



RECENZJA

rozprawy doktorskiej **“Opracowanie układów dostarczania aktywnych biologicznie substancji o potencjale transformacji mikrobiomu jelitowego”**

Pana mgr. farm. Szymona Sip

stanowiącej podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk farmaceutycznych

przygotowanej pod kierunkiem promotorów: prof. dr hab. n. farm. Judyty Cieleckiej-Piontek oraz dr hab. n. med. Marcina Żarowskiego i wykonanej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji i Biomateriałów Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr Szymona Sip stanowi zbiór pięciu powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w latach 2022 – 2024, w czasopismach znajdujących się w wykazie Ministerstwa Edukacji i Nauki (zgodnie z artykułem 187 ust. 1 pkt. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce). Ocena merytoryczna każdego z artykułów, wchodzących w skład cyklu publikacji została przeprowadzona przez recenzentów powołanych przez redakcje czasopism, w których opublikowano artykuły. Sumaryczna wartość współczynników oddziaływania IF tych publikacji wynosi 31,5 i 580 punktów MNiSW.

Wszystkie publikacje są kilkuautorskie, a mgr Szymon Sip jest ich pierwszym autorem. Jednakże w żadnej publikacji nie jest autorem korespondencyjnym. Doktorant przedstawił deklaracje wkładu własnego i pozostałych autorów, które jasno wskazują na duże zaangażowanie Pana magistra w opracowanie koncepcji prac oraz przeprowadzenie eksperymentów, głównie przygotowania ekstraktów, oznaczenia zawartości ciał czynnych, preparatyki układów uwalniania i oceny ich aktywności biologicznej (z wyjątkiem testów mikrobiologicznych i testu DPPH w jednej z publikacji), oraz przygotowania manuskryptów i odpowiedzi na recenzje. Wykonane badania są interdyscyplinarne. W prace włączyli się badacze z Politechniki Poznańskiej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie oraz Uniwersytetu Medyczny w Lublinie, co wskazuje na umiejętność współpracy doktoranta z innymi badaczami, oczywiście pod kierunkiem promotorów.

DOROBEK DOKTORANTA

Na uwagę zasługuje duża aktywność naukowa doktoranta, którą rozpoczął już podczas studiów magisterskich. Był członkiem Studenckiego Koła Naukowego Chemia Leków oraz Koła Naukowego Herba. Ponadto, w trakcie trwania studiów magisterskich odbył roczny staż w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Mgr Sip był wykonawcą w sześciu projektach finansowanych ze źródeł zewnętrznych, z czego cztery projekty były realizowane w latach 2016-2019, czyli przed obroną pracy magisterskiej. Oprócz prac stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora, mgr Sip jest współautorem 14 manuskryptów oraz 11 streszczeń konferencyjnych (w tym prezentowane przez niego: jedna prezentacja ustana i siedem plakatowych), co jest wynikiem jego pracy na stanowisku samodzielny referenta naukowo-technicznego, a następnie asystenta w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji i Biomateriałów Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

WYBÓR TEMATU

Jak wskazuje literatura naukowa, mikrobiom jelitowy ma istotny wpływ na zdrowie człowieka, a zaburzenia jego funkcjonowania zostały powiązane z rozwojem wielu chorób. Zrozumienie roli mikrobioty jelitowej oraz produkowanych przez nią w procesach fizjologicznych i patologicznych metabolitów ma kluczowe znaczenie dla opracowania innowacyjnych strategii terapeutycznych, zwłaszcza w kontekście leczenia chorób cywilizacyjnych. Celem tych strategii jest wzmocnienie puli bakterii probiotycznych poprzez dostarczanie im substancji stymulujących ich wzrost, a także substancji aktywnych, modulujących procesy patologiczne, takie jak otyłość, cukrzyca, choroby autoimmunologiczne czy neurodegeneracyjne, dla których stwierdzono istnienie zależności pomiędzy chorobą a zaburzeniem homeostazy mikrobiomu.

Ogólnym celem ocenianej rozprawy doktorskiej było opracowanie układów dostarczania ekstraktów roślinnych i czystych substancji aktywnych z wybranymi nośnikami oraz ustalenie czy wywierają one korzystny wpływ na mikrobiom jelitowy.

Postawiony cel jest bardzo istotny ze zdrowotnego punktu widzenia i może mieć praktyczne przełożenie na wytwarzanie korzystnych dla zdrowia formułacji/suplementów/wyborów medycznych, które mogą modulować skład ludzkiego mikrobiomu.

CEL I TREŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Aby zrealizować przedstawiony powyżej cel doktorant postanowił

- 1) Scharakteryzować pod względem składu chemicznego i aktywności biologicznej ekstrakty uzyskane z kilku odmian dwóch gatunków roślin: derenia jadalnego, oraz jagody kamiczackiej
- 2) Przygotować systemy dostarczania wybranych ekstraktów oraz dwóch indywidualnych flawonoidów, aglikonu – fisetyny, oraz glikozydu – hesperydyny, z różnymi nośnikami (inuliną – publ. 1, dekstranem – publ. 3, zeiną i cyklodekstryną – publ. 4, oraz kopovidonem – publ. 5)
- 3) Scharakteryzować rozpuszczalność, przenikalność oraz aktywność biologiczną wybranych ekstraktów i związków w opracowanych układach oraz ocenić ich zdolność do transformacji mikrobiomu jelitowego

Oprócz ogólnego celu badawczego w autoreferacie zabrakło hipotez badawczych, które połączyłyby prezentowane prace w jeszcze bardziej spójną całość. Publikacje: 1, 4, i 5 stanowią zamknięte koncepcyjnie badania. Publikacje: 2 i 3 są ze sobą powiązane poprzez poddany badaniom materiał roślinny- liście jagody kamiczackiej. W publikacji 2 doktorant poddał analizom ekstrakty sporządzone z liści pięciu odmian tego gatunku. Oceniał czystość mikrobiologiczną, oznaczył zawartość substancji aktywnych, oraz ocenił *in vitro* ich aktywność przeciwwzapalną, przeciwhiperlipidemiczną i przeciwutleniającą. Na podstawie przeprowadzonych analiz wytypował odmianę, która charakteryzowała się największym potencjałem prozdrowotnym. Powyższe wyniki stały się jednocześnie punktem wyjścia do przeprowadzenia dalszych prac preformulacyjnych, w których wykorzystano odmianę, u której stwierdzono najwyższą aktywność biologiczną (*Jugana*). Prace te opisano w publikacji 3. Mgr Sip dokonał procesu optymalizacji ekstrakcji liści odmiany *Jugana*, a następnie na podstawie oceny aktywności biologicznej w testach *in vitro* (antyoksydacyjnej, oraz hamowania enzymów: glukozydazy, hialuroidazy i lipazy) wybrał ekstrakt, z którym sporządził formułacje z dekstranem o różnej długości łańcucha. Następnie został oceniony wpływ tych układów na wzrost bakterii probiotycznych. Publikacja 1 była koncepcyjnie zbliżona do publ. 3, również dotyczyła badań nad ekstraktami otrzymanymi z różnych odmian, tym razem czterech odmian owoców derenia jadalnego, i miała na celu charakterystykę chemiczną i wybór ekstraktu mającego największy potencjał hamowania glukozydazy i potencjał przeciwutleniający. Najlepszy ekstrakt uzyskany z odmiany *Wydubieckij* zawieszono w roztworze inuliny i oceniono jego wpływ na mikrobiotę jelitową. Dużą zaletą tej pracy jest ocena opracowanej formułacji *in vivo*, u szczurów. Publikacje 4 i 5 były poświęcone w istotnym stopniu wytworzeniu układów dostarczania indywidualnych substancji, a także ocenie wpływu tych układów na żywotność bakterii probiotycznych (publ. 4) i patologicznych (publ. 5).

Autor autoreferatu skupił się na opisanu poszczególnych prac, mniej miejsca poświęcił treściom łączącym te prace w koncepcyjną całość. Oprócz szczegółowych wniosków dotyczących indywidualnych prac można było jeszcze porównać poszczególne układy dostarczania pomiędzy sobą, od tego najprostszego, zawierającego jedynie ekstrakt i inulinę, poprzez różne długości łańcuch dekstranu, różne kompozycje solubilizatorów, a skończywszy na amorficznym układzie z kopovidonem.

Niemniej jednak wartość merytoryczna opisanych badań jest bardzo duża. Stanowią one istotny wkład w rozwój obszaru nauki dotyczący tworzenia celowanych formułacji zawierających substancje naturalne stymulujące wzrost bakterii probiotycznych i mające pośrednio, a także bezpośrednio wpływać na modulację stanów przed- i chorobowych zależnych od homeostazy mikrobioty jelitowej.

Należy także zwrócić uwagę na bardzo bogaty warsztat badawczy doktoranta, a także warsztat z którym mgr Szymon Sip musiał się zaznajomić w ramach szerokiej współpracy badawczej wykorzystanej w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej. Oprócz standardowych technik i metod analitycznych wykorzystywanych w analizie fitochemicznej i ocenie aktywności biologicznej *in vitro*, takich jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) z detekcją UV-VIS i spektrofotometria UV-VIS, w pracy doktorskiej zostały wykorzystane także proszkowa dyfrakcja promieni rentgenowskich (PXRD) oraz spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR). Należy także wymienić wykorzystanie techniki ekstrakcji nadkrytycznej. Dodatkowo, wykonano eksperymenty uwalniania do roztworów symulujących kolejne odcinki przewodu pokarmowego, w tym warunków symulujących stan jelita na czczo i po posiłku, oraz eksperymenty przenikania przez sztuczne membrany biologiczne (PAMPA – ang. Parallel artificial membrane permeability assay). Testy mikrobiologiczne przeprowadzono *in vitro* oraz *in vivo*. *In vivo* oceniono także wpływ ekstraktu na poziom glukozy we krwi szczurów. Taka różnorodność wykonanych eksperymentów niewątpliwie wymagała umiejętności interpretacji wyników.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów mgr Szymon Sip wykazał że:

- odmiana derenia jadalnego *Wydubieckij* jest najbardziej cenna pod względem zawartości polifenoli oraz zdolności do hamowania glukozydazy
- ekstrakt z owoców derenia jadalnego z inuliną wpłynął pozytywnie na skład mikrobioty jelitowej *in vivo*: w kale szczurów zaobserwowano wzrost liczby bakterii probiotycznych z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*; dodatek inuliny nie wpłynął negatywnie za zachowanie pierwotnych właściwości ekstraktu roślinnego
- odmiana jagody kamczackiej *Jugana* zawiera najwięcej ciał czynnych oraz posiada największą aktywność przeciwzapalną i przeciwutleniającą
- układy zawierające ekstrakt z jagody kamczackiej oraz dekstran o różnych długościach łańcucha promują wzrost probiotycznych szczepów bakterii *in vitro*, ale wpływ ten jest indywidualny dla różnych bakterii
- wytworzone układy zawierające hesperydynę oraz fisetynę w znaczący sposób zwiększają rozpuszczalność i uwalnianie, a więc biodostępność, tych flawonoidów
- układy zawierające hesperydynę stymulują wzrost bakterii probiotycznych *in vitro*, zaś te z fisetyną hamują rozwój patogenów *in vitro*
- amorficzny układ fisetyny wykazywał zwiększoną rozpuszczalność i przenikalność przez modele błon komórkowych oraz zwiększoną aktywność antyoksydacyjną i biologiczną.

W mojej ocenie wartość prac będących podstawą na nadania stopnia doktora jest niewątpliwie bardzo duża. Prace są obszerne, zawierają znaczną ilość wyników, których omówienie i dyskusja zostały przeprowadzone w sposób bardzo skrupulatny. Dobór słownictwa, a także swoboda językowa sugerują doświadczenie w pisaniu prac badawczych i obeznanie z tematyką.

Z obowiązku recenzenta chcę jednak zwrócić uwagę za kilka kwestii i poddać pod zastanowienie następujące uwagi/zapytania:

- termin „surowiec roślinny” jest nieaktualny od momentu wejścia w życie Farmakopei Polskiej VII, stanowiącej polskie tłumaczenie piątego wydania Farmakopei Europejskiej; tłumaczenie z jęz. angielskiego „herbal substance” odpowiada polskiemu terminowi „substancja roślinna”
- w jaki sposób doktorant dokonał standaryzacji ekstraktu z owoców derenia jadalnego, mając na uwadze, iż proces standaryzacji ekstraktu roślinnego polega na określeniu zawartości występujących w nim najistotniejszych związków mających efekt fizjologiczny i ujednoczeniu ich zawartości w każdej porcji surowca bądź produktu
- dlaczego w publikacji 2 formułę zawierającą ekstrakt z derenia i inulinę sporządzono na bazie ekstraktu przygotowanego z użyciem 70 % etanolu, a wszystkie poprzednie oznaczenia wykonano dla ekstraktu wodnego?
- w przypadku przygotowanych układów dostarczania ważne jest aby podać jaka jest zawartość substancji aktywnych w układzie, np. w %, celem porównania aktywności w postaci wolnej i w układzie; takiej informacji recenzent nie odnalazł w autoreferacie, ani w publikacjach
- w publikacji 2, sekcja 2.8 zatytułowana jest „Phenolic acids content”, jednakże wśród oznaczanych związków jest także kwas loganowy i rutyna, które nie należą do kwasów fenolowych, wobec tego bardziej stosowne byłoby określenie „Phenolic compounds content”
- w badaniach oceniających wpływ formuły zawierających ekstrakt z dodatkiem dekstranu na żywotność bakterii zabrakło oceny wpływu samego ekstraktu

Podsumowując doświadczenia oraz wyniki zawarte w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej należy podkreślić, że mgr Szymon Sip w pełni zrealizował założony cel badawczy. Najbardziej obiecujące pod względem zwiększenia rozpuszczalności, uwalniania substancji aktywnych, i przenikania przez sztuczne membrany okazały się układy amorficzne przygotowane dla fisetyny z wykorzystaniem dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym. Zdecydowanie warto rozwijać ten kierunek badań, gdyż może on mieć praktyczne zastosowanie. Co więcej, doktorant nakreślił perspektywy dalszych działań, i wskazał na potrzebę zastosowania bardziej zaawansowanych modeli sztucznego trawienia oraz modeli *in vivo*, zwłaszcza dedykowanych zmianom wywołanym przez wybrane jednostki chorobowe.

Konkluzja

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Szymona Sipa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742), w związku z czym zwracam się do Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z wnioskiem o nadanie mgr farm. Szymonowi Sip stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Ponieważ rozprawa doktorska mgr farm. Szymona Sipa jest wartościowa zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia wnoszę do Komisji powołanej do przeprowadzenia postępowania w sprawie nadania stopnia doktora Panu mgr farm. Szymonowi Sip o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Wniosek swój motywuję wysokim poziomem naukowym rozprawy, uwzględniającym nie tylko aspekty nowości i oryginalności naukowej w tym przygotowania po raz pierwszy układów uwalniania oraz ocenie ich aktywności biologicznej, ale także wysokimi wskaźnikami naukowymi cyklu publikacji, wynoszącymi IF = 31,5 i 580 punktów MNiSW, oraz spełnionym kryterium, iż przynajmniej jedna z opublikowanych prac ma 140 punktów MNiSW (są to dwie prace).

Sieniawska Elwira

Elwira Sieniawska