rozprawa doktorska **Pani mgr inż. Eweliny Kukielki-Gastoł** zatytułowana "Wpływ jonów magnezu oraz rodzaju zastosowanego tłuszczu na wybrane parametry metabolizmu glukozy oraz lipidów w organizmie szczura Wistar" została przedstawiona w postaci monografii, liczącej ogółem 183 stron tekstu, w tym 37 tabel, 7 rysunków oraz 4 załączniki. W rozprawie wykorzystano

prawidłowo dobrane 217 pozycji piśmiennictwa, z których większość stanowiła publikacje anglojęzyczne wydrukowane w czasopiśmie o światowym znaczeniu.

Praca nie odbiega układem od opracowań o tym charakterze i składa się z części teoretycznej: wstęp - przegląd literatury, I rozdział z kilkoma podrozdziałami oraz rozdział II z hipotezą badawczą i celem pracy. W rozdziale III przedstawiono materiał badawczy i metody badań, następnie omówiono wyniki (rozdział IV) doświadczenia I i II. Całość pracy doktorskiej podsumowano w dyskusji oraz wnioskach. Na uwagę zasługuje fakt bardzo obszernej literatury, która została wykorzystana w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej.

Struktura pracy jest komplementarna z treścią i stanowi logiczne połączenie zagadnień teoretycznych z metodologią oraz wykonywanymi analizami. Należy podkreślić bardzo szeroki zakres zaplanowanych i zrealizowanych w pracy doktorskiej badań, jednak nie wykraczający poza wymieniony wyżej tytuł.

Ocena wyboru tematu pracy

Wybór tematu rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Eweliny Kukielki-Gastol należy uznać za trafny i oryginalny. Nieracjonalna dieta współczesnego człowieka, nadmiar i szybki dostęp do żywności wysoko przetworzonej, niedobór lub nadmiar składników odżywczych predysponuje do rozwinięcia chorób dietozależnych. Przyjmując generalne wnioski wypływające z danych światowych, niebilansowanie diety wiąże się z niedoborem składników regulujących metabolizm (witamin i składników mineralnych) a także z nadmiarem cukrów prostych, nasyconych kwasów tłuszczowych oraz kwasów tłuszczowych trans. Ryzyko zdrowotne charakteryzujące oba te stany wymaga pogłębionej analizy dotyczącej sposobu żywienia, stylu życia (m.in. oddziaływanie stresu) oraz wiedzy konsumenckiej danej osoby czy grupy ludzi. Od wielu lat uwaga naukowców skupia się na poszukiwaniu składników żywności, które mogą przyczynić się do obniżenia zachorowania na otyłość, nadwagę, miażdżycę, cukrzycę czy nowotwory.

Doktorantka dokonując w tym kontekście przeglądu literatury postanowiła ocenić wpływ nadmiaru magnezu w dietach zwierząt eksperymentalnych skarmianych zróżnicowaną ilością produktów tłuszczowych:

- pochodzenia zwierzęcego (masła, łoju wołowego) - doświadczenie I
- pochodzenia roślinnego (tłuszczu palmowego, oleju rzepakowego) - doświadczenie II

na wybrane parametry biochemiczne, kumulację tłuszczu i składników mineralnych w wybranych narządach, tkankach i kale oraz ekspresję mRNA genów związanych z metabolizmem tłuszczów w ich organizmach (szczury rasy Wistar). Pani mgr inż. Ewelina Kukielka-Gastol powołuje się na nieliczne opublikowane badania, które sugerują, że magnez może mieć pozytywny

wpływ na metabolizm lipidów a jego dodatkowa suplementacja w dietach wysokotłuszczowych może zapobiegać otyłości nią wywołanych. Jest to prawdopodobnie spowodowane tym, iż jony magnezowe mają zdolność łączenia się z kwasami tłuszczowymi i mogą tworzyć nierozpuszczalne mydła, a tym samym ograniczają wchłanianie tłuszczów z przewodu pokarmowego. Powyższe informacje mogą prowadzić do wniosku, że jony magnezu mogą być traktowane jako czynnik prewencyjny nie tylko chorób układu krążenia, ale także nadwagi i otyłości.

Hipoteza badawcza i cel pracy

Przyjęta hipoteza badawcza wynikała logicznie z przeglądu piśmiennictwa oraz odzwierciedlała temat rozprawy doktorskiej i brzmi: Dodatek magnezu do diet zawierających różne rodzaje i ilości tłuszczów istotnie wpływa na wybrane parametry węglowodanowe oraz lipidowe w organizmie szczura Wistar poprzez:

1. obniżenie stężenia glukozy i insuliny,
2. obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego, frakcji LDL oraz triacylogliceroli,
3. zmniejszenie zawartości tłuszczu ogółem w wybranych narządach i tkankach,
4. obniżenie stresu oksydacyjnego wywołanego nadmiarem tłuszczów w diecie,
5. zmianę ekspresji genów związanych z metabolizmem tłuszczów.

Hipotezę badawczą zweryfikowano poddając ocenie wpływ dodatku jonów magnezu do diet z prawidłową i zwiększoną zawartością różnych rodzajów tłuszczów na: → poziom glukozy i insuliny, → profil lipidowy i kumulację tłuszczu w wybranych narządach wewnętrznych, → stężenie wybranych składników mineralnych w surowicy krwi oraz wybranych narządach wewnętrznych i kale, → aktywność wybranych enzymów oraz markerów antyoksydacyjnych, → ekspresję mRNA genów związanych z metabolizmem tłuszczów.

Material i metodyka

W pracy doktorskiej wykorzystano model zwierzęcy z udziałem 112 albinotycznych szczurów Wistar płci męskiej, pochodzących z Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych z Brwinowa o początkowej masie ciała 120-130 g. Doświadczenia przeprowadzono po uzyskaniu zgody I Lokalnej Komisji

Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach działającej przy Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie (uchwała numer: 165/ 2015).

Po okresie adaptacji podzielono zwierzęta na dwie grupy realizując dwa modele doświadczenia:

- I doświadczenie (podwójna zawartość masła i łożu wołowego 7% vs. 14% oraz magnezu 0,14 mg / 100 g mineral mix vs. 0.28 mg/100 g mineral mix)
- II doświadczenie (podwójna zawartość tłuszczu palmowego i oleju rzepakowego 7% vs. 14% oraz magnezu 0,14 mg / 100 g mineral mix vs. 0.28 mg/100 g mineral mix)

Po 3 miesiącach eksperymentu, od zwierząt pobrana została krew i narządy wewnętrzne potrzebne do dalszych analiz, które stanowiły materiał badawczy.

Oznaczenie stężenia insuliny w surowicy krwi zostało wykonane przy użyciu zestawu diagnostycznego RayBiotech Rat Insulin ELISA (nr kat. ELR-Insulin-1, Norcross, Stany Zjednoczone). Oznaczenie cholesterolu całkowitego w surowicy krwi wykonano metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem enzymów: esterazy i oksydazy cholesterolu (CHOD/PAP). Oznaczenie stężenia cholesterolu frakcji HDL wykonano przy użyciu zestawu diagnostycznego CORMAY HDL (nr kat. 2-053, Lublin, Polska). Metoda ta opiera się na wytrąceniu lipoprotein o bardzo niskiej (VLDL) oraz niskiej gęstości (LDL) z surowicy krwi przy użyciu kwasu fosforowolframowego, w obecności jonów magnezu. Stężenie cholesterolu frakcji LDL+VLDL obliczono poprzez różnicę stężeń cholesterolu całkowitego (TCh) oraz cholesterolu frakcji HDL (wzór Friedawalda). Oznaczenie stężenia triacylogliceroli (TG) wykonano przy użyciu zestawu diagnostycznego CORMAY Liquick Cor-TG z użyciem oksydazy glicerofosforanowej. Oznaczenie aktywności aminotransferazy asparaginowej (AST) wykonano przy użyciu zestawu diagnostycznego Alpha Diagnostic AST (GOT) DST (nr kat. A6661-050, Warszawa, Polska).

Oznaczenie aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) wykonano przy użyciu zestawu diagnostycznego Alpha Diagnostic ALT (GOT) DST (nr kat. A6624-050, Warszawa, Polska). Oznaczenie aktywności cholinesterazy (CHE) wykonano przy użyciu zestawu diagnostycznego CORMAY CHOLINESTERASE (nr kat. 2-057, Lublin, Polska). Oznaczenie aktywności γ -glutamylotransferazy (GGT) wykonano przy użyciu zestawu diagnostycznego CORMAY Cor-GGT (nr kat. 1-226, Lublin, Polska). Oznaczono aktywności peroksydazy i reduktazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej wykonano przy użyciu zestawu diagnostycznego firmy Randox Laboratories Ltd. RANSEL (nr kat. RS 505, Crumlin, Wielka Brytania). Oznaczono stężenia dialdehydu malonowego (MDA) przy użyciu zestawu diagnostycznego ALEXIS BIOCHEMICAL OXI-TEK TBARS Assay Kit (nr kat. #850-287-KI01, Warszawa, Polska). Ponadto oznaczenia mocznika i kwasu moczowego, kreatyniny oraz jonów wapnia, magnezu, fosforu przy użyciu zestawu

diagnostycznego CORMAY Liquick Cor-UA (nr kat. 7-206, Lublin, Polska).

Dokonano analizy zawartości tłuszczu i kwasów tłuszczowych w wybranych narządach wewnętrznych i kale za pomocą metody Soxhleta przy użyciu aparatu 2050 SOXTEC Auto Extraction Unit Foss Teactor, firmy Soxtec Avanti o parametrach: 50-60 Hz, 230V, 1550. Oznaczono stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w wątrobie metodą reakcji kwasu tiobarbiturowego z dialdehydem malonowym (MDA). Oznaczono wybrane składniki mineralne w wątrobie oraz kale metodą atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej.

Ekspresję genów w wątrobie oznaczono za pomocą izolacji RNA przy użyciu zestawu Total RNA Mini Plus (nr kat. 036-100, A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Wyizolowane RNA zostało następnie przepisane na cDNA za pomocą odwrotnej transkryptazy przy użyciu zestawu TranScriba (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska).

Uzyskane wyniki poddano jednoczynnikowej analizie wariancji ANOVA, w programie STATISTICA 10 firmy StatSoft. Istotność różnic pomiędzy średnimi arytmetycznymi określono przez użycie testu Duncana dla poziomu istotności $p \leq 0,05$. Zgodność rozkładów zmiennych z rozkładem normalnym została sprawdzona testem Shapiro-Wilka.

Ocena bibliografii i znajomości problematyki na tle piśmiennictwa

Bibliografia przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej Pani mgr inż. Eweliny Kukielki-Gastol zatytułowanej "Wpływ jonów magnezu oraz rodzaju zastosowanego tłuszczu na wybrane parametry metabolizmu glukozy oraz lipidów w organizmie szczura Wistar" obejmuje 217 pozycji. Wybrano głównie artykuły anglojęzyczne opublikowane w ciągu ostatnich 10 lat w znaczących czasopismach naukowych. W świetle zebranej literatury Autorka pokrótce opisuje poszczególne podrozdziały, które zajmują kilka stron, a całość części teoretycznej zawarta została na 22 stronach. Informacje te zostały opisane krótko, zwięźle a czytelnik może rozszerzyć swoją wiedzę odnosząc się do spisu piśmiennictwa. Dysertację doktorską podzielono na 7 głównych części, wraz z literaturą (numeracja arabska), w obrębie których opisano poszczególne podrozdziały. W tym bardzo szczegółowo omówienie wyników (str. 60-97) i dyskusję (str. 97-135). Dodatkowo załączono spis tabel i rysunków oraz 4 załączniki.

Ocena merytoryczna pracy

W pracy doktorskiej zastosowano bardzo wszechstronne badania umożliwiające weryfikację hipotezy czy dodatek magnezu do diet zawierających różne rodzaje i ilości tłuszczów istotnie wpływa na wybrane parametry węglowodanowe oraz lipidowe w organizmie szczura Wistar. Autorka podkreśla, że dysertacja doktorska stanowi kontynuację Jej pracy magisterskiej, co potwierdza determinację i zaangażowanie Pani mgr inż. Eweliny Kukielki-Gastoł w rozwiązywanie interesujących Nią problemów badawczych.

Weryfikacja ww. hipotezy wymagała zaprojektowania kilku etapów badań związanych z hodowlą zwierząt doświadczalnych, przygotowaniem wielu wariantów diety (zawartość Mg, % tłuszczu, rodzaj tłuszczu roślinny, zwierzęcy) oraz popartej wieloma skomplikowanymi analizami oceny parametrów biochemicznych i antropometrycznych organizmów szczurów po zakończeniu eksperymentu.

Wszystkie badania przeprowadzono w bardzo logiczny sposób, uwzględniając wymagane powtórzenia i próby kontrolne. Całość działań miała na celu zweryfikowanie postawionej wcześniej hipotezy. Jednakże sama Autorka wskazuje na trudności w ocenie swoich wyników analizując w dyskusji odmienne wyniki uzyskane przez innych autorów. Prowadzenie w taki sposób dyskusji, podkreślenie limitacji badań zasługuje na wyróżnienie i świadczy o kompetencjach Autorki w wyciąganiu opartych na faktach i rzetelnych naukowo wniosków.

Na uwagę zasługują wyniki, które częściowo potwierdzają hipotezę 1, że wprowadzenie do diet wysokotłuszczowych zawierających masło, tłuszcz palmowy lub olej rzepakowy podwójnej ilości magnezu istotnie obniżyło stężenie insuliny i wskaźników insulinooporności HOMA-IR i IRI/G. Wniosek ten stwarza szansę na polepszenie stanu zdrowia chorych na cukrzycę poprzez zwiększenie zawartości magnezu w ich dietach (spersonifikowana suplementacja).

Kolejny ważny wniosek dotyczył gospodarki lipidowej badanych szczurów. Zastosowanie magnezu w obecności tłuszczów zwierzęcych w doświadczeniu I istotnie obniżyło wskaźniki ryzyka Castelliego CRI-I i CRI-II, stężenie triacylogliceroli w surowicy krwi szczurów oraz stężenie cholesterolu całkowitego i cholesterolu frakcji LDL w grupach żywionych łożem wołowym, oraz obniżyło wartości wskaźników ryzyka Castelliego w grupach zwierząt żywionych masłem. W doświadczeniu II w dietach zawierających tłuszcz palmowy w obecności magnezu wykazano spadek wartości profilu lipidowego i wskaźników ryzyka Castelliego w surowicy krwi. W grupach zwierząt żywionych dietami z olejem rzepakowym nie stwierdzono istotnego wpływu magnezu na profil lipidowy, z wyjątkiem obniżenia stężenia triacylogliceroli – częściowo potwierdzono hipotezę 2. Wniosek ten upoważnia do określenia magnezu jako „fizjologicznej statyny” (str 107), która w pierwszej kolejności wpływa na zwiększoną aktywność lipazy lipoproteinowej i bierze udział w

katabolizmie lipoprotein bogatych w trójglicerydy oraz wytwarzaniu cząstek HDL, następnie wspiera inaktywację reduktazy 3-hydroksy 3-metyloglutarylo-CoA (HMG-CoA) (etap ograniczający szybkość syntezy cholesterolu) oraz aktywuje acylotransferazę lecytynową cholesterolu, która obniża poziom cholesterolu LDL i trójglicerydów oraz podnosi poziom cholesterolu HDL.

Kolejny wniosek dotyczył zastosowania magnezu w dietach wysokotłuszczowych, który nie wpłynął na zawartość tłuszczu ogółem w wybranych narządach wewnętrznych szczurów Wistar, co nie potwierdzono hipotezy 3. Ponadto zastosowanie podwójnej ilości jonów magnezu nie wpłynęło na oznaczane parametry stresu oksydacyjnego – częściowo potwierdzono hipotezę 4. Ostatni wniosek dotyczył potwierdzenia hipotezy 5 dotyczącej zastosowania magnezu w dietach wysokotłuszczowych korzystnie wpływających na ekspresję mRNA genów związanych w metabolizmem tłuszczów.

Wyżej opisane wnioski są bardzo ciekawe i wnoszą nowe elementy poznawcze, rozszerzają wiedzę z dziedziny nauk rolniczych, ale także medycznych.

Z obowiązku recenzenta bardzo proszę o ustosunkowanie się Pani mgr inż. Eweliny Kukielki-Gastoł do kwestii wynikającej bezpośrednio z recenzji dysertacji doktorskiej podczas publicznej obrony. Wobec opisanego we wniosku ogólnym niepokojącego faktu, iż najwięcej niekorzystnych zmian w organizmie szczurów, szczególnie w profilu lipidowym, parametrach świadczących o funkcji wątroby oraz ekspresji genów wywołała podwyższona ilość tłuszczu palmowego w diecie, zasadnym jest rozszerzenie pytania na inne produkty tłuszczowe.

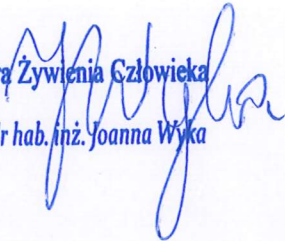
Bardzo proszę o odpowiedź na pytanie czy podobne efekty jak dla tłuszczu palmowego można się spodziewać przy zastosowaniu oleju kokosowego, którego spożycie znacząco wzrosło w aspekcie popularnego trendu stosowania diety paleo. Czy podobnych efektów metabolicznych można się spodziewać przy zastosowaniu tradycyjnie używanego w kuchni polskiej smalcu?

Podsumowanie

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy pracy, a więc przygotowanie badań i wykonanie analiz statystycznych, opracowanie teoretyczne tematu, interpretacje uzyskanych wyników uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Eweliny Kukielki-Gastoł pt.: "Wpływ jonów magnezu oraz rodzaju zastosowanego tłuszczu na wybrane parametry metabolizmu glukozy oraz lipidów w organizmie szczura Wistar" spełnia warunki określone w art.14 ust.1 pkt. 1 oraz ust. 2 pkt. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2014 r., poz. 1852 z późn. zm.), w zw. z art. 179 ust. 2 oraz ust. 3 pkt. 2 lit. b ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.)

Wnoszę zatem do wysokiej Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia o dopuszczenie Pani mgr inż. Eweliny Kukielki-Gastol do dalszych etapów postępowania o nadanie Jej stopnia doktora oraz o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Katedra Żywności Człowieka
prof. dr hab. inż. Joanna Wyka



Wrocław, dn. 08.05.2023r.

prof. dr hab. inż. Joanna Wyka