



**UNIwersYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU**

Wydział Nauk Biologicznych  
i Weterynaryjnych

dr hab. Anna Nowakowska, prof. UMK  
Katedra Fizjologii Zwierząt i Neurobiologii  
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
ul. Lwowska 1  
87-100 Toruń  
e-mail: [noann@umk.pl](mailto:noann@umk.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Norberta Rączki zatytułowanej  
„Wpływ suplementów diety o zróżnicowanej zawartości kwasów tłuszczowych na morfologię  
hepatocytów i markery stresu oksydacyjnego w wybranych tkankach myszy”**

Recenzję wykonałam zgodnie z Uchwałą nr 4/2023 z dnia 25 stycznia 2023 roku Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach.

**Opis ogólny**

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska powstała na Wydziale Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, pod kierunkiem prof. UJK dr hab. Grażyny Świdorskiej-Kończak – promotora.

Rozprawa doktorska dotyczy powszechnie stosowanych suplementów diety o zróżnicowanej zawartości kwasów tłuszczowych i ich potencjalnego wpływu na morfologię hepatocytów i markery stresu oksydacyjnego w wybranych tkankach myszy.

Dysertacja ma charakter monografii, której układ jest typowy dla prac z zakresu nauk biologicznych. Składa się ona z dziewięciu rozdziałów oraz dodatkowo ze spisu rysunków, tabel i wykresów. Poza wstępem teoretycznym, opisem stosowanych metod i grup eksperymentalnych, opisem wyników i dyskusją, w pracy umieszczono 8 rysunków, 36 wykresów i 75 tabel oraz kilka fotografii, o których jednak nie wspomniano w spisie treści. Całość poprzedza wykaz stosowanych skrótów. Monografia liczy 128 stron maszynopisu, a jej część merytoryczna została przygotowana w oparciu o 269 pozycji literaturowych.



Wstęp został podzielony na podrozdziały, a jego pierwsza część dotyczy zagadnienia suplementacji i wybranych suplementów diety. Wiedza o konieczności suplementacji kwasów tłuszczowych, przy diecie ubogiej w ryby, wydaje się być powszechną, jednak informacje o konsekwencjach niekontrolowanej suplementacji a nawet jej negatywnych skutkach mogą być pewnym zaskoczeniem. Kolejne podrozdziały opisują kwasy tłuszczowe, zjawisko stresu oksydacyjnego i całego systemu obrony przed negatywnymi skutkami działania wolnych rodników tlenowych, powstających w nadmiarze w czasie metabolizmu kwasów tłuszczowych. Po wstępie teoretycznym Doktorant sformułował cel pracy służący zweryfikowaniu dwóch postawionych hipotez.

W kolejnym rozdziale – Materiał i metodologia badań – Autor opisuje wykorzystane w badaniach zwierzęta, grupy eksperymentalne i zastosowane procedury. W mojej ocenie zabrakło w tym rozdziale informacji o tym, na jakiej podstawie przyjęto dawki (10  $\mu$ l i 50  $\mu$ l) suplementów podawanych zwierzętom eksperymentalnym. Jak się okazało, informacje te można było odnaleźć w Dyskusji, i dobrze że są tam umieszczone, jednak na etapie koncepcji i planowania eksperymentu informacja ta, według mnie, jest niezbędna. Zdaję sobie sprawę z tego, iż przemilczenie tego faktu nie było celowe, nie mniej jednak planując opisanie doświadczenia należałoby wyeliminować wszystkie czynniki, które w jakikolwiek sposób mogłoby utrudnić potencjalnemu czytelnikowi zrozumienie założeń pracy badawczej, a recenzentowi dokonanie właściwej oceny. Wiadomo bowiem, że wiele parametrów fizjologicznych zależy od dawki przyjmowanych preparatów. Uważam, że doświadczenia zostały zaplanowane w sposób prawidłowy. Część metodyczna pracy wymagała od Doktoranta staranności wykonania, cierpliwości, a nawet punktualności. Procedury badań na zwierzętach wymagają także umiejętności pracy z żywym materiałem oraz dołożenia wszelkich starań, aby nie zaburzać dobrostanu zwierząt, gdyż każdy dodatkowy stres mógłby rzutować na otrzymane wyniki, zwłaszcza w kontekście zmian metabolizmu, który ma ścisły związek z systemem obrony antyoksydacyjnej. Zwierzęta kontrolne poddawano tym samym procedurom behawioralnym, a zamiast suplementów podawano im wodę. Na oceniany przeze mnie rezultat pracy składają się poszczególne jej etapy, takie jak zaplanowanie doświadczeń, ich przeprowadzenie, poprzez hodowlę w odpowiednich warunkach, suplementację, po techniki histologiczne i biochemiczne.



Wyniki otrzymane z grup eksperymentalnych Doktorant konfrontował z wynikami uzyskanymi dla grup kontrolnych. Następnie dokonał analizy statystycznej wyników i przedstawił je w tabelach oraz na wykresach. W mojej ocenie forma prezentowania wyników w tabelach nie była konieczna, a śmiem twierdzić, że wręcz utrudnia ona śledzenie zmian badanych parametrów, gdyż wyników jest bardzo dużo, a to z kolei wymaga śledzenia zmian w kilku czy kilkunastu tabelach jednocześnie. Moje wątpliwości budzi zastosowana w pracy analiza statystyczna. Według mojej wiedzy badano 12 grup zwierząt, które podzielono ze względu na rodzaj podawanego suplementu w dwóch różnych dawkach, a następnie pobierano do analizy wątrobę i nerkę. Zatem badano, jaki jest wpływ konkretnego suplementu w dawce 10  $\mu$ l lub 50  $\mu$ l na zmiany parametrów w dwóch tkankach. Idąc tym tropem, przy tak zaplanowanych eksperymentach mamy następujące zmienne zależne: aktywność enzymów (każdego z osobna), stężenie MDA, stężenie cholesterolu i stężenie triacylogliceroli, natomiast zmienne niezależne to rodzaj suplementu (tran islandzki, olej z wiesiołka, oliwa z oliwek, preparat omega3-6-9, olej kokosowy), dawka (10  $\mu$ l i 50  $\mu$ l) i rodzaj badanego narządu (wątroba, nerka). A to oznacza, że można było (a nawet trzeba było) zastosować analizę trzyczynnikową. Wówczas testem *post hoc* można by było sprawdzić czy istnieje wpływ dawki danej substancji na aktywność enzymów lub stężenie badanego parametru w danej tkance. A ponadto można by było sprawdzić czy każda z tych wymienionych zmiennych niezależnych wpływa na wynik, czy też istnieje interakcja pomiędzy rodzajem zażywanej substancji a jej dawką i badaną tkanką. W opisanych przez Doktoranta wynikach nie mamy takiej analizy. Autor z jakiegoś powodu zdecydował się przeprowadzić dwie różne analizy jednoczynnikowe, które *de facto* nie pozwalają oszacować różnicy wpływu suplementów w różnych dawkach na status antyoksydacyjny różnych narządów, ponadto nie pozwalają zauważyć interakcji pomiędzy zmiennymi niezależnymi. Co prawda podjął On próbę opisanie tych zmian na wykresach typu box plot, jednak uważam, że taki sposób analizy umniejsza tej pracy i niejako utrudnia dogłębne zanalizowanie problemu. Dlatego też analiza wyników w dużej mierze jest przypuszczeniem. I tak też zostało to zinterpretowane, bo rozdział Wnioski to nie są wnioski tylko raczej podsumowanie otrzymanych wyników. Mimo tego uchybienia wyniki zostały skonfrontowane z danymi literaturowymi, tam gdzie oczywiście było to możliwe.



Przedstawiona w pracy polemika została oparta na literaturze naukowej, zarówno tej najnowszej, jak i tej pochodzącej nawet z ubiegłego wieku. W pracy zacytowano imponującą liczbę publikacji (269 prac), z czego 18% stanowią publikacje z ostatnich 5 lat, 15% z ostatnich 10 lat, 45% ostatnich 20 lat, a pozostałe są starsze. Z jednej strony taki dobór literatury świadczy o tym, iż problem jest badany od lat, ale z drugiej, co pokazują najnowsze prace, problem jest wciąż aktualny - nie do końca zbadany. W mojej ocenie wybór publikacji jest trafny.

Praca została napisana na ogół poprawnym językiem, z dobrze dobranymi odnośnikami. Jednak Autor do końca nie mógł się zdecydować czy w nawiasach cytuje według kolejności alfabetycznej nazwisk, czy według roku wydania publikacji. Wielokrotnie stosuje wyjaśnienia skrótów, albo stosuje skrót, który wyjaśnia dopiero w dalszej części tekstu; na przykład skróty użyte na stronie 12 wyjaśnione są dopiero na stronie 14. Oczywiście zawsze można sięgnąć po spis użytych skrótów zamieszczony na początku pracy, ale unikanie tego typu błędów redakcyjnych znacznie ułatwia pracę recenzentowi i nie daje sposobności do wskazywania niedociągnięć. Poza jednym skrótem – TBARS – wszystkie można było znaleźć w spisie. Nazwy rozdziałów również można by dobrać trafniej. Na przykład podrozdział 1.4 noszący tytuł Endogenne antyoksydanty zawiera opis tylko glutationu zredukowanego, a z kolei następny podrozdział 1.5 nosi nazwę Antyoksydanty enzymatyczne. To w takim razie może poprzedni powinien nazywać się Antyoksydanty nieenzymatyczne? (Podziału antyoksydantów dokonujemy zazwyczaj według klucza: endo- i egzogenne albo enzymatyczne i nieenzymatyczne). Bardzo często Autor używa na określenie stężenia danego związku słowa „poziom”, co oczywiście wynika z tłumaczenia z języka angielskiego „level”, ale w języku polskim jest to błędem. Wadą jest umieszczanie ogromnej ilości wyników w postaci tabel (o czym pisałam wcześniej). Gdyby analiza statystyczna została przeprowadzona inaczej (o czym również wspominałam), nie byłoby potrzeby umieszczania wyników w takiej formie. Wystarczyłyby wykresy zmian aktywności enzymów z naniesionymi gwiazdkami, odzwierciedlającymi różnice znamienne statystycznie, zarówno pomiędzy dawkami, jak i suplementami w tej samej dawce. Oczywiście decyzja o analizie wyników i sposobie ich prezentacji należała w tym przypadku do Doktoranta, jednak z uwagi na wyznaczoną mi rolę pozwałam sobie zasugerować, jak można było lepiej opisać wyniki, aby były czytelne i zrozumiałe, a także łatwiejsze do dyskusji. Jeśli Doktorant wraz z Panią Promotor zdecydują się na opublikowanie tych wyników polecałabym zastosować się do mojej



rady. Dość nietypowe jest także powtarzanie krótkiego fragmentu tekstu na rozpoczęcie każdego kolejnego podrozdziału Dyskusji. Na pierwszy rzut oka taką formę dyskusji można by uznać za wadliwą. Jednak po zastanowieniu uznaję, że taka forma okazuje się pomocna, gdy Autor oddzielnie analizuje wpływ poszczególnych suplementów diety na badane parametry, a tak właśnie tak jest w tej pracy. Ostatecznie uważam, że choć nie jest to powszechnie stosowane w monografiach z zakresu nauk biologicznych, w przypadku analizy wpływu różnorodnych substancji na różne parametry stresu oksydacyjnego, ma swoje uzasadnienie, gdyż porządkuje i ułatwia analizę tych wyników. Praca nie jest pozbawiona błędów literowych, powtórzeń wyrazów czy błędów stylistycznych: „częstotliwość” zamiast „częstość”, „adipocyty tkanki tłuszczowej” – jakby mogły być inne, „preparat omega 6-6-9” zamiast preparat omega 3-6-9, „istotne zmiany statystyczne” zamiast „istotnie statystycznie zmiany”, kwasy „posiadają szereg korzyści” zamiast „kwasy wykazują szereg korzyści”, czy „ich działanie może być korzystne” – wiadomo, że posiadać możemy tylko rzeczy materialne. W pracy można znaleźć także błędne merytorycznie zdania (np. Dyskusja strona 89; „Stwierdzono także zmniejszenie poziomu produktów utleniania białek m.in. dialdehydu malonowego”, który jak wiadomo jest końcowym produktem utleniania lipidów. Niektóre podpisy umieszczone pod rycinami są w języku angielskim. Nie wiem skąd taki pomysł, mogę tylko przypuszczać, iż ryciny te stanowiły fragment jakiegoś posteru lub prezentacji wystąpienia ustnego. W pracy wprowadza to niepotrzebny chaos. Zastanawia mnie także forma przedstawienia wniosków. W mojej ocenie brakuje także jasno sformułowanych wniosków, a to co kryje się pod nazwą rozdziału to raczej skondensowana forma wyników. Wszystkie wymienione, z obowiązku recenzenta, uchybienia nie umniejszają wagi merytorycznej całej pracy, którą uważam za dobrze przygotowaną i bardzo wartościową.

### **Ocena merytoryczna**

Oceniając dysertację należy zwrócić szczególną uwagę na rangę wybranego zagadnienia. Suplementy diety w postaci kwasów tłuszczowych stosowane są od wielu lat, jednak wciąż brakuje dokładanych informacji o tym, które z parametrów fizjologicznych ulegają poprawie po ich stosowaniu. Należy pamiętać, że do prawidłowego wzrostu i rozwoju, a także właściwego funkcjonowania wszystkich narządów, zwłaszcza układu sercowo-naczyniowego, siatkówki oka i mózgu człowieka, niezbędne są właśnie kwasy omega-3 i omega-6. Znając ich biologiczne działanie wyznaczono prawidłowy stosunek podaży omega-6 : omega-3, który wynosi 4-5 : 1.



Jednak, jak podają dane literaturowe, w przeciętnym sposobie odżywiania Europejczyka proporcja ta znacznie odbiega od prawidłowej (15-20 : 1) z powodu zbyt wysokiego spożycia kwasów tłuszczowych omega-6 i tłuszczów zawierających kwasy tłuszczowe nasycone. Stwarza to podwyższone ryzyko rozwoju wielu chorób cywilizacyjnych. Dlatego kwasy omega-3 EPA i DHA powinny być dostarczane w pożywieniu bądź właściwie suplementowane. Problem suplementacji jest niezwykle istotny, gdyż zarówno producenci, jak i sprzedawcy reklamują swoje produkty jako te, które przynoszą najlepsze efekty. Pytanie, jak ocenić efektywność suplementów, pozostaje wciąż bez jednoznacznej odpowiedzi. Ilość pojawiających się w ostatnich latach suplementów jest tak duża, że sprawdzenie skuteczności ich działania na własnym ludzkim organizmie stało się niemożliwe, a co najważniejsze ocena ich działania nie byłaby niczym innym jak subiektywnym wrażeniem poprawy lub pogorszenia zdrowia. Oczywiście można sięgnąć chociażby po materiały popularnonaukowe, ale dla przeciętnego kupującego owe specyfiki, literatura nie jest najważniejsza. Na szczęście istnieje wiele periodyków o charakterze medycznym, naukowym, które prezentują wyniki badań eksperymentalnych związanych ze skutecznością i/lub nieskutecznością działania suplementów. To właśnie działania badaczy prezentujących rzeczowe dowody mogą przysłużyć się do świadomego podejścia do oferowanych nam specyfików, rzekomo poprawiających jakość zdrowia i życia. Tematyka badawcza recenzowanej pracy wpisuje się zatem w nurt obecnej potrzeby szczegółowej analizy efektów, wynikających często z nadmiernej i/lub nieuzasadnionej suplementacji preparatami zalegającymi półki sklepowe. Oczywiście nie podważam uzasadnionej potrzeby suplementacji, czyli korzystania z dobrodziejstwa tych preparatów w uzasadnionych przypadkach, ale zwracam uwagę na to, iż nieuzasadnione spożywanie suplementów, może nie dawać żadnej korzyści, lecz wręcz przeciwnie, szkodzić.

Pan mgr Rączka postawił sobie za cel wykazanie, że suplementy diety mogą negatywnie wpływać na potencjał antyoksydacyjny organizmu, a nawet, w skrajnych przypadkach, wywoływać silne działanie toksyczne. Realizacja tego zadania polegała na analizie wpływu wybranych preparatów zawierających kwasy tłuszczowe, podawane w dwóch dawkach 10  $\mu$ l i 50  $\mu$ l (dawki zostały ustalone na podstawie norm żywieniowych opracowanych dla ludzi, przy czym niższa dawka była zalecaną przez Instytut Żywności i Żywienia a wyższa dawka przekraczała górny tolerowany poziom spożycia). Doktorant postawił dwie główne hipotezy; 1) nadmiar



tłuszczowych suplementów diety powoduje zwiększenie metabolizmu i wzrost wolnych rodników tlenowych w wybranych tkankach myszy, 2) suplementacja dużymi dawkami kwasów tłuszczowych obniża „poziom” glutationu w badanych tkankach, a tym samym wpływa na aktywność enzymów glutationowych. Cztery główne zadania badawcze służące do zrealizowania postawionego celu obejmowały: (i) analizę stężenia glutationu oraz dialdehydu malonowego w wątrobie i nerce myszy po suplementacji *per os* preparatami zawierającymi kwasy tłuszczowe w objętości 10  $\mu$ l i 50  $\mu$ l, (ii) określenie aktywności peroksydazy glutationowej, reduktazy glutationowej, transferazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy w wątrobie i nerce myszy po suplementacji *per os* preparatami zawierającymi kwasy tłuszczowe w objętości 10  $\mu$ l i 50  $\mu$ l, (iii) ocenę stężenia triacylogliceroli i cholesterolu całkowitego w wątrobie i nerce myszy po suplementacji *per os* preparatami zawierającymi kwasy tłuszczowe w objętości 10  $\mu$ l i 50  $\mu$ l oraz (iv) analizę zmian strukturalnych w wątrobie myszy po suplementacji *per os* preparatami zawierającymi kwasy tłuszczowe w objętości 10  $\mu$ l i 50  $\mu$ l. Przytoczone wyżej zadania badawcze, same w sobie nie budzą żadnych zastrzeżeń, jednak w mojej ocenie nie posłużyły do zweryfikowania postawionych hipotez. Stąd moje pytanie: jak została zweryfikowana hipoteza o tym, iż nadmiar kwasów tłuszczowych powoduje wzrost wolnych rodników tlenowych? Pośrednio można snuć przypuszczenia o zmianie ich stężenia na podstawie badania szeregu antyoksydantów, zarówno enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych. Co prawda zrealizowane cele badawcze pozwalają poznać wpływ suplementów na parametry fizjologiczne, biochemiczne, morfologiczne, ale nie dały jednoznacznej odpowiedzi na tak postawioną hipotezę. Oczywiście można dyskutować o słuszności postawionych i hipotez, i celów, i mam nadzieję, że moje wątpliwości zostaną rozwiane podczas obrony tej rozprawy.

Realizacja zamierzonego celu wymagała wielu oznaczeń, może nie skomplikowanych, ale czasochłonnych i w przypadku pracy z żywym organizmem modelowym zawsze obarczonych ryzykiem błędu. Nie mniej jednak otrzymane wyniki można było opisać i zinterpretować. W mojej ocenie Doktorant rozwiązał oryginalny problem badawczy, jaki przed sobą postawił. Było to możliwe dzięki dobrze przemyślanej, zaplanowanej i precyzyjnie wykonanej pracy. Udało się ustalić wpływ suplementów diety na wybrane parametry. Identyfikacja wpływu i poznanie wybranych suplementów wnosi wiele nowego nie tylko w biologię, farmację i nauki pokrewne, ale pozwala także zaprojektować dalsze badania, które mogą dotyczyć szerszego ich działania.



Oceniana dysertacja łączy w sobie badania z pogranicza medycyny, farmakologii, fizjologii, biologii komórki, i co ważne, prowadzi do rozwikłania problemu, który dotyczy życia codziennego ogromnej liczby ludzi. Zatem jej rozpowszechnienie ma niewątpliwie wartość aplikacyjną. Oczywiście nie wszystko zostało w temacie powiedziane i jest on wciąż otwarty, jednak z pewnością może zostać wykorzystany do wyznaczania nowych nurtów badawczych, zarówno podstawowych, jak i porównawczych.

### **Podsumowanie**

Otrzymane przez Doktoranta wyniki, mimo wcześniej wytkniętych uchybień, uważam za bardzo wartościowe oraz inspirujące do prowadzenia dalszych badań. Jego osiągnięcia pozwalają oczekiwać dalszych postępów w tej dziedzinie, być może we współpracy z fizjologami np. fizjologami sportu, bo w tej dziedzinie suplementacja jest stosowana na bardzo szeroką skalę. Na zakończenie pragnę jeszcze raz podkreślić wagę problemu badawczego oraz jego potencjalne wykorzystanie w życiu wielu ludzi.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Norberta Rączki spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r poz. 1668, z późn. zm.) i dlatego zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie Pana mgr Norberta Rączki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Toruń, dnia 27 marca 2023r.

dr hab. Anna Nowakowska, prof. UMK