

Toruń, 20.06.2024 r.

dr hab. Magdalena Ligor, prof. UMK
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky
Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Wieczyńskiej,
pt. „Opracowanie racjonalnych metod wytwarzania produktów leczniczych,
skutecznych w leczeniu choroby jamy ustnej halitozy”
wykonanej pod kierunkiem
prof. zw. dr. hab. inż. Romana Gancarza
Katedra Inżynierii i Technologii Procesów Chemicznych,
Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska**

Rozprawa doktorska magister inżynier Anny Wieczyńskiej poświęcona jest technologii wytwarzania bioproduktów - wyrobów zawierających substancje aktywne, wyodrębnione z wyselekcjonowanych surowców roślinnych. Będące w sferze zainteresowania Autorki fitofarmaceutyki i analogii produktów naturalnych pochodzenia naturalnego, mogą mieć potencjalne zastosowanie w hamowaniu procesu powstawania lotnych związków siarki (VSCs), przy jednoczesnym braku negatywnego wpływu na funkcje naturalnej mikroflory bakteryjnej jamy ustnej człowieka. Założeniem badawczym, było więc opracowanie produktów leczniczych mających potencjalne zastosowanie w leczeniu halitozy. Jednym z etapów przeprowadzonych prac badawczych było opracowanie metody otrzymywania potencjalnych inhibitorów enzymów γ -liazy metioniny i desulfhydratazy-D-cysteiny. Do badania opracowanych produktów Doktorantka zastosowała metody spektroskopowe i chromatograficzne. Zachowując kryterium bezpieczeństwa biologicznego, przeprowadzono również ocenę mikrobiologiczną oraz wykonano badania geno- i cytotoxycyzności produktów leczniczych. W sumie badaniom poddano 12 wyselekcjonowanych surowców roślinnych i 21 związków syntetycznych. Opracowana została pre-formulacja potencjalnego produktu leczniczego w postaci żelu, którego aktywność biologiczną sprawdzono *in vivo* na modelu zwierzęcym (przeprowadzono badania na psach).

Opracowany produkt może mieć potencjalne zastosowanie w leczeniu halitozy, ze względu na skład produktu, w którym uwzględniono zarówno inhibitory enzymów odpowiedzialnych za wydzielanie VSCs, jak i bezpieczne fitofarmaceutyki. W tym miejscu należy zaznaczyć, że Autorka pracy przedstawiła opracowane metodyki (wyniki oraz komentarze), w sposób staranny i przejrzysty. Opracowanie wyników poparte jest stosownymi wnioskami i szczegółowymi komentarzami. Recenzowana rozprawa doktorska ma istotne znaczenie w kontekście opracowania skutecznych metodyk wyodrębniania i oznaczania związków biologicznie aktywnych z materiału roślinnego.

Licząca 217 stron praca doktorska posiada układ klasyczny dla tego typu opracowań. Składa się z siedmiu rozdziałów głównych: wstęp teoretyczny (rozdziały od 1 do 3), cele pracy, część eksperymentalna – badania własne, gdzie uwzględniono materiały i metody badawcze, charakterystykę chemiczną i badania biologiczne uzyskanych produktów oraz zaproponowano skład potencjalnego bioproduktu. W kolejnych rozdziałach Autorka rozprawy przedstawiła wyniki i ich omówienie, podsumowanie oraz własne osiągnięcia naukowe. Rozprawa zawiera również wykaz literatury (209 pozycji), przedstawiono 49 tabel, 64 rysunki i wykaz skrótów. Godnym uznania jest bardzo staranne przygotowanie graficznych form prezentacji. Rozprawa jest także starannie przygotowana pod względem redakcyjnym i napisana poprawnie językowo. Jednak pewne zastrzeżenia budzi brak odstępów, gdy pojawiają się jednostki np. masy, objętości, stężenia oraz ułamki dziesiętne pisane z kropką. W całej pracy pojawiają się również inne drobne błędy edytorskie.

Część teoretyczna jest zwięzłym wprowadzeniem do tematyki badawczej. W tej części pracy mgr inż. A. Wieczyńska scharakteryzowała ogólnie substancje chemiczne określane jako *fine chemicals*, które znalazły zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu - do produkcji wysokowartościowych produktów specjalistycznych. Autorka odniosła się także do rynku leków pochodzenia roślinnego, bioproduktów, z uwzględnieniem nutraceutyków i fitofarmaceutyków. Szczegółowo omówiła cechy użytkowe produktów roślinnych w odniesieniu do norm i regulacji, jakim podlegają poszczególne etapy ich produkcji, uwzględniła również nowe trendy w otrzymywaniu ekstraktów roślinnych. W osobnym rozdziale podjęty został temat fototerapii. Autorka pracy scharakteryzowała postacie dostępnych na rynku leków roślinnych, omówiła najważniejsze grupy substancji czynnych występujących w biomacie roślinnej tj. glikozydy, flawonoidy, alkaloidy, kumaryny, olejki eteryczne, garbniki i śluzy. Istotny ze względu na tematy poruszane w rozprawie, jest rozdział poświęcony metodom wyodrębniania substancji czynnych z surowców roślinnych (metody

ekstrakcyjne). W rozdziale trzecim Doktorantka szczegółowo omówiła halitozę, uwzględniła więc epidemiologię, klasyfikację i przyczyny choroby, ustaliła jakie patogeny mogą mieć związek z halitozą, określiła metody diagnozowania i leczenia tej choroby. Ważnym jest także rozdział poświęcony dostępnym na rynku produktom leczniczym i tym które są stosowane w profilaktyce halitozy. Zaprezentowała w formie tabelarycznej, zestawienie preparatów stosowanych w leczeniu chorób jamy ustnej.

Celem ogólnym pracy, jak podkreśla to Doktorantka, było opracowanie metod wytwarzania i charakterystyka potencjalnych produktów leczniczych o określonej funkcjonalności. Doktorantka wzięła pod uwagę dobór surowca roślinnego stanowiącego biomasę roślinną, wybór metody wyodrębniania składników aktywnych, rodzaj eluentu, dobór parametrów operacyjnych, opracowanie metody wytwarzania produktu, po uwzględnieniu mechanizmu działania enzymów w przebiegu halitozy. Zaplanowane badania podzielono na pięć etapów: opracowanie metody wytwarzania produktów leczniczych z surowców roślinnych oraz syntetycznych analogów, charakterystyka chemiczna uzyskanych produktów, ocena biologiczna, preformulacja produktu leczniczego oraz ocena jego skuteczności oraz opracowanie modelu wydzielania przez bakterie lotnych związków siarki jako biomarkerów halitozy i wybór szczepów bakterii do dalszych badań (materiał pozyskany od pacjentów).

W części doświadczalnej pracy, liczącej aż 149 stron (w tym omówienie wyników - ponad 100 stron), przedstawiono informacje dotyczące zastosowanych metod badawczych. Autorka przedstawia opracowanie dotyczące modelu halitozy, uwzględniając kryteria doboru szczepów bakterii, warunków hodowli, metod kontroli i analizy związków zawierających w swojej strukturze siarkę (wykorzystanie chromatografii gazowej z detekcją FPD, czujników, metoda biułowa). Kolejnym etapem badań było otrzymywanie potencjalnego produktu leczniczego. Doktorantka uwzględniła tu różne kryteria doboru surowca roślinnego. Wśród wybranych surowców znalazły się m. in. anyż, cynamonowiec, dzika róża, galgant, goździk, nagietek, mięta, oregano, pietruszka, rozmaryn, szałwia i tymianek. Były to w zależności od surowca, kwiaty, owoce, liście, ziele, kłącza, kora. W celu wyodrębnienia substancji czynnych z badanych surowców, zastosowano kilka standardowych metod ekstrakcji (pod chłodnicą zwrotną, UAE, aparat Soxhleta, maceracja). W celu pozyskania olejków eterycznych zastosowano destylację z parą wodną w aparacie Derynga. Odrębnym zagadnieniem była synteza inhibitorów enzymów bakteryjnych. Zastosowano metody bioinformatyczne w celu wymodelowania miejsca aktywnego enzymów oraz miejsca

zadokowania w nich odpowiedniego substratu i jego pochodnych. Wyselekcjonowano 21 związków jako potencjalne inhibitory, które otrzymano eksperymentalnie na drodze syntezy chemicznej. Kolejnym etapem badań była ocena właściwości otrzymanych ekstraktów. W tym zakresie z wykorzystaniem metod kolorymetrycznych wykonano analizy na zawartość polifenoli, flawonoidów i aktywność przeciwutleniającą. Wykonano również badania strukturalne badanych próbek. Ponadto za pomocą GC-MS wykonano również analizy olejków eterycznych. Przeprowadzono szczegółowe badania mikrobiologiczne (MIC, MBC, MFC, ocena właściwości mutagennych, cytotoksyczności). Kluczowa część pracy badawczej dotyczyła opracowania pre-formulacji bioproduktu w formie żelu i badania jego trwałości. Przeprowadzone badania *in vivo* na modelu zwierzęcym pozwoliły na właściwą ocenę skuteczności opracowanego preparatu. W tym zakresie Doktorantka współpracowała ze specjalistami z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W omówieniu wyników z dużą starannością przeanalizowano i zweryfikowano uzyskane rezultaty badań. Zwraca uwagę wieloaspektowość i różnorodność tematyki badawczej, dlatego zrozumiała jest współpraca w wieloma zespołami naukowymi. Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki uważam: opracowanie modelu halitozy, opracowanie metody otrzymywania potencjalnego produktu leczniczego, dokonanie oceny charakteru chemicznego uzyskanych produktów, zbadanie aktywności biologicznej pozyskanych ekstraktów roślinnych i olejków eterycznych oraz związków syntetycznych; opracowanie formulacji produktu leczniczego i ocena skuteczności działania i bezpieczeństwa testowanych substancji wchodzących w skład produktu (badania *in vivo*).

Mgr inż. Anna Wieczyńska jest współautorką 4 publikacji, które dotyczą zagadnień związanych z przedmiotem rozprawy doktorskiej. Sumaryczna wartość współczynnika **IF wynosi 12,585**, a suma punktów ministerialnych wynosi 365, co w przypadku osób ubiegających się o stopień naukowy doktora jest wynikiem bardzo dobrym. Należy dodać, że cztery manuskrypty są nadal w przygotowaniu.

Podjęta przez Doktorantkę problematyka, wpisuje się w aktualne tematy badawcze związane poszukiwaniem surowców roślinnych, bogatych w fitoskładniki i charakteryzujących się wysoką aktywnością biologiczną. Oceniając pracę doktorską należy również podkreślić, że wymagała ona wykonywania licznych eksperymentów, zastosowania wielu procedur i technik analitycznych. Doktorantka przeprowadziła wiele czasochłonnych i żmudnych doświadczeń, brała również udział w badaniach *in vivo* na modelu zwierzęcym. Na uwagę zasługuje fakt, że były to badania interdyscyplinarne. Doktorantka wykazała się

szczególnymi umiejętnościami planowania i wykonywania eksperymentów oraz interpretacji wyników.

Biorąc pod uwagę powyższe, dokonując oceny rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pewne uwagi oraz spostrzeżenia do rozważania i dyskusji:

- str. 62, 73 – co oznacza określenie „substancje smrodliwe”?
- str. 64 – sformułowanie „pobór atmosfery gazowej”, należałoby zastąpić „pobieranie próbki gazów do analizy”;
- str. 64 – w pracy kilkakrotnie pojawia się nieprawidłowy skrót GC-FDP, powinno być GC-FPD;
- str. 71 – ekstrakcja była prowadzona na drodze maceracji z wykorzystaniem mieszadła a nie wytrząsarki? W tytule jest wytrząsanie.
- str. 72 – co Autorka pracy rozumie pod sformułowaniem olejki eteryczne to substancje skoncentrowane?
- str. 76 – z użyciem jakiej aparatury wykonano oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli, flawonoidów i aktywności przeciwutleniającej?
- str. 76 – w jaki sposób wykonano oznaczenia ilościowe białek?
- str. 108 i dalsze – właściwy podpis powinien być zamieszczony przy osi wartości dla danego parametru.
- str. 124 i dalsze – brakuje przykładowych chromatogramów. W jaki sposób wykonano obliczenia KI exp.¹?
- str. 193 – podano błędną informację o tabeli z wynikami krwi, powinno być Tab. 48 i 49.
- str. 198 (Podsumowanie) – niefortunne są następujące sformułowania: „spełnienie celów badawczych” i „umożliwiło pomiar realizacji głównego celu użytkowego”; ponownie podano błędną nazwę GC-FDP (powinno być GC-FPD).
- Pytanie do dyskusji: jakie grupy związków mają potencjalny wpływ na zahamowanie zmian chorobowych (w tym halitozy) w jamie ustnej człowieka i z czego to wynika?
- w rozdziale VI (Literatura) – niestety Autorka nie ustrzegła się błędów, niejednokrotnie brakuje rocznika, numerów stron itp., zmienny jest również sposób prezentowania materiału źródłowego.

Podsumowując chciałabym podkreślić, że praca doktorska p. mgr inż. Anny Wieczyńskiej zawiera elementy nowości naukowej. Doktorantka osiągnęła cele pod względem metodycznym. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Anny Wieczyńskiej pt. „Opracowanie racjonalnych metod wytwarzania produktów leczniczych, skutecznych w leczeniu choroby jamy ustnej halitozy”, spełnia warunki stawiane pracom doktorskim, określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Chemiczna, Politechniki Wrocławskiej, o dopuszczenie p. mgr inż. Anny Wieczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych, w dyscyplinie inżynieria chemiczna.

Magdalena Ligor