

Wzeli 08.09.2017
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
M. Podkowicka-Ok
Prodziekan ds. Nauki

prof. dr hab. Marianna Podkowicka-Ok
Dr hab. Dariusz Zuba, prof. IES

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. prof. dra Jana Sehna
w Krakowie

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO	
wpl. dnia	07-09-2017
L. dz. DL/	3316117
Znak sprawy DL	

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Anny Godlewskiej pt.

Ocena bezpieczeństwa stosowania suplementów diety przyjmowanych w celu redukcji masy ciała

Charakterystyka i znaczenie podjętej problematyki badawczej

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Godlewskiej dotyczy bezpieczeństwa stosowania suplementów diety, w szczególności tych które są przyjmowane w celu obniżenia masy ciała. Jest to obecnie bardzo istotny problem. Tryb życia i nawyki żywieniowe zwłaszcza młodych ludzi prowadzą do otyłości, a jednocześnie w środkach masowego przekazu lansowany jest „kult szczupłości”, który sprawia, że nawet osoby nie mające w rzeczywistości problemów z otyłością starają się zmniejszyć masę ciała.

Niestety, wiele osób zamiast zmienić styl życia czy stosować odpowiednią dietę sięga po prostsze rozwiązanie, jakim są szeroko i głośno reklamowane „suplementy diety”. Użycie cudzysłowu w odniesieniu do tego typu preparatów jest nieprzypadkowe, bo jak pokazują wyniki badań naukowych, w tym badania własne Doktorantki będące podstawą rozprawy doktorskiej, a także te wskazane w części wstępnej pracy i w dyskusji, wiele produktów sprzedawanych jako „suplementy diety” nie spełnia ustawowych kryteriów takiego środka. Suplement diety bowiem, zgodnie z ustawą o bezpieczeństwie żywności i żywienia, to środek spożywczy, który ma uzupełniać normalną dietę, być skoncentrowanym źródłem witamin, składników mineralnych lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny, z wyłączeniem produktów posiadających właściwości produktu leczniczego w rozumieniu przepisów Prawa farmaceutycznego. Wyniki analiz wskazują natomiast, że w skład wielu produktów oferowanych jako suplementy diety wchodzi inne substancje i środki, w szczególności produkty lecznicze wycofane z użycia, o czym nabywca nie jest informowany.

Brak informacji o rzeczywistym składzie takich preparatów może być źródłem poważnych szkód zdrowotnych u osób je przyjmujących. Najszerszej dotychczas zbadaną grupą zafałszowanych suplementów diety są te stosowane w zaburzeniach erekcji. Wyniki badań wskazują, że bardzo duży odsetek preparatów dostępnych na rynku, szczególnie w tzw. szarej strefie (sklepy internetowe, targowiska), zawiera w swoim składzie sildenafil, składnik aktywny m.in. preparatu leczniczego „Viagra”. Kupujący nie są informowani o rzeczywistym składzie i przeciwwskazaniach do jego stosowania, którymi są m.in. równoległe stosowanie donorów tlenu azotu lub azotanów w jakiegokolwiek postaci (np. nitrogliceryny), przebyty niedawno udar mózgu lub zawał serca, niskie ciśnienie tętnicze, ciężka niewydolność wątroby czy dziedziczne degeneracyjne zmiany siatkówki (np. retinopatia barwnikowa). W konsekwencji przyjęcie preparatów zawierających sildenafil może prowadzić nawet do zgonu. Doktorantka podjęła się oceny bezpieczeństwa innej bardzo popularnej grupy suplementów diety, stosowanych w celach odchudzających. Jak wykazano w rozprawie, zagrożenia zdrowotne również w przypadku tej grupy środków są bardzo duże.

Układ pracy i struktura podziału treści

Rozprawa doktorska została podzielona na 7 rozdziałów, uzupełnionych streszczeniem w języku polskim i angielskim, a także wykazem piśmiennictwa. Ponadto Autorka zamieściła listę ilustracji, spis tabel oraz formularz ankiety stosowanej w badaniu. Praca liczy 145 stron, z czego ponad 100 stanowi opis części eksperymentalnej z omówieniem wyników i dyskusją. Struktura pracy jest prawidłowa.

W Rozdziale 1 podano prawną definicję suplementu diety, dokonano jego porównania do produktu leczniczego wskazując na istotne różnice na etapie rejestracji, dostępności, w zakresie metod sprzedaży czy w nadzorze. Autorka pracy zwróciła również uwagę na odmienne wymagania w zakresie opisu opakowań tych typów produktów, które często przez nabywców traktowane są zamiennie i brak wiedzy wielu ludzi co do ograniczonych wymogów w stosunku do suplementów diety. Podkreśliła duży i stale rosnący udział suplementów w rynku. Następnie opisała szczegółowo najczęściej wykrywane zafałszowania suplementów diety i wskazała na małą liczbę badań w tym zakresie, w szczególności dotyczących produktów dostępnych na polskim rynku. Część Rozdziału 1 poświęciła problematyce czystości mikrobiologicznej produktów, która jest określana niezwykle rzadko, przedstawiając m.in.

procedury i normy krajowe i międzynarodowe stosowane do oznaczania. Ostatnią część tego rozdziału poświęciła problemowi samoleczenia otyłości.

W Rozdziale 2 Autorka rozprawy przedstawiła właściwości chemiczne oraz wpływ na organizm człowieka środków stosowanych w celu redukcji masy ciała, zwracając szczególną uwagę na ich toksyczność. Omówiła właściwości sibutraminy, dinitrofenolu, kofeiny, fenterminy, fenoloftaleiny, a także surowców roślinnych – liści herbaty, ziaren kawy, owocni pomarańczy gorzkiej i ziela przęśli. Szczególną uwagę zwracają własnoręcznie wykonane ryciny przedstawiające te rośliny. Następnie Doktorantka szczegółowo omówiła rodzaje grzybów mogących występować w materiale roślinnym i mykotoksyn wytwarzanych przez podane szczepy pleśni.

Cel pracy został określony w Rozdziale 3. Autorka rozprawy przedstawiła w nim trzy hipotezy badawcze, a następnie określiła zadania służące ich weryfikacji.

W kolejnym rozdziale podane zostały materiały i metody badawcze. Analizowane produkty przedstawiono opisowo oraz za pomocą licznych fotografii. Następnie zebrano stosowane odczynniki i sprzęt laboratoryjny, jak również podano parametry metod instrumentalnych oraz sposób przygotowania próbek do poszczególnych rodzajów analiz. Określone zostały również podstawowe zasady przeprowadzania walidacji. W odniesieniu do analiz mikrobiologicznych podano rodzaj użytego materiału oraz sposób przygotowania próbek, a także przebieg analiz. Przedstawiono również metodykę badań ankietowych i charakterystykę grupy badanej.

W Rozdziale 5 Doktorantka przedstawiła wyniki analiz jakościowych składu produktów wykonanych za pomocą metody GC-MS, analiz ilościowych zawartości kofeiny i sibutraminy przeprowadzonych metodą UHPLC, jak również analiz mikrobiologicznych wybranych produktów. Ponadto podała dane nt. badanych produktów znalezione w rejestrze suplementów diety znajdującym się na stronie internetowej Głównego Inspektoratu Sanitarnego. Szczegółowo omówiła również wyniki analizy ankiety, ze szczególnym zastawieniem powtarzających się dolegliwości wymienionych przez ankietowanych. W dalszej części Rozdziału 5 Doktorantka zestawiała otrzymane wyniki analityczne i na ich podstawie określiła status prawny badanych preparatów. W końcowej części zestawione zostały wyniki badań ankietowych, w tym BMI osób badanych, liczba „straconych” kilogramów, wyniki analiz jakościowych i ilościowych stosowanych preparatów, a także stwierdzone skutki uboczne.

Rozdział 6 stanowi szczegółowe omówienie wyników i szeroką dyskusję nt. bezpieczeństwa stosowania suplementów diety w celu redukcji masy ciała, po którym przedstawiono wnioski z badań.

W pracy znajduje się aż 150 odnośników literaturowych, co świadczy o szerokim rozeznaniu tematyki badawczej przez Doktorantkę. Dobór pozycji literaturowych należy uznać za właściwy.

Praca napisana jest w sposób staranny. Należy podkreślić dbałość Doktorantki o formę języka. Autorka rozprawy posługuje się poprawną polszczyzną, swobodnie operując nią w złożonej tematyce naukowej. Uwagę zwraca również duża dbałość o formę graficzną pracy.

Ocena metod badawczych, sposobu przeprowadzenia badań i analizy uzyskanych wyników

Recenzowana praca miała charakter eksperymentalny. Należy stwierdzić, że badania zostały odpowiednio zaplanowane, a dobór substancji, rodzajów eksperymentów oraz aparatury badawczej, jak też sposób przeprowadzenia badań oraz analiza i dyskusja uzyskanych wyników były właściwe.

Należy jednak wskazać, że plan pozyskania próbek do badań był ryzykowny i w znaczny sposób utrudnił analizę danych. Doktorantka nie miała wpływu na rodzaj i ilość materiału badawczego dostarczanego przez osoby nabywające suplementy diety, pozbawiła się też w wielu przypadkach możliwości powtórzenia czy rozszerzenia badań. Również z dozą ostrożności należało podchodzić do danych przedstawianych w ankietach, w szczególności skutków ubocznych zgłaszanych przez poszczególne osoby czy efektywności działania środków, ponieważ dane te nie były w żaden sposób weryfikowane. Na te niedoskonałości ankiet zwróciła zresztą uwagę w pracy sama Doktorantka, która wykazała się krytycznym podejściem do oceny uzyskanych wyników, a wnioski z badań wyciągała z właściwą ostrożnością.

Analiza jakościowa „suplementów diety” została przeprowadzona metodą GC-MS. Jest to technika rytunowo stosowana w laboratoriach kryminalistycznych do określania składu nieznanymi substancjami. Cechuje ją duża selektywność, ale w niektórych przypadkach – w szczególności w odniesieniu do materiału pochodzenia roślinnego, przy przeprowadzaniu analiz w trybie skanowania jonów jak w niniejszej pracy – ma ograniczoną wykrywalność i należy w odpowiedni sposób przygotowywać próbki do analizy. Doktorantka wyselekcjonowała

substancje, których obecność monitorowała w badanych preparatach, tj. sibutraminę, kofeinę, fenterminę, fenoloftaleinę, synefrynę, DNP, efedrynę i kwas chlorogenowy. Zastosowana metoda pozwalała również na wykrywanie innych związków niż te ujęte we wstępnym planie, np. w preparacie 79 wykryto dimetyloglicynę. W mojej ocenie w pracy zabrakło danych z walidacji tej metody, wykazujących w sposób jednoznaczny, że granice wykrywalności (kluczowe dla metody jakościowej) są wystarczająco niskie, aby wykryć analizowane związki w stężeniach mających znaczenie dla oceny bezpieczeństwa stosowania preparatów i ewentualnego stwierdzenia zafałszowania. Jest to szczególnie istotne w odniesieniu do kwasu chlorogenowego, czyli związku którego obecność miała potwierdzać roślinne pochodzenie suplementu diety, a tym samym, że źródłem kofeiny były wyciągi z ziaren kawy. Należy domniemywać, że skoro Doktorantka była świadoma znaczenia wyników takiej analizy, opracowała metodę należycie. W przedstawionej do recenzji rozprawie nie znalazłem jednak na to dowodów.

Analizę ilościową kofeiny i sibutraminy Autorka pracy wykonała metodą UHPLC. Jest to właściwa metoda do zamierzonego celu. Metoda UHPLC cechuje się dobrą powtarzalnością i odtwarzalnością, a także czułością. Niezależnie od tego, bardzo ważne jest właściwe przygotowanie próbki do badań, zapewniające w szczególności, że całość substancji zawarta w badanym preparacie zostanie wyekstrahowana lub w inny sposób przeniesiona do próbki analitycznej (albo przynajmniej proces ten będzie powtarzalny). Dlatego bardzo istotne jest badanie odzysku, a także ewentualnego wpływu matrycy na wynik badania. Dokładność metody, a także jej precyzja, są kluczowe w interpretacji wyników ilościowych, w szczególności przy porównaniach do wartości z przepisów prawnych, norm czy wartości deklarowanych. W recenzowanej rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki walidacji w tym zakresie, jednak niedostyt recenzenta wzbudza ilość danych pozwalających je zweryfikować (nie określono liczby analizowanych próbek, pomiary prowadzono prawdopodobnie jedynie na jednym poziomie stężenia, nie określono w jaki sposób dokonywano przeliczenia stężenia w próbce analitycznej na masę substancji i czy wyznaczone parametry walidacyjne dotyczą roztworów czy też wyniku końcowego). Przedstawione w pracy wartości dokładności i precyzji są na poziomie akceptowalnym w analizach farmaceutycznych czy kryminalistycznych.

Analizy mikrobiologiczne przeprowadzono dzięki uprzejmości pracowników Katedry i Zakładu Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Metoda MALDI-TOF pozwoliła na identyfikację wielu bakterii drożdży i grzybów dzięki porównaniu z biblioteką widm Filamentous Fungi Library v1.0.

Bardzo istotnym elementem pracy były badania ankietowe, które mimo ich ograniczeń dostarczyły dużo cennych informacji w kontekście oceny bezpieczeństwa stosowania suplementów diety w celu redukcji masy ciała.

Doktorantka wykazała dużą dojrzałość naukową w przeprowadzeniu analizy danych i omówieniu uzyskanych wyników. Wnioski zostały wyciągnięte we właściwy sposób i porównywane z wynikami badań innych autorów. Dzięki temu Doktorantce udało się zrealizować zamierzony cel badań.

Recenzowana praca zawiera elementy nowości. Autorka zwróciła uwagę na niedostrzegany dotychczas problem braku powtarzalności masy preparatów suplementów diety, również w ramach jednego opakowania, co przekłada się na różnice w wielkości dawek czynnych zawartych w poszczególnych porcjach. Różnice w zawartości substancji czynnej znacznie przekraczały te akceptowalne w przypadku preparatów leczniczych i dochodziły do kilkuset procent. Na tej podstawie Doktorantka wyciągnęła słuszny wniosek, że w badaniach zafalszowanych suplementów diety należy analizować każdą porcję preparatu, a nie stosować statystyczne metody próbkowania. Wykazała również, że nawet w przypadku jednakowego wyglądu opakowania i tego samego numeru serii, dawka substancji czynnej w preparacie „suplementu diety” może być różna. Kolejnym istotnym zagadnieniem było wykazanie obecności pleśni w wielu preparatach, również tych których wygląd nie wskazywał na pochodzenie roślinne. Świadczy to o bardzo niskich standardach wytwarzania, przechowywania i transportu tego typu „suplementów diety”. Wyniki badań Doktorantki stanowią jednoznaczny dowód na to, że zafalszowane suplementy diety stosowane w celu redukcji masy ciała stanowią zagrożenie dla zdrowia publicznego i w tym kontekście powinny stanowić podstawę do zaostrzenia przepisów dotyczących zarówno rejestracji jak i kontroli suplementy diety.

Uwagi szczegółowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Godlewskiej napisana jest w sposób poprawny, wyniki przedstawiono zwięźle i zostały one odpowiednio omówione, a wnioski wyciągnięto w należyty sposób. Niezależnie od tego, w toku analizy rozprawy nasunął mi się szereg wątpliwości, które pozwoliłem sobie przedstawić poniżej.

- Niewłaściwa, w mojej ocenie, jest numeracja poszczególnych podrozdziałów (choć sam układ pracy jest właściwy). Dlaczego np. surowce roślinne (podrozdział 2.1.1) są podrozdziałem substancji syntetycznych (2.1) czy wyniki analizy ilościowej kofeiny (5.1.1) i sibutraminy (5.1.2) podrozdziałami wyników analizy jakościowej (5.1)? Ponadto poszczególne parametry walidacji (granica oznaczalności, precyzja, itd.) powinny być podrozdziałami działu „Walidacja”, a nie być na tym samym poziomie.
- Na stronie 21 DNP określono raz jako „2,4-dinitrofenol” a raz jako „1,2-dinitrofenol” – czy są to te same substancje (do obu można zastosować skrót DNP)?
- Proces walidacji został przedstawiony w sposób niewystarczający. Dla przykładu, opis znajdujący się na stronie 52 zawiera sformułowania typu „za LOQ przyjęto najmniejsze stężenie kalibracyjne, które spełniało wymogi ustalone dla krzywej kalibracyjnej”, jednak nie określono jakie to były wymogi, „precyzja została wyznaczona na podstawie relacji między średnim stężeniem kofeiny w próbce, a względnym odchyleniem standardowym (sformułowanie bardzo niejasne i nieprecyzyjne), „materiał nie wymagał oddzielenia analitu od matrycy, zatem nie obliczano odzysku” (informacja wzbudzająca wątpliwości, bo zarówno na etapie walidacji jak i późniejszych badań oddzielano analit od matrycy).
- W pracy nie ma przedstawionych granic wykrywalności poszczególnych związków (a jako granice oznaczalności przyjęto arbitralnie najniższe stężenie wzorca kalibracyjnego).
- Na wykresie 5.8 i dalszych nie opisano osi OY. Jeśli była to liczba przypadków, to na wykresie 5.8 prawdopodobnie pomylono opis („kobiety”, „mężczyźni”), choć z danych zawartych w pracy wynika, że najstarszy miał być mężczyzna, tak jak jest na wykresie. Również błędne dane przedstawione są prawdopodobnie na wykresie 5.9 (żaden mężczyzna zgodnie z wykresem nie miał masy ciała większej niż 70 kg, a z tekstu wynika, że średnia masa mężczyzn wynosiła 88,2 kg).
- Omówienie wyników analizy jakościowej (podrozdział 6.1) zawiera szereg informacji odnoszących się do danych, które nie zostały przedstawione w części wynikowej (np. odnośnie powtarzalności wyników, optymalizacji sposobu rozcieńczania próbek).
- Recenzent nie wie w jakim celu należałoby skonfrontować uzyskane wyniki analiz ilościowych z wynikami uzyskanymi metodą LC-MS i dlaczego ilość zgromadzonego materiału do badań była zbyt mała, żeby takie badania wykonać, a taki jest jeden z wniosków z badań.

- Zastanawiająca jest również przyczyna przedstawiania różnych wyników w streszczeniu w języku polskim i angielskim.
- Praca zawiera błędy edytorskie, np. część zdań zaczyna się małą literą. Niekiedy dla współautorów publikacji używane jest określenie „i wsp.” a niekiedy „et al.”.

Podsumowanie

Treść rozprawy doktorskiej potwierdza, że Pani mgr Anna Godlewska posiada dużą wiedzę na temat suplementów diety, poprawny warsztat analityczny, potrafi właściwie zaplanować i przeprowadzić badania oraz zinterpretować uzyskane wyniki. W sposób kompleksowy podeszła do oceny bezpieczeństwa suplementów diety stosowanych w celu redukcji masy ciała, analizując ich składniki czynne, zagrożenia mikrobiologiczne, zgłaszane działania uboczne, a także poddając analizie zasadność ich stosowania. W sposób szczegółowy przeanalizowała dostępne piśmiennictwo, zarówno krajowe jak i zagraniczne. Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Godlewskiej zawiera zatem istotny przyczynek do problematyki bezpieczeństwa stosowania suplementów diety.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonej oceny stwierdzam, że rozprawy doktorska Pani mgr Anny Godlewskiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595, z późn. zm.) i stawiam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Anny Godlewskiej do publicznej obrony.



Kraków, dnia 28 sierpnia 2017 roku