

Prof. dr hab. Paweł M. Pisulewski
Katedra Żywnienia Człowieka
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
ul. Balicka 122
30-149 Kraków

Kraków, dnia 10 czerwca, 2008 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Korniluk

Praca wykonana w Zakładzie Żywnienia Zwierząt Przeżuwających
Instytutu Fizjologii i Żywnienia Zwierząt PAN w Jabłonie
pod kierunkiem dr hab. Mariana Czauderny

(Podstawa prawna: Uchwała Rady Naukowej IFiZZ PAN w Jabłonie z dnia 6 lutego 2007 r.)

Wstępnie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Korniluk (zwanej dalej Doktorantką), zatytułowana: „**Profil kwasów tłuszczowych i wybranych pierwiastków u szczurów i owiec żywionych pasza z dodatkiem selenu, cynku i witaminy E lub izomerów sprzężonego kwasu linolowego**”, została przedstawiona w postaci druku zwartej, liczącej ogółem 191 stron tekstu, wraz z 72 tabelami i 6 rysunkami, ilustrującymi tekst lub wyniki badań. Wykaz literatury obejmuje łącznie imponującą liczbę 370 aktualnych pozycji, polskich i zagranicznych (głównie prac oryginalnych). Rozprawa ma klasyczny układ doświadczalnej pracy przyrodniczej.

Przedmiot rozprawy jest niewątpliwie aktualny. Stwierdzam również, że oceniana rozprawa jest kontynuacją wcześniejszych badań nad możliwością zwiększenia udziału izomerów sprzężonego kwasu linolowego (ang. *conjugated linoleic acid* – CLA) w tkankach szczurów i owiec, na drodze manipulacji żywieniowej. W niniejszych badaniach Doktorantka określiła wpływ izomerów CLA, drożdży selenowych (Se-Y) i ich kombinacji (CLA x Se-Y) podawanych szczurom oraz wpływ witaminy E, cynku ($ZnSO_4$) i Se (Na_2SeO_4) podawanych owcom na profil kwasów tłuszczowych (łącznie z CLA) w organizmach tych zwierząt.

W ocenie przedłożonej rozprawy zwracałem uwagę na: (1) jej stronę formalną (redakcyjną) tj. strukturę i umiejętność prezentacji poszczególnych rozdziałów rozprawy oraz (2) merytoryczną tj. adekwatność tytułu, znajomość najnowszych pozycji piśmiennictwa związanego z podjętym tematem badań, wartość merytoryczną założeń badawczych i

nowatorstwo celu pracy, poprawność metodyki badań, umiejętność prezentacji uzyskanych wyników, dyskusję (interpretację) wyników badań na tle piśmiennictwa, a także zasadność końcowych wniosków i komunikatywność streszczenia.

Tytuł rozprawy

Tytuł rozprawy oddaje w pełni przedmiot i zakres badań.

Nie mam zastrzeżeń.

Wstęp

Niniejszy rozdział zawiera kluczowe założenia i cele ocenianej rozprawy. Autorka Zwróciła tu uwagę na ujemne skutki spożycia produktów zwierzęcych o wysokim udziale SFA i niskim udziale MUFA i PUFA (w tym CLA). W tym kontekście wskazała na potrzebę wykorzystania strategii żywieniowych w kształtowaniu składu produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego, ze szczególnym uwzględnieniem profilu kwasów tłuszczowych (w tym CLA). Mając świadomość niskiej stabilności oksydatywnej wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (w tym CLA), wskazała na możliwość wykorzystania drożdży selenowych (Se-Y), witaminy E, cynku ($ZnSO_4$) i Se (Na_2SeO_4) jako czynników zapobiegających peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w organizmach szczurów i owiec. Nie mam wątpliwości, że zaproponowane przez Doktorantkę, jednoczesne kształtowanie i wzbogacanie profilu kwasów tłuszczowych w wielonienasycone kwasy tłuszczowe (w tym CLA) oraz wzbogacanie tkanek zwierzęcych w witaminę E i Se jest w pełni uzasadnione.

Przegląd literatury

Oceniając niniejszy rozdział stwierdzam, że Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy w zakresie objętym przedmiotem i zakresem rozprawy doktorskiej. Scharakteryzowała niezwykle wyczerpująco (co podkreślam!), nawiązując do najnowszych pozycji piśmiennictwa: strukturę chemiczną, pochodzenie, występowanie i aktywność biologiczną izomerów CLA. Zwróciła uwagę na ich naturalną obecność w tłuszczu mleka i mięsa przeżuwaczy, a także potencjalne możliwości wzbogacania żywności pochodzenia zwierzęcego w te związki. Omawiając aktywność biologiczną izomerów CLA wskazała na ich zdolność do redukcji udziału tłuszczu w tuszach zwierzęcych przy jednoczesnym przyroście masy mięśniowej (tzw. repartycji). Omówiła właściwości przeciwmiażdżycowe oraz przeciwnowotworowe tych izomerów, kontrowersyjną aktywność antyoksydacyjną, zdolność do stymulowania odpowiedzi immunologicznej, a także ich udział w procesie

formowania tkanki kostnej. W niniejszym rozdziale wyczerpująco został scharakteryzowany selen, ze szczególnym uwzględnieniem jego roli jako składnika antyoksydacyjnych selenoenzymów. Wskazano także na możliwość wykorzystania różnych form chemicznych selenu, jako prekursora selenoenzymów, przez ludzi i zwierzęta. W kontekście zdolności izomerów CLA do repartycji tkanki tłuszczowej i mięśniowej Doktorantka uznała za zasadne przebadanie poziomu aminokwasów w organizmach szczurów żywionych tymi izomerami. Zwróciła także uwagę na interakcje pomiędzy selenem i pierwiastkami mineralnymi (Zn, Fe, Ca i Mg) i wskazała na potrzebę określenia wpływu podawania CLA i Se na poziom tych pierwiastków w organizmach badanych zwierząt.

Odnosząc się krytycznie do redakcji i treści powyższego rozdziału mógłbym zarzucić Doktorantce jego nadmierne rozbudowanie. Doktorantka często odbiega od głównego zamysłu swej rozprawy. Przykładem jest podrozdział 2.2. Selen, który jest de facto artykułem przeglądowym nt. roli tego pierwiastka, łącznie z omówieniem chorób ludzi na tle niedoboru Se. Podobnie szczegółowo omówiono rolę pierwiastków mineralnych Ca, Mg, Cu, Fe i Zn. Z drugiej stron, trudno nie docenić wysiłku Doktorantki, która prawdopodobnie chciała przedstawić szerokie tło wielokierunkowego oddziaływania wspomnianych czynników doświadczalnych na organizm zwierzęcy. Co więcej, przekonała mnie, że wzbogacanie żywności pochodzenia zwierzęcego na drodze żywieniowej(j.w.) nie tylko zmienia zawartość podawanego składnika (np. CLA, Se), lecz także pociąga za sobą zmiany w szeroko rozumianym składzie tej żywności (m.in. zmiany składu aminokwasowego i mineralnego).

Hipoteza badawcza i cele naukowe pracy

Zgodnie z hipotezą badawczą niniejszej rozprawy, podawanie szczurom izomerów CLA, drożdży selenowych (Se-Y) i ich kombinacji (CLA x Se-Y) oraz podawanie owcom witaminy E, cynku ($ZnSO_4$) i Se (Na_2SeO_4) winno zwiększyć udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (łącznie z CLA) w organizmach tych zwierząt.

Szkoda, że Doktorantka nie wspomniała, że kryteriami wyboru czynników zapobiegających peroksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych (w tym CLA) w badanych organizmach były - jak sadzę - potencjalne właściwości przeciwutleniające: witaminy E jako takiej, cynku jako składnika dysmutaz ponadtlenkowych i selenu jako składnika peroksydaz glutationowych.

W oparciu o powyższą hipotezę sprecyzowano szczegółowe cele badawcze. Zwracam tu uwagę na te cele, które korespondują bezpośrednio z hipotezą rozprawy. W badaniach na

szczurach skoncentrowano się głównie na określeniu wpływu izomerów CLA i/lub drożdży selenowych (Se-Y) na: (1) profil kwasów tłuszczowych (SFA, MUFA i PUFA + CLA) w wybranych tkankach i narządach oraz osoczu krwi, (2) stężenie wybranych pierwiastków (Ca, Mg, Cu, Fe, Zn i Se) w wątrobie i mięśni udowym, (3) zawartość endo- i egzogennych aminokwasów w osoczu krwi, wątrobie i mięśni udowym oraz (4) poziom triacylogliceroli, cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji LDL i HDL w osoczu. Z kolei w badaniach na owcach określono wpływ podawania witaminy E, cynku ($ZnSO_4$) i Se (Na_2SeO_4) na: (1) profil kwasów tłuszczowych (SFA, MUFA i PUFA + CLA) oraz (2) poziom Ca, Mg, K, Cu, Fe, Zn i Se w wątrobie oraz mięśni najdłuższym grzbietu tych zwierząt.

Moim zdaniem, powyższe cele badawcze korespondują generalnie z założeniami rozprawy, odnoszącymi się do szczurów (1, 2 i 3) oraz owiec (4, 5), lecz w niektórych przypadkach zostały poszerzone o dodatkowe cele uwzględnione w rozdziale 5, podrozdziale 5.6. Moje wątpliwości budzi również 3 cel badawczy (str. 37). Odnoszę bowiem wrażenie, że wyniki korespondujące z tym celem badawczym (podrozdział 5.3) zostały uzyskane w odrębnym doświadczeniu, którego wcześniej nie sygnalizowano.

Material i metody

Ogólnie, w przedstawionej rozprawie zastosowano poprawną metodykę w badaniach żywieniowych na szczurach (Doświadczenie 1) i owcach (Doświadczenie 2). Opis postępowania jest na tyle szczegółowy, że pozwala na jego powtórzenie. Uwaga ta dotyczy również pobierania, przygotowania i analiz próbek materiału biologicznego

W ocenie niniejszego rozdziału wyróżniam znakomitą analitykę, w tym szczególnie izomerów CLA. Podkreślam, że warunkiem powodzenia badań żywieniowych, poświęconych tym związkom, jest ich poprawna identyfikacja, nie tylko jakościowa, lecz również ilościowa, będące same dla siebie wyzwaniem badawczymi. Warunek ten został, ponad wszelką wątpliwość, spełniony w rozprawie Doktorantki. Jest to o tyle istotne, że w ocenianych badaniach dysponowała zarówno mieszaninami, jak również indywidualnymi izomerami CLA (*cis-9*, *trans-11*, *trans-10*, *cis-12*).

Odnotowuję, że Doktorantka posiadała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej na przeprowadzenie przedmiotowych doświadczeń.

Uwaga: zwracam uwagę na błąd w równaniu służącym do obliczania frakcji LDL cholesterolu (str. 50). Oryginalne równanie Friedewalda ma inną postać !

Wyniki

Doktorantka wyjątkowo wyczerpująco (str. 52-126) prezentuje wyniki badań własnych. Tabele wyników zostały przedstawione w konwencji jednoczynnikowej tj. 10 kombinacji czynników doświadczalnych oraz 2 poziomów czynnika doświadczalnego (K-kontrola vs D-dieta doświadczalna), odpowiednio dla doświadczeń na szczurach i owcach (w przypadku owiec pominięto czynnik płci). W dodatkowych tabelach przedstawiono wpływ interakcji czynników doświadczalnych (CLAxSe) na badane parametry.

Spełniając obowiązek recenzenta zwracam uwagę na najważniejsze wyniki niniejszej rozprawy, uzyskane w badaniach na szczurach i owcach.

Po pierwsze, w ocenie wpływu izomerów CLA, Se-Y oraz kombinacji tych czynników doświadczalnych (CLA x Se-Y) na profil kwasów tłuszczowych (SFA, MUFA i PUFA + CLA) w wybranych tkankach i narządach szczurów oraz osoczu krwi, stwierdzono, że zarówno mieszaniny, jak również indywidualne izomery CLA, obniżają poziom SFA w mięśniu udowym i sercu szczurów. W tym ostatnim obniżył się również poziom MUFA i PUFA. Natomiast w wątrobie obserwowano wzrost poziomu SFA i spadek poziomu MUFA i PUFA. Izomery CLA były akumulowane przede wszystkim w tłuszczu okołojelitowym, a w minimalnym stopniu w osoczu krwi. Najwyższą akumulację izomerów CLA w wątrobie i mięśniu udowym obserwowano w efekcie podawania tych związków z Se-Y. Po drugie, równoczesne podawanie izomerów CLA i Se-Y zwiększało akumulację Se w wątrobie i mięśniu udowym szczurów. Stwierdzono także dodatnią korelację między stężeniem izomerów CLA w diecie i poziomem Ca i Mg w wątrobie. Po trzecie, izomery CLA, lecz bez względu na obecność Se-Y, obniżały stężenie endo- i egzogennych aminokwasów w osoczu i wątrobie, natomiast w mięśniu udowym obserwowano wzrost poziomu tych związków. Po czwarte, wpływ izomerów CLA na profil lipidowy osocza krwi był niejednoznaczny. Nie stwierdzono jednoczesnego wpływu izomerów CLA i Se-Y na poziom TAG, TC, LDL oraz HDL.

W badaniach na owcach, w wyniku podawania witaminy E, cynku ($ZnSO_4$) i Se (Na_2SeO_4) uzyskano następujące wyniki.

Po pierwsze, obserwowano wzrost poziomu izomeru *trans*-10, *cis*-12 w wątrobie; natomiast w mięśniu najdłuższym grzbietu efekt ten był niewielki i połączony ze spadkiem sumy CLA. Po drugie, obserwowano istotny wzrost poziomu Se w wątrobie i mięśniu najdłuższym grzbietu. Jednocześnie w mięśniu tym wystąpił spadek stężenia Ca i Mg.

Oceniając niniejszy rozdział stwierdzam, że omówione powyżej wyniki Doktorantki mają, w przeważającej mierze, charakter oryginalny. Rozdział ten został jednak do tego

stopnia rozbudowany i uszczegółowiony, że dopiero tekst streszczenia pozwolił mi na orientację w najważniejszych obserwacjach. W mojej subiektywnej opinii tekst wyników byłby bardziej klarowny, gdyby wyniki omówiono w konwencji dwuczynnikowej tj. osobno efekty izomerów CLA, osobno efekty Se-Y i osobno efekty ich interakcji (CLAxSe-Y).

Dyskusja wyników

W dyskusji Doktorantka omawia kolejno wyniki swych badań (z pominięciem wpływu badanych czynników na profil lipidowy osocza szczurów).

W ocenie tak zredagowanej dyskusji stwierdzam, że przedstawiona przez Doktorantkę interpretacja wyników badań własnych na tle dostępnego piśmiennictwa jest właściwa. Z uznaniem odnoszę się do interpretacji obserwacji dotyczących wpływu badanych czynników żywieniowych na zawartość i proporcje SFA, MUFA, PUFA i CLA w tkankach i narządach szczurów. Doktorantka zauważyła m.in., że wpływ izomerów CLA na stopień desaturacji kwasów tłuszczowych zależy nie tylko od konfiguracji tych izomerów, lecz także od rodzaju badanej tkanki lub narządu wewnętrznego. Odnotowała występowanie sprzężonych kwasów tłuszczowych, innych niż podawane izomery CLA, będących produktami desaturacji i elongacji tych ostatnich. Zwróciła też uwagę na większy potencjał antyoksydacyjny dodatku Se-Y w porównaniu z nieorganicznymi formami Se, co miało wpływ na wyższą akumulację izomerów CLA. Wpływ izomerów CLA oraz Se-Y na akumulację Ca i Mg w wątrobie i mięśni udowym szczurów wyjaśniła oddziaływaniem tych czynników na syntezę metalotionein. Zmiany w składzie aminokwasowym, zwłaszcza w mięśni udowym, wynikają prawdopodobnie z hipolipidemicznego oddziaływania izomerów CLA (głównie *t*-10, *c*-12), wywołującego wspomniane wcześniej zjawisko tzw. „repartycji”.

Próba wyjaśnienia wyników badań na owcach jest bardzo zawiła i pełna przypuszczeń. Generalnie jednak, zgadzam się z poglądem, że badane czynniki doświadczalne nie oddziaływały negatywnie na profil kwasów tłuszczowych i poziom składników mineralnych, zwłaszcza mięśnia najdłuższego grzbietu owiec (wzrost poziomu Se był tu niewątpliwie pożądany). Przeciwnie, Doktorantka uznała, że podawane dodatki były korzystne z punktu widzenia potrzeb fizjologicznych i mogą być bezpiecznie wykorzystywane w żywieniowych metodach modyfikowania składu produktów pochodzenia zwierzęcego.

Oceniając redakcję niniejszego rozdziału uważam, że Doktorantka zbyt często i zbyt obszernie omawiała wyniki wcześniejszych badań własnych i innych autorów, zamiast koncentrować się na własnych obserwacjach. Często i jednocześnie omawiała istotne i

nieistotne efekty czynników doświadczalnych, co znacznie utrudniało mi zrozumienie tekstu.
Uwaga: w pracy użyto niepoprawnego terminu: metaloteiny – powinno być metalotioneiny!

Najważniejsze wyniki i wnioski

Treść niniejszego rozdziału nie budzi moich zastrzeżeń. Główne obserwacje Doktorantki znajdują uzasadnienie w wynikach badań i nie wychodzą poza ich zakres. Uważam jednak, że należało wyodrębnić dwie grupy wniosków, a mianowicie: (1) wynikających z badań na szczurach i (2) owcach.

Doktorantka ma niewątpliwie świadomość, że właściwie sformułowanym wnioskiem jest jedynie wniosek 12.

Streszczenie

Niniejszy rozdział winien być rozprawą doktorską w miniaturze i oddawać jej główne założenia, pewne elementy metodyczne, najważniejsze wyniki i kończyć się generalną konkluzją. Redakcja rozdziału spełnia te kryteria. Nie mam uwag.

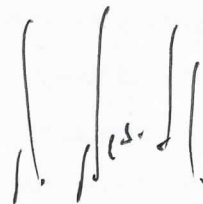
Literatura

Wysoko oceniam orientację Doktorantki w niezwykle obszernej, lecz zawsze adekwatnej, literaturze przedmiotu i dobór cytowanych pozycji. Bez zastrzeżeń.

W posumowaniu niniejszej recenzji wyrażam pogląd, że przedstawiona rozprawa, wnosi istotny wkład w poznanie potencjalnych możliwości kształtowania profilu kwasów tłuszczowych (udziału izomerów sprzężonego kwasu linolowego) oraz poziomu selenu w tkankach i narządach zwierząt (szczurów i owiec), na drodze manipulacji żywieniowej. Elementem nowości była próba określenia wpływu tych czynników żywieniowych i ich interakcji na poziom aminokwasów i pierwiastków mineralnych w tkankach i narządach szczurów. Wyróżniam wykorzystanie mieszanin i indywidualnych izomerów sprzężonego kwasu linolowego (cis-9, trans-11 i trans-10, cis-12) oraz próbę poznania ich losów metabolicznych w organizmie zwierzęcym. Za ważne uważam obserwacje, wskazujące na przeciwutleniające właściwości organicznej formy selenu (Se-Y), stabilizującego wielonienasycone kwasy tłuszczowe (w tym izomery sprzężonego kwasu linolowego), wbudowane do struktur organizmu żywego. Założone cele rozprawy zostały zrealizowane.

W pracy nie uniknięto pewnych uchybień formalnych, lecz przyjmując kryteria merytoryczne jej oceny za nadrzędne stwierdzam, że przedstawiona rozprawa świadczy o (1) dobrej znajomości przedmiotu badań, (2) opanowaniu warsztatu badawczego, zwłaszcza analityki izomerów sprzężonego kwasu linolowego (3) znajomości podstawowych metod statystycznych, (5) umiejętności interpretacji wyników i tym samym, (6) dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia prac badawczych.

Na tej podstawie, zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Korniluk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, consisting of several vertical strokes and a central horizontal stroke, likely representing the name of the reviewer.