

Poznań, 25.01.2016r.

Dr hab. Dorota Piasecka-Kwiatkowska
Katedra Biochemii i Analizy Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Ul. Mazowiecka 48
60-623 Poznań

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Adriana Bartosa
pt. „Nikiel jako alergen pokarmowy”

wykonanej w Instytucie Podstaw Chemii Żywności
na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej
pod kierunkiem dr hab. Joanny Leszczyńskiej – promotor pracy
dr inż. Elżbiety Polak – promotor pomocniczy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Adriana Bartosa stanowi wielowątkowe opracowanie dotyczące problemu alergii pokarmowej na nikiel. Praca jest kompleksowym opracowaniem, w którym omówiono zarówno zagadnienia związane z ekspozycją człowieka na nikiel drogą pokarmową, jak również problemy z jego detekcją.

Problem alergii na nikiel jest poważnym problemem współczesnego społeczeństwa. Biorąc pod uwagę powszechność występowania, nikiel jest najczęstszą przyczyną alergii kontaktowej, szacuje się że w Europie dotyczy ona 50-60 milionów ludzi. Jedną z przyczyn tego zjawiska upatruje się w powszechnym używaniu przedmiotów zawierających ten metal. Nikiel wnika do organizmu przez skórę, drogi oddechowe i przewód pokarmowy. Alergii nie wywołują jednak jony niklu, które są zbyt małe aby mogły zostać zauważone przez układ immunologiczny, ale związki kompleksowe, które metal ten tworzy z łatwością, np. ze składnikami żywności, czy białkami wewnątrz i zewnątrzkomórkowymi. Temat alergii kontaktowej na nikiel jest podejmowany przez wielu autorów i choć wiadomym jest, że metal ten jest również przyczyną alergii pokarmowej to niewiele jest prac z tego obszaru. Wychodząc temu naprzeciw w przedstawionej do recenzji dysertacji mgr inż. Adrian Bartos podjął się kompleksowego przeanalizowania problemu alergii pokarmowej na nikiel, analizując jego podaż z żywnością, jak również podejmując próbę zastosowania niekonwencjonalnych metod detekcji tego pierwiastka. **Wybór problematyki badawczej przedstawionej do oceny pracy uważam za oryginalny i interesujący z naukowego punktu widzenia.**

Przedstawiona do oceny rozprawa jest napisana poprawnym językiem i stanowi zwarte opracowanie obejmujące 128 stron maszynopisu. Wyniki badań zebrano w dziewiętnastu

tabelach i przedstawiono na dwudziestu wykresach i jednym rysunku. Oceniana dysertacja jest typową pracą o charakterze eksperymentalnym podzieloną na dwie zasadnicze części: teoretyczną i badawczą, w której znajduje się uzasadnienie i cel podjęcia badań, ich metodyka, omówienie wyników wraz z dyskusją, podsumowanie z wnioskami i spis literatury. Zastosowana przy opracowaniu rozprawy bibliografia została dobrze wyselekcjonowana, uwzględniając najważniejsze pozycje naukowe dotyczące opracowywanej tematyki, obejmuje 174 pozycje. **Dobór merytoryczny źródeł oraz ich sposób wykorzystania uważam za prawidłowy.**

Na początku dysertacji znajduje się jej streszczenie w języku polskim i angielskim. Umieszczenie go na początku pozwala czytelnikowi już na wstępie zapoznać się z tym, co Autor uważa za najistotniejsze w swojej pracy.

Zasadniczą część rozprawy rozpoczyna podzielona na pięć rozdziałów część teoretyczna, wprowadzająca w główne problemy związane z przedmiotem badań. Ta część, opisana na 23 stronach, została opracowana na podstawie dobrze dobranego piśmiennictwa naukowego. W pierwszym rozdziale tej części omówiono problemy alergii, która ze względu na odnotowywane zwiększanie się przypadków zachorowań, słusznie określona została przez Autora współczesną epidemią. W kolejnych trzech rozdziałach scharakteryzowany został nikiel, jego znaczenie biologiczne i szkodliwość. Ostatni rozdział części teoretycznej poświęcony został immunometrycznym metodom oznaczania metali. **Podsumowując, część teoretyczną oceniam pozytywnie i uważam, że stanowi dobre wprowadzenie do części eksperymentalnej. Została opracowana na podstawie bardzo dobrze dobranego piśmiennictwa naukowego, jest napisana w sposób skondensowany, a jednocześnie wyczerpująco wyjaśnia poruszane zagadnienia.**

Dalszą część pracy stanowi część badawcza, w której wydzielono pięć rozdziałów. W pierwszym uzasadniono potrzebę podjęcia badań i sprecyzowano ich cel. Autor za cel pracy postawił sobie określenie obrazu interakcji i wpływu, jaki wywiera ciągła obecność niklu w codziennym otoczeniu na organizm człowieka. Ponadto podjął się też opracowania niekonwencjonalnych metod oznaczania niklu. Tak postawione cele realizował kolejno wykonując dobrze zaplanowane zadania badawcze.

Z niedociągnięć w tej części pracy chcę wymienić niefortunne sformułowanie zamieszczone na stronie 29: „praca ma za cel zmniejszyć ekspozycję człowieka na nikiel pokarmowy – za sprawą budowania lepszej świadomości dietetycznej, jak i poprawy warunków produkcji żywności”. Podjęcie takich działań wykracza poza ramy tej eksperymentalnej pracy, choć uzyskane wyniki mogą stać się w przyszłości przyczynkiem motywacją do ich zainicjowania. Dlatego w dalszej ocenie pracy nie brałam tego celu pod uwagę, traktując to sformułowanie jako skrót myślowy Autora.

Kolejne dwa rozdziały części badawczej stanowią opis zastosowanej metodologii oraz wyniki badań wraz z ich omówieniem. Oba te rozdziały zostały podzielone na osiem identycznie wydzielonych podrozdziałów. Taki sposób prezentacji pozwala w łatwy sposób powiązać zastosowane metody badawcze z uzyskanymi wynikami. Opis metodologii poprzedza wykaz odczynników, sprzętu i aparatury badawczej zastosowanej przy realizacji badań. Metodologię badań omówiono na 24 stronach maszynopisu, jest to materiał dobrze przygotowany i szczegółowo opisany. Ogólna ocena zastosowanych metod badawczych jest bardzo wysoka. Są one nowoczesne, dobrze opisane i stanowią dobry standard dla tego typu badań. W pierwszych czterech podrozdziałach autor opisał metody związane z oceną ekspozycji na nikiel drogą pokarmową. Ilość niklu spożywanego w codziennej diecie przez badaną grupę, którą stanowiło dwudziestu studentów i dziewięciu pracowników naukowych Politechniki Łódzkiej, oszacowano na podstawie badań ankietowych. Pomiar biodostępności niklu pokarmowego oraz identyfikację źródeł jego napływu do żywności dokonano na podstawie pomiaru w wybranych produktach metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej z atomizacją w kuwecie grafitowej (GF-ASA). Natomiast asymilację niklu określono mierząc jego stężenie w surowicach krwi metodą spektroskopii mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS). Wszystkie zastosowane metody zostały prawidłowo zaplanowane i opisane.

W kolejnym rozdziale części metodycznej opisano sposób w jaki sprawdzano alergenicność pokarmową niklu z wykorzystaniem surowic pacjentów z nadwrażliwością kontaktową na nikiel. Badania te przeprowadzono techniką pośredniego testu ELISA, co jest typowe dla takich oznaczeń. Do tej części pracy nasuwa się jednak pytanie:

- *Dlaczego w badaniach, jako drugorzędowe przeciwciało stosowano znakowane anty-ludzkie IgG, a nie anty-ludzkie IgE? Pomimo, że wielokrotnie w pracy (także we wnioskach) podkreślano, że nikiel jako alergen pokarmowy odpowiedzialny jest za powstawanie nadwrażliwości typu I.*

Następne trzy podrozdziały metodyki opisują szczegółowo sposoby postępowania przy opracowywaniu przez Autora niekonwencjonalnych metod oznaczania niklu. Metody te wykorzystywały jako narzędzia detekcyjne, uzyskane specjalnie na potrzeby tej pracy przeciwciała poliklonalne (18 surowic) oraz szczepy bakterii *E. coli* rekombinowane genem PzraP, responsywnym wobec obecności metali w środowisku hodowli mikroorganizmów. Metody zostały opisane dosyć szczegółowo, ale przy tak szerokim materiale popełniono pewne przeoczenia:

- *Rozdział 7.6.3.3. str. 41 - niejasny jest dla mnie sposób w jaki unieruchamiano jony niklu na powierzchni płytki mikrotitracyjnej. Jony niklu ze względu na swoje niewielkie rozmiary są traktowane jako hapteny i dlatego nie mogą być unieruchomione na jej*

powierzchni. Czy zastosowano jakiś specjalny rodzaj podłoża lub sposób unieruchamiania? Czy sprawdzono efektywność wiązania niklu do powierzchni płytki? Bardzo proszę o wyjaśnienie tych kwestii.

- Nie opisano zastosowanych metod statystycznych, choć z zaprezentowanych wyników widać, że przynajmniej w podstawowym zakresie były wykorzystywane.
- Wykresy 1 (str. 45) i 2 (str.47): równania opisujące krzywe wzorcowe powinny mieć postać $y=ax$.
- W tej części pracy można zauważyć wielokrotnie stosowany żargon laboratoryjny, a także niefortunne sformułowania, np.:
 - często powtarzane: „próby nakładano na dołek”
 - na str. 37: „płytkę poddano analizie absorpcji fal...”
 - na str. 41: „protokół ELISY”
 - na str. 41: „płukanie na płuczce”
 - na str. 41: „przeciwciała typu IgG”
 - na str. 46: „z roztworu pobierano objętość 250 μ l, którą poddawano analizie spektrofotometrycznej” itp.

Pomimo przedstawionych powyżej uwag, **w mojej opinii dobór metodyki był odpowiedni do założonego celu, zarówno w zakresie badań związanych z ekspozycją na nikiel drogą pokarmową, jak również realizacji badań związanych z opracowaniem metod detekcji niklu metodami biologicznymi.**

Ponad połowę rozprawy (62 strony) stanowi prezentacja, omówienie i dyskusja wyników. Rozdział ten, podobnie jak część metodyczną, podzielono na osiem analogicznie zatytułowanych podrozdziałów, co jak już wcześniej zaznaczałam, pozwala na łatwe powiązanie stosowanej metodyki z uzyskanymi rezultatami.

W pierwszych czterech podrozdziałach analizowano wybrane grupy ludzi pod kątem ich ekspozycji na nikiel drogą pokarmową. Oszacowano ilości spożywanego niklu w codziennej diecie, zidentyfikowano źródła jego napływu do żywności, a także określono jego biodostępność i asymilację.

Na podstawie badań ankietowych stwierdzono, że wśród analizowanej grupy respondentów ilość niklu wprowadzanego przez nich do organizmu z pożywieniem nie przekracza maksymalnego poziomu poboru tego składnika. Różnica w podaży była niewielka i zależała głównie od wieku ankietowanych. Młodszą grupę respondentów stanowili studenci Politechniki Łódzkiej, którzy spożywają większą ilość artykułów mięsnych mocno przetworzonych oraz słodczy i stąd wynika większy pobór niklu. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant podszedł z należyty dystansem i rozwagą do uzyskanych rezultatów,

dostrzegając że wyniki byłyby bardziej obiektywne, gdyby zostały opracowane na podstawie bezpośredniego pomiaru niklu w zadeklarowanych próbkach żywności, a nie tylko danych literaturowych.

Biodostępność niklu określono w odniesieniu do 4 grup produktów: próbki pieczywa wraz z dodatkami roślinnymi stosowanymi do ich wypieku, czekolady, ziołowe przyprawy i orzechy. Wykazano, że uwalnianie niklu z żywności podczas trawienia zależy od matrycy w jakiej się znajduje. Uzyskane wyniki jasno pokazały, że zawartość niklu w materiale nie wpływa znacząco na stopień jego uwalniania. Tak więc przy układaniu diety niskoniklowej, dedykowanej osobom z alergią, należy wziąć pod uwagę nie tylko bezwzględną zawartość tego pierwiastka w produkcie, ale także jego skład, gdyż ten wpływa znacząco na stopień uwalnianie niklu z produktu.

W kolejnej części badano wpływ podaży niklu na jego asymilację w organizmie. Autor nie stwierdził różnic w zawartości niklu w surowicy krwi osób ze zdiagnozowaną alergią kontaktową i stosujących dietę eliminującą nikiel z pożywienia, a grupą kontrolną. Jednak, jak słusznie podkreśla Doktorant, nawet osoby stosujące dietę niskoniklową narażone są na ekspozycję na „ukryty” nikiel. Stąd pobór przez nie niklu może być wyższy od zakładanego pomimo przestrzegania diety. Do uzyskanych wyników z całą pewnością należy podejść z odpowiednim dystansem, również dlatego, że badania przeprowadzono na bardzo małej populacji. W tego typu badaniach częstym problemem jest znalezienie odpowiednio licznej reprezentatywnej grupy.

W pracy badano także zmienność w biokumulacji niklu w żywności związanej z różnicami odmianowymi, gatunkowymi, wpływem naturalnego środowiska, jak również miejscem i sposobem przetwarzania surowców. Autor szczegółowo przeanalizował zawartość niklu w produktach uzyskiwanych na poszczególnych etapach przemiału ziarna zbóż na mąkę oraz produkcji różnych gatunków chleba. Uzyskane wyniki wskazują, że procesy technologiczne, jakim poddawana jest żywność, zwłaszcza o charakterze mechanicznym, mogą zwiększać ilość niklu w produktach. Zaskakującym rezultatem jest jednak mniejsza zawartość niklu obserwowana po fermentacji i wypieku. Autor sugeruje, że wynika to z tworzenia się lotnych połączeń jonów tego pierwiastka ze składnikami ciasta. *Taka interpretacja wyników wymaga bardziej szczegółowego wyjaśnienia, w jaki sposób metale ciężkie mogą tworzyć związki aromatyczne w żywności.*

W kolejnej części pracy Autor sprawdzał alergienność niklu z wykorzystaniem surowic osób ze zdiagnozowaną alergią kontaktową. Spośród zastosowanych 12 surowic tylko trzy wykazywały specyficzność wobec wolnych jonów niklu, z tego tylko dwie dawały zadawalający sygnał analityczny. Do tej części wyników badań nasuwają się sygnalizowane we wcześniejszej części recenzji pytania: *dlaczego w badaniach, jako drugorzędowe*

przeciwciała stosowano znakowane anty-ludzkie IgG? W jaki sposób przeprowadzono unieruchomienie wolnych jonów niklu na płytce mikrotitracyjnej?

Następne podrozdziały dotyczyły detekcji wolnych jonów niklu za pomocą uzyskanych na potrzeby tej pracy króliczych i mysich przeciwciał. Immunogenami zastosowanymi do uczulania zwierząt były kompleksy białka z jonami niklu oraz chelatowe związki niklu z białkiem nośnikowym. Zlecenie przez Doktoranta produkcji przeciwciał wyspecjalizowanej firmie zewnętrznej było bardzo rozsądnym rozwiązaniem, ponieważ zwiększało szanse na uzyskanie przeciwciał o zaplanowanej specyficzności, co jest kluczowe dla metod immunometrycznych.

Ze względu na zastosowanie jako jednego ze składników immunogenu albuminy bydlęcej, która jest najczęściej stosowanym białkiem blokującym wolne miejsca na płytce mikrotitracyjnej, przed przystąpieniem do zasadniczej części badań Autor sprawdzał możliwość stosowania innych substancji blokujących. Spośród zastosowanych substancji najbardziej odpowiednią okazała się żelatyna rybia.

W badaniach potwierdzono także specyficzność uzyskanych przeciwciał wobec kompleksów immunogenu zarówno zawierającego wolne jony niklu, jak i jego chelatowe związki. W toku badań Autor sprawdzał immunoreaktywność otrzymanych przeciwciał wobec jonów niklu. *Ponownie w tym miejscu pracy nasuwa się pytanie o sposób wiązania wolnych jonów niklu z matrycą, co jest kluczowe przy omawianiu tej części pracy. Nie znalazłam też informacji odnośnie do stosowanego stężenia przeciwciał detekcyjnych. Ponadto nie zamieszczono tabel, do których są odwołania w tekście na str. 83 i 86.*

Interesującym, oryginalnym sposobem detekcji wolnych jonów niklu, zaproponowanym przez mgr inż. Adriana Bartosa, jest zastosowanie do immobilizacji specyficznych przeciwciał magnetocząstek. Dzięki takiemu rozwiązaniu możliwe jest wychwytywanie jonów niklu bezpośrednio w roztworze, można je następnie eluować z takiego układu i oznaczać ilościowo z zastosowaniem klasycznych metod chemii nieorganicznej. **Choć z powodu niskiej specyficzności otrzymanych przeciwciał nie udało się przeprowadzić selektywnego oznaczenia niklu tą metodą, to zaprojektowanie takiego rozwiązania przez Doktoranta należy uznać za jego sukces naukowy.**

W ostatnim podrozdziale prezentującym wyniki badań przedstawiono efekty zastosowania rekombinowanych bakterii do detekcji jonów niklu. Uzyskane rezultaty potwierdzają, że możliwa jest detekcja jonów metali przy wykorzystaniu tej metody, niestety zastosowany model wykazywał dość umiarkowaną czułość wobec jonów niklu.

Choć podjęte przez mgr Adriana Bartosa próby opracowania niekonwencjonalnej metody detekcji jonów niklu nie skończyły się spektakularnym sukcesem, to wskazują

na możliwość opracowania metod z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał i metod inżynierii genetycznej, i już ten fakt należy uznać za osiągnięcie naukowe.

Po zakończeniu omawiania wyników przedstawiono podsumowanie pracy, pokazujące jej najistotniejsze elementy i osiągnięcia. Rozdział ten wskazuje na dojrzałość naukową mgr inż. Adriana Bartosa, który z dystansem spogląda na uzyskane rezultaty i w sposób syntetyczny je omawia naprowadzając na wnioski, które zostały sformułowane na końcu tego rozdziału.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano dziewięć w większości nie budzących wątpliwości wniosków. W moim odczuciu przeredagowania wymagają jednak:

- *trzeci wniosek: w pierwszym zdaniu należy usunąć błędy stylistyczne. Drugie, dotyczące formowania lotnych związków zawierających nikiel nie zostało potwierdzone przez badania prowadzone w ramach tej pracy*
- *piąty wniosek: typ alergii pokarmowej na nikiel nie był określony w tej pracy. Zastosowanie w tej pracy do identyfikacji immunokompleksów drugorzędowych przeciwciał anty-ludzkich IgG tym bardziej podważa takie wnioskowanie.*

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim jest kompleksowe przeanalizowanie problemu alergii pokarmowej na nikiel, obejmujące zarówno podaż tego pierwiastka z żywnością, jak również próbę opracowania niekonwencjonalnych metod jego detekcji. Doktorant właściwie dobrał metody oraz przeprowadził badania i zaprezentował wyniki. Równocześnie wykazał się dogłębną wiedzą teoretyczną. Zauważone w trakcie recenzji niedociągnięcia nie wpływają zasadniczo na obniżenie wartości merytorycznej pracy, wymagają jedynie wyjaśnienia i dyskusji przed ich opublikowaniem. Zaprezentowana do oceny praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim w świetle „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami. W związku z tym **wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Adriana Bartosa do publicznej obrony i dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

D. Piorecka-Kwiatkowska