



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY

Dr hab. inż. Hanna Staroszczyk
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności

Gdańsk, 1 lipca 2024 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr. inż. ANNY WIECZYŃSKIEJ

pt. *Opracowanie racjonalnych metod wytwarzania produktów leczniczych,
skutecznych w leczeniu choroby jamy ustnej halitozy*

wykonanej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem
prof. dr hab. inż. Romana Gancarza.

Ocena wyboru tematu

Halitoza jest powszechnym problemem zdrowotnym o złożonych przyczynach. Pomimo ogromnego postępu wiedzy i wnikliwych badań dotyczących patogenezы tej choroby, mechanizmy powstawania nieświeżego oddechu pozostają nadal nie w pełni poznane i stosowane dotąd efekty terapeutyczne nie są zadowalające. Efektywne projektowanie leków – opracowanie markerów chorobotwórczych w przebiegu choroby, a następnie parametrów procesowych wytwarzania skutecznego w jej leczeniu produktu, tj. dobór aktywnego składnika, określenie jego właściwości fizykochemicznych i biologicznych oraz sprawdzenie aktywności *in vivo* na modelu zwierzęcym, a następnie na modelu ludzkim końcowego produktu – jest jednak trudne. Dodatkowo, wykorzystanie w charakterze nośnika substancji aktywnej związków pochodzących z surowców roślinnych i zielarskich nie zawsze oznacza bezpieczeństwo użytkowania takiego produktu. Dlatego podjęcie się przez Panią Annę Wieczyńską tego złożonego problemu i opracowanie metod wytwarzania produktów leczniczych skutecznych w leczeniu halitozy uważam za cenne i uzasadnione. Wykorzystując wiedzę z kilku dyscyplin, w tym z chemii organicznej, fizykochemii, biologii, farmakologii oraz inżynierii chemicznej, Doktorantka zrealizowała solidny, przemyślany projekt badawczy nad opracowaniem metody wytwarzania produktów leczniczych - *fine chemicals* - skutecznych w leczeniu halitozy. Badania zostały wykonane w ramach programów finansowanych ze środków Unii Europejskiej w ramach

Europejskiego Funduszu Społecznego oraz ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii.

Ocena formalna pracy

Praca ma typowy dla rozpraw doktorskich układ, składa się z siedmiu rozdziałów: *Wstęp teoretyczny, Cel rozprawy doktorskiej, Badania własne, Wyniki i ich omówienie, Podsumowanie, Literatura oraz Osiągnięcia naukowe*. Ponadto zawiera *Spis treści, Wykaz skrótów, Spis tabel i rysunków, Wprowadzenie oraz Streszczenie* w j. polskim i angielskim. Praca liczy 217 stron tekstu, w której jest 49 tabel i 63 ryciny. Proporcje poszczególnych części pracy są dobrze wyważone, wszystkie są ściśle powiązane z tematem pracy i łączą się w spójną całość. Część teoretyczna obejmuje 32 strony, cel pracy – 4 strony, a w części doświadczalnej – opis badań własnych, omówienie i dyskusja wyników i podsumowanie – 144 strony. Piśmiennictwo, 195 pozycji literaturowych, w większości anglojęzycznych opublikowanych do 2024 r. włącznie i 14 źródeł internetowych, zestawiono na 14 stronach. Praca została napisana dobrym językiem naukowym, tzn. zrozumiałym, jednoznacznym i logicznym. Nieliczne niedociągnięcia, literówki czy inne usterki językowe lub interpunkcyjne, zaznaczyłam w recenzowanym egzemplarzu pracy.

Ocena merytoryczna pracy

Tytuł pracy odpowiada jej treści. We *Wprowadzeniu* Doktorantka w zwięzły sposób przedstawiła podjęty problem badawczy, który następnie szerzej opisała w pierwszej, teoretycznej części pracy. Scharakteryzowała w niej leki roślinne, skupiając się na wymaganiach jakim powinny one sprostać, sposobach izolacji i oczyszczania ich komponentów, postaciach w jakich mogą występować oraz substancjach czynnych zawartych w surowcach roślinnych i metodach ich pozyskiwania. Ta część pracy, a także kolejny rozdział, opisujący zagadnienia związane z chorobą jamy ustnej halitozy, jej uwarunkowaniach oraz metodach diagnozowania i leczenia, służyła do sformułowania celów i zadań badawczych. Nadrzędnym celem pracy było opracowanie metod wytwarzania i charakterystyka potencjalnych produktów leczniczych o określonej funkcjonalności. Aby zrealizować ten cel, Doktorantka szeroko zakrojone, wielowątkowe zadania badawcze podzieliła na cztery główne i jeden dodatkowy etap, wyszczególniając szczegółowe cele dla każdego z nich. Etap I dotyczył metod wytwarzania produktów leczniczych z surowców roślinnych oraz syntetycznych analogów, etap II i III obejmował, charakterystykę chemiczną i ocenę biologiczną uzyskanych produktów, a etap IV – preformulację produktu leczniczego i ocenę

jego skuteczności. Duże znaczenie ma również opracowanie modelu choroby, nad którym Doktorantka skupiła się w etapie dodatkowym.

Ta część rozprawy jest interesująca i dobrze wprowadza do dalszych jej rozdziałów. Na uznanie zasługuje ogólny schemat ilustrujący koncepcję badań (str. 52 rys. 5) oraz schematy przedstawiające kroki postępowania w poszczególnych etapach realizowanych zadań badawczych (str. 57 rys. 6, str. 67 rys. 12, str. 84 rys. 16). Z punktu widzenia czytelnika były one bardzo pomocne. W *Streszczeniu* Autorka w bardzo ogólny sposób przedstawiła zakres swojej pracy. Szkoda, że nie znalazły się w nim interesujące dane ilościowe, które przyciągnęłyby zainteresowanie czytelnika. Korzystne byłoby również, aby w *Wykazie skrótów* znalazły się wszystkie stosowane w pracy akronimy, bo jest on niekompletny, co z perspektywy czytelnika nastarcza pewne problemy. Czym różni się *ekstrakcja cieczy pod wysokim ciśnieniem*, dla której przypisano skrót *PLE*, od *ekstrakcji rozpuszczalnikiem pod ciśnieniem* oznaczonej jako *PSE* (odpowiednio, str. 31₁₂ i str. 32₂)? Zamiast *aktywność antymikrobiałna* (str. 53¹³) lepiej napisać *aktywność przeciwdrobnoustrojowa*, a zamiast *niska objętość* (str. 19, Tab.1) użyć *mała objętość*.

Kolejną część rozprawy, zatytułowaną *Badania własne*, Doktorantka rozpoczęła od przedstawienia wykazu materiałów, odczynników i aparatury badawczej, opisanie metodyki i warunków przeprowadzonych doświadczeń (wraz z zastosowanymi technikami pomiarowymi) oraz scharakteryzowania pod względem chemicznym i biologicznym uzyskanych produktów. Z uwagi na wieloaspektowy charakter pracy, starannie i trafnie dobrane techniki wymagały współpracy z naukowcami z wielu obszarów badawczych. Dzięki umiejętnej i skutecznej współpracy z naukowcami z: Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Centrum Badań Jakości przy KGHM w Lubinie, Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej, Wydziałach Przyrodniczo-Technologicznym, Biotechnologii i Nauk o Żywności, i Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej PAN we Wrocławiu, a także z firmami farmaceutycznymi: Przedsiębiorstwem Produkcji Farmaceutycznej Hasco-Lek S.A., Farmaceutyczną Spółdzielnią Pracy Gelana we Wrocławiu, K-link Poland i ActusPharma w Poznaniu, wytyczony cel został osiągnięty.

Uwagi związane z tym fragmentem pracy dotyczą nieujęcia w *Wykazie aparatury badawczej* wszystkich wykorzystanych w badaniach urządzeń, z podaniem ich typu i producenta. Te informacje są niepotrzebnie powielana na kolejnych stronach pracy (np. str. 58_{5,6}, str. 60_{5,6}, str.

63₇, str. 64_{1,13}, str. 71¹⁵, str. 72₁₃, str. 83₉, str. 90₂₋₄). Skąd pochodziły szczepy bakterii i grzybów nie podano. Aby uniknąć zbędnych powtórzeń sugerowałabym także połączenie rozdziału 1.1 (str. 55) z tabelą 7 w rozdziale 2.2.2 (str. 70), a wyszczególnione w punktach wieloczynnikowe kryteria technologii otrzymywania fitofarmaceutyków opisane w rozdziale 2.2.1 (str. 68-69) z podobnym opisem znajdującym się w rozdziale 2.2.4 (str. 70). Na rys. 16 (str. 84) przedstawiono etap IV badań, a nie jak błędnie podano etap III.

Treść kolejnego rozdziału pracy, *Wyniki i ich omówienie*, udowadnia, że Doktorantka biegle posługuje się nowoczesnymi, wielorakimi metodami, technikami i narzędziami badawczymi. Przedstawiane krok po kroku szczegółowe wyniki eksperymentów zostały dogłębnie przeanalizowane i rzeczowo przedyskutowane. Na szczególną uwagę zasługuje logiczne uzasadnienie celowości podjęcia kolejnych etapów badań. Na przykład, w celu opracowania modelu jednostki chorobowej (halitozy), Doktorantka przekonująco objaśnia dobór modelowych szczepów bakterii i selekcję izolatów uzyskanych z materiału klinicznego pobranego od pacjentów do monitorowania procesu wydzielania przez nie lotnych związków siarki (LZS), następnie uzasadniania dobór metod analizy tych związków, by w kolejnym kroku dobrać parametry procesowe, w tym rodzaj prekursora i jego stężenie oraz czas prowadzenia hodowli bakterii, dla wydajnej produkcji przez nie LZS. Sposób prezentacji kolejnych wyników badań jest podobny, co pracę o charakterze interdyscyplinarnym, a taką praca Pani Anny Wieczyńskiej jest, czyni przejrzystą i zrozumiałą. Skrupulatne opisy pozwalają śledzić tok rozumowania Autorki, jednak powtórzenia niektórych informacji niepotrzebnie zwiększają objętość pracy. Na przykład, rozdziały 2.1.1 (str. 105) i 2.2.2 (str. 69), rozdziały 2.1.2 (str. 107) i 2.2.3 (str. 70) noszą ten sam tytuł i zawierają te same informacje, a tabele 20 (str. 118-120), 8 (str. 74) i 33 (str. 151-153) można by połączyć, bo zawarte w nich dane częściowo powtarzają się. Bardzo cenna jest analiza chromatograficzna, jaką Doktorantka przeprowadziła dla olejków eterycznych (str. 124-150). Dla każdego z nich podała skład chemiczny i wzory strukturalne głównych składników, niepotrzebnie jednak przytaczając przy niektórych z nich te same wzory. Na rysunkach 27 (str. 108) i 32 (str. 114) zabrakło podpisu osi rzędnych. Co oznacza skrót *L.*, *F.*, *Z.* w nazwie ostatniej kolumny tab. 18 (str. 106)?

Doktorantka zrealizowała postawiony cel pracy. Uzyskane rezultaty badań są wartościowe zarówno pod względem naukowym, jak i praktycznym. Za interesujące naukowo uważam:

- poznanie mechanizmów wydzielania LZS i testowania potencjalnych leków roślinnych – istotne dla opracowania modelu jednostki chorobowej (halitozy),
- ustalenie operacji i procesów jednostkowych, w tym dobór surowca, fizycznych i chemicznych parametrów procesów, rodzaju ekstrahenta, technik oczyszczania oraz charakterystykę chemiczną i biologiczną uzyskanych produktów – ważne dla opracowania technologii otrzymywania leków roślinnych,
- ocenę cytotoksyczności, genotoksyczności i właściwości przeciwbakteryjnych ekstraktów roślinnych – konieczne dla zapewnienia bezpieczeństwa stosowania leku roślinnego,
- wykazanie na modelu zwierzęcym skuteczności ostatecznego produktu w inhibicji LZS i jego pozytywnego wpływu na zdrowie jamy ustnej – warunkujące badania na modelu ludzkim.

Ważne z praktycznego punktu widzenia było natomiast uwzględnienie w końcowej ocenie procesu technologicznego aspektów środowiskowych i ekonomicznych, w tym ilości poszczególnych procesów, czasu, ilości zużywanej energii i rozpuszczalników, ilości odpadów poreakcyjnych, a także wydajności i kosztochłonności procesu.

Rozprawę doktorską kończy rozdział *Podsumowanie*, w którym znalazły się najważniejsze rezultaty prac badawczych. Wynikają one z przeprowadzonych badań, są logicznie ze sobą powiązane i potwierdzają, że cel pracy został osiągnięty.

Pytania i uwagi

Ogólny poziom rozprawy oceniam bardzo wysoko. Wskazuje on na dojrzałość naukową oraz kompletność warsztatu badawczego Doktorantki. Krytyczny czytelnik może jednak znaleźć w niej kilka wad, w większości drobnych, jak na przykład użycie jednostek stężenia i objętości spoza układu SI (np., str. 40₉₋₁₁, str. 80^{1,2}, str. 161_{6,10}, tab. 39 str. 162, str. 166_{1,2,4}, tab. 44 str. 174), nieprawidłowe nazewnictwo chemiczne i specjalistyczne - *małocząsteczkowe związki* zamiast *niskocząsteczkowe związki* (str. 27₁₆), *sacharydy/polisacharydy* zamiast *cukry/wielocukry* (str. 27₅, str. 30¹⁰₉, str. 44¹², tab. 22 str. 123), *ditlenek cynku* i *ditlenek tytanu* zamiast *dwutlenek cynku* i *dwutlenek tytanu* (odpowiednio, str. 42₂ i str. 48. Tab. 5), *sacharynian sodu/sól sodowa sacharyny* zamiast *sacharyna sodowa* (str. 46-50, Tab. 5). Szkoda, że w przypadku analizy niektórych wyników nie zastosowano testu t-Studenta lub jednoczynnikowej analizy wariancyjnej, gdyż tylko

w takim przypadku można wykazać, czy występujące różnice są istotne statystycznie (np., rys. 32 str. 114, rys. 21 str. 121, rys. 52-55 str. 178-179, rys. 57 str. 183). Dlaczego oznaczenia MIC, MBC i MFC przeprowadzono wg. rekomendacji CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), a nie EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)? Dlaczego w tab. 38 str. 160 wartości te wyrażono w mg/mL, a w tab. 44 str. 174 w µg/mL? Jak wyznaczono wartość IC₅₀ podaną w tab. 21 (str. 121)? Dlaczego jako trzeci składnik substancji czynnej w produktach żelowych PŻ1-PŻ5 oprócz BP_TM3 i BP_GM3 dodano bioprodukt BP_OM3, skoro po analizie chemicznej określającej zawartość związków fenolowych, flawonoidów i aktywność przeciwutleniającą (tab. 21 str. 121), nie został się on wybrany do dalszych badań biologicznych (tab. 37 str. 159 i tab. 38 str. 160 zawiera jednak wyniki tych badań) jako najbardziej obiecujący bioprodukt? Na str. 185 Autorka napisała, że aby zapewnić efektywność terapeutyczną otrzymanego produktu, w kolejnych etapach, ocenę fizykochemiczną należałoby rozszerzyć o badania lepkości produktu, rozciągliwości hydrożelu oraz kinetyki uwalniania substancji aktywnych. W *Podsumowaniu* zaś znalazły się słowa o tym, że przeprowadzone analizy dają podstawę do dalszych etapów badań, zwłaszcza na modelu ludzkim. Czy zamierza Pani kontynuować te badania? Choć *Podsumowanie* pracy w zwięzły sposób porządkuje całość przeprowadzonych prac badawczych to nie zawiera wniosków. Prosiłabym zatem o przedstawienie kilku, najważniejszych z nich w trakcie publicznej obrony.

Dorobek naukowy

W odrębnym rozdziale, stanowiącym uzupełnienie przedłożonej do recenzji pracy, Doktorantka zestawiała swoje dotychczasowe osiągnięcia naukowe, organizacyjne i popularyzujące naukę. Mgr inż. Anna Wieczyńska jest współautorką 4 artykułów naukowych o sumarycznej liczbie punktów 365 zgodnie z punktacją MNiSW, wszystkie opublikowane w czasopiśmie z bazy *Journal Citation Reports* o sumarycznym współczynniku wpływu IF = 12.585 oraz współautorką 6 referatów i 16 komunikatów konferencyjnych. Uczestniczyła też w 7 projektach naukowych, w charakterze kierownika, głównego wykonawcy lub wykonawcy i odbyła 4 staże naukowe w zagranicznych i krajowych jednostkach naukowych. Pani Anna Wieczyńska jest członkiem Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, a także członkiem Komisji ds. Młodej Kadry Technicznej tego Stowarzyszenia. Brała czynny udział w wydarzeniach popularyzujących naukę w ramach Dolnośląskiego Festiwalu Nauki – Wrocław oraz Region

(Jelenia Góra, Ząbkowice Śląskie, Wałbrzych) i Nocy Biologów Wrocław 2020 oraz w ramach zajęć dla dzieci przedszkolnych oraz młodzieży gimnazjalnej i ponadgimnazjalnej.

Wniosek końcowy

Podsumowując z satysfakcją stwierdzam, że mgr inż. Anna Wieczyńska, realizując cele badawcze rozprawy, wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, poprawnej interpretacji wyników i znajdowania między nimi związków przyczynowo-skutkowych. Wyniki te doprowadziły do opracowania technologii wytwarzania leków roślinnych jako nowych *fine chemicals*, otwierając nowe perspektywy w leczeniu halitozy i stanowią oryginalny, istotny wkład Doktorantki w rozwój inżynierii chemicznej. Tym samym Pani mgr inż. Anna Wieczyńska spełniła warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz.1789 z późn. zm.) oraz o przepisach zmieniających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dn. 3 lipca 2018 roku (Dz.U. z 2018, poz. 1669). Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Chemiczna Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani Anny Wieczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

