

**RECENZJA****rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominika Popowskiego****pt. „Badania chromatograficzne (UHPLC-DAD-MS<sup>n</sup>), izolacja oraz badanie metabolizmu przez mikrobiotę jelitową składników wyciągów przygotowanych z wybranych surowców roślinnych stosowanych tradycyjnie w schorzeniach dróg moczowych”****wykonanej w Laboratorium Środowiskowym Microbiota Lab oraz  
Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego****pod kierunkiem****prof. dr hab. Sebastiana Granicy**

Infekcje i stany zapalne dróg moczowych stanowią jeden z najczęściej występujących problemów zdrowotnych współczesnych społeczeństw, w szczególności kobiet. Szacuje się, że przynajmniej 50% kobiet doświadcza przynajmniej raz w życiu tego rodzaju dolegliwości, przy czym u znacznej części z nich występują infekcje nawracające. Rekomendowane schematy leczenia angażują głównie antybiotykoterapię, jednak narastający problem antybiotykooporności patogenów dróg moczowych każe zwrócić bacniejszą uwagę na substancje pochodzenia naturalnego, których szersze stosowanie w profilaktyce i wspomagającej terapii zakażeń dróg moczowych może istotnie ograniczyć wykorzystanie antybiotyków. Dotychczasowa wiedza i praktyka fitoterapeutyczna rekomenduje kilkadziesiąt substancji roślinnych do stosowania w chorobach dróg moczowych, a monografie najważniejszych z nich zostały umieszczone w najnowszych edycjach Farmakopei Europejskiej i Polskiej. Pomimo tego, potencjał leczniczy tych substancji jest nadal nie w pełni wykorzystany i w praktyce są one głównie stosowane przez pacjentów w samoleczeniu. Przyczyny tego zjawiska są złożone, ale głównie należy ich upatrywać w ograniczonym zaufaniu klinicystów do leków pochodzenia naturalnego, wynikającym z ograniczonej ilości badań klinicznych potwierdzających ich efektywność terapeutyczną, a nie rzadko również z nie w pełni rozpoznanego składu chemicznego, w szczególności w aspekcie związków warunkujących tę aktywność, a także niewystarczająco wyjaśnionych jej mechanizmów molekularnych. Ponieważ zwykle głównymi składnikami substancji roślinnych stosowanych w chorobach układu moczowego są związki o znacznej hydrofilowości i spodziewanej niskiej biodostępności, kwestionowane bywają także dostępne dane z badań *in vitro* wyciągów roślinnych zawierających ich formy natywne. Stąd jednym z najbardziej aktualnych trendów badawczych światowej fitochemii i fitofarmakologii są badania procesów metabolicznych, jakim związki te mogą podlegać w procesie trawienia pod wpływem m.in. mikrobioty jelitowej, a także badania wpływu tych procesów na biodostępność fitozwiązków oraz systemową aktywność biologiczną wyciągów roślinnych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Dominika Popowskiego wpisuje się doskonale w te trendy. Przedmiotem badań Doktoranta były trzy substancje roślinne o uznanej pozycji w fitoterapii chorób dróg moczowych, tj. kwiat wiązówki, ziele nawłoci pospolitej i owocnia fasoli. Celem rozprawy była pogłębiąca analiza składu chemicznego ww. substancji oraz przemian strukturalnych ich składników pod wpływem mikrobioty jelitowej *ex vivo* z oceną biodostępności/przenikalności przez nabłonek jelitowy związków natiwnych i produktów biotransformacji. Tym samym tematyka rozprawy doktorskiej jest niezwykle istotna i aktualna, a cele uzasadnione i sformułowane w odpowiedzi na przesłanki wynikające zarówno z dotychczas na-

-gromadzonej wiedzy, jak i z myślą o dalszych etapach badawczych, niezbędnych do ostatecznej weryfikacji zasadności stosowania ww. substancji roślinnych w chorobach dróg moczowych.

### **Charakterystyka i ogólna ocena rozprawy**

Rozprawa ma formę zbioru trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych, opublikowanych w latach 2019-2021 w renomowanych czasopismach naukowych, tj. *Journal of Ethnopharmacology* (2 prace) i *Phytochemistry Letters* (1 praca). Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF prac tworzących zbiór wynosi 10.179, zaś punktacja MEiN 350, co wskazuje na wysoką wartość naukową rozprawy. Szczególnym osiągnięciem Doktoranta jest publikacja wyników badań w *Journal of Ethnopharmacology*, jednym z najbardziej prestiżowych pism z dziedziny fitofarmakologii, o wysoce rygorystycznym systemie selekcji i recenzji manuskryptów, co potwierdza doniosłość podjętego zagadnienia. Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich prac ze zbioru, a w przypadku pracy opublikowanej w *Phytochemistry Letters* także autorem korespondującym. Wszystkie prace są zespołowe, a Doktorant oraz czterech współautorów złożyło wymagane, kompatybilne oświadczenia wskazujące na istotny, możliwy do wyodrębnienia wkład Doktoranta w powstanie prac, który obejmował przygotowanie i analizę fitochemiczną ekstraktów roślinnych, przeprowadzenie eksperymentów inkubacyjnych z próbkami mikrobioty jelitowej, określenie wynikowych zmian strukturalnych składników ekstraktu, wykonanie analiz biodostępności składników ekstraktów i frakcji poinkubacyjnych, a także przygotowanie wstępnych wersji manuskryptów, ich finalnej edycji i odpowiedzi na recenzje.

Badania prowadzone przez Doktoranta stanowiły część większego projektu, kierowanego przez Promotora, prof. Sebastiana Granicę, pt. „Czy związki pochodzenia naturalnego wspomagają leczenie zakażeń układu moczowego?”, finansowanego w ramach programu Narodowego Centrum Nauki OPUS 15 (projekt nr 2018/29/B/NZ7/01873). Stąd też każda z prac zbioru ma nieco inny charakter i dotyczy innej substancji roślinnej. Wszystkie jednak to obszerne i przemyślane opracowania obejmujące szczegółowy opis założeń i metodyki, wyczerpującą dyskusję oraz dokumentację i wizualizację wyników, w tym części zamieszczone w suplementach. Wszystkie wnoszą także istotne elementy nowości naukowej i mają nienaganną formę edytor-ską.

Publikacja 1 (*Phytochemistry Letters* 2019, 30, 220-223) została poświęcona charakterystyce dynamiki procesu biotransformacji i analizie produktów przemian metabolicznych ekstraktu wodnego z kwiatu wiązówki, powstałych w wyniku inkubacji z mikrobiotą jelitową człowieka *ex vivo*. Jest doskonałym przykładem kreatywnego podejścia Doktoranta do pracy naukowej, który poczynił interesującą i potencjalnie aplikacyjną obserwację, że estry galoilowe glikozydów flawonoidowych są metabolizowane wyraźnie wolniej niż pozostałe składniki ekstraktu, dokonał przeskalowania eksperymentu inkubacyjnego do skali preparatywnej i otrzymał oczyszczoną frakcję trzech galoiloglikozydów, pozbawioną związków towarzyszących, co umożliwiło ich łatwą izolację i dokładne określenie struktury z wykorzystaniem m.in. analiz NMR. Jest to absolutnie nowatorskie podejście do kwestii preparatyki związków pochodzenia naturalnego, które niewątpliwie znajdzie kontynuatorów i będzie wykorzystane w badaniach metabolomicznych innych substancji roślinnych.

Druga z prac cyklu (Publikacja 2; *Journal of Ethnopharmacology* 2021, 273, 1-12) miała na celu określenie profilu metabolitów powstających w procesie fermentacji naparu z ziela nawłoci pospolitej (*Solidaginis virgaureae herba*) pod wpływem mikrobioty jelitowej człowieka oraz ocenę biodostępności związków natywnych i powstałych metabolitów w modelu nabłonka jelitowego (monowarstwy komórek Caco-2). Doktorant zidentyfikował pod względem strukturalnym (całkowicie lub częściowo) 32 z 38 związków wykrytych w naparze z ziela oraz 12 metabolitów tworzących się w procesie biotransformacji z udziałem mikrobioty jelitowej. Określił także, które ze związków natywnych i metabolitów mają największą zdolność przenikania przez nabłonek jelitowy, a wyniki opatrzył krytyczną dyskusją z danymi literaturowymi. Ponadto, praca zawiera elementy analizy aktywności przeciwzapalnej naparu, jednak tę część Doktorant wyłączył ze swojej rozprawy z uwagi na fakt, że dane eksperymentalne zostały wygenerowane przez autorów współpracujących. Dodatkowo, Doktorant porównał efekty inkubacji naparu z mikrobiotą ludzką i świńską, a poczynione obserwacje

mogą mieć znaczenie dla walidacji modelu zwierzęcego w badaniach przemian metabolicznych. Stanowiły także punkt wyjścia do badań potencjalnego znaczenia ekstraktu z ziela nawłoci w terapii infekcji dróg moczowych zwierząt hodowlanych, które są istotnym problemem weterynaryjnym. Badania te zostały opisane w bardzo interesującej pracy opublikowanej w czasopiśmie *Planta Medica* w 2022 r. („Gut microbiota of pigs metabolizes extracts of *Filipendula ulmaria* and *Orthosiphon aristatus*-herbal remedies used in urinary tract disorders”), której jednak Doktorant nie zdecydował się dołączyć do rozprawy doktorskiej, skupiając się w dysertacji na badaniach prowadzonych w kontekście chorób człowieka.

Trzecia z prac cyklu (Publikacja 3; *Journal of Ethnopharmacology* 2021, 274, 1-11) została poświęcona analizie składu chemicznego ekstraktu etanolowo-wodnego z owocni fasoli (*Phaseolus vulgaris*) oraz biodostępności jego składników w modelu nabłonka jelitowego (monowarstwy komórek Caco-2). Doktorant zidentyfikował pod względem strukturalnym (całkowicie lub częściowo) 21 spośród wykrytych w ekstrakcie 51 związków, a 19 kolejnych przyporządkował do jednej z dominujących grup składników, tj. głównie saponin i flawonoidów. Wskazał także szereg natywnych składników ekstraktu, zdolnych do przenikania przez modelowy nabłonek jelitowy. Dodatkowo, praca zawiera wyniki badań aktywności antyproliferacyjnej ekstraktu w stosunku do szczepu *E. coli* NU14 oraz działania hamującego adhezję bakterii do ludzkich komórek nabłonkowych pęcherza moczowego (T24), jednak podobnie, jak w przypadku wyników analiz aktywności przeciwdziałalnej w Publikacji 2, ta część pracy nie wchodzi w zakres dysertacji. Szkoda, że Doktorant zrezygnował w przypadku Publikacji 3 z analizy procesu biotransformacji z udziałem mikrobioty jelitowej – z pewnością wpłynęłoby to korzystnie na spójność zbioru doktorskiego.

Oprócz reprintów prac i suplementów oraz oświadczeń współautorów, dysertacja zawiera także obszernie wprowadzenie i uzasadnienie tematyki badań, krótkie komentarze do poszczególnych publikacji, główne wnioski oraz 216 pozycji piśmiennictwa, w tym jedynie trzy w języku polskim (monografie farmakopealne). We wprowadzeniu do dysertacji Doktorant przedstawił zarys historii fitoterapii zakażeń układu moczowego, główne problemy antybiotykoterapii układu moczowego, w tym kwestię antybiooporności i infekcji nawracających, zwięźle scharakteryzował podstawowe kierunki aktywności biologicznej substancji pochodzenia roślinnego stosowanych w fitoterapii chorób układu moczowego, w tym działanie diuretyczne, antyadhezyjne i typu *quorum-quenching*, a także krótko omówił problem biotransformacji fitozwiązków pod wpływem mikrobioty jelitowej oraz wpływ tych zmian na aktywność i biodostępność składników substancji roślinnych. Całość nakreśla bardzo dobrze kontekst prowadzonych badań, choć w mojej opinii praca zyskałaby na rozszerzeniu części dotyczącej biotransformacji i metabolitów jelitowych o streszczenie dotychczasowych danych na temat głównych metabolitów typowych dla związków powszechnie występujących w roślinnych substancjach leczniczych, w tym wykrytych przez Doktoranta w badanych wyciągach. Ułatwiłoby to analizę prac stanowiących cykl doktorski, tym bardziej, że to właśnie te zagadnienia stanowią wyodrębnioną tematykę rozprawy. Niemniej jednak, całość omówienia cyklu doktorskiego jest zajmująca i świadczy o szerokiej wiedzy Doktoranta w dyscyplinie i swobodzie poruszania się w obrębie omawianych zagadnień.

Z obowiązku recenzenta muszę zauważyć, że wprowadzenie do dysertacji nie ma tak nienaganej formy, jak załączone publikacje. Dodatkowo, zapewne przez przeoczenie, Doktorant nie dołączył do rozprawy reprintu suplementu do Publikacji 2. Co do formy wprowadzenia, Doktorant nie ustrzegł się niestety szeregu błędów edytorskich i stylistycznych, które jednak nie są krytyczne i nie wpływają negatywnie na odbiór strony merytorycznej tekstu. Sugerują jednak, że w przyszłości Doktorant powinien zwracać baczniejszą uwagę na korektę tekstów pisanych w języku polskim.

Niezależnie od tego, uważam, że rozprawa doktorska mgr Dominika Popowskiego stoi na wysokim poziomie naukowym i wnosi istotne elementy nowości w postaci wyników badań wpływu mikrobioty jelitowej na składniki naparów/ekstraktów z wybranych roślinnych substancji leczniczych oraz biodostępności tychże składników oraz ich metabolitów (w przypadku ziela nawłoci). Z całą pewnością dane te przyczyniają się do lepszego zrozumienia procesów zachodzących w przewodzie pokarmowym człowieka po podaniu ww.

przetworów roślinnych i identyfikacji związków odpowiadających za ich aktywność ustrojową. Ponadto, praca prowadzi do lepszego poznania podstawy fitochemicznej działania przetworów roślinnych poprzez dokładny opis/identyfikację ich składników natywnych, w tym szeregu związków wcześniej nieopisywanych w literaturze dla odpowiednich substancji roślinnych. Jak wspomniałam wyżej, bardzo istotny aspekt nowości naukowej stanowi obserwacja spowolnionej metabolizacji galoilopochodnych flawonoidowych przez mikrobiotę jelitową oraz opracowanie wykorzystującej to zjawisko metodyki preparatywnej izolacji takich związków z kwiatów wiązówki.

Badania stanowiące podstawę rozprawy zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane z wykorzystaniem właściwie dobranej metodyki z uwzględnieniem najbardziej aktualnych trendów dla tych kierunków poszukiwań. Zostały także zwieńczone zwięzłymi i właściwie sformułowanymi wnioskami. Realizacja pracy wymagała od Doktoranta opanowania/znajomości szeregu nowoczesnych technik badawczych, w tym chromatograficznych (analitycznych i preparatywnych) i spektralnych, jak UHPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, hodowli komórkowych in vitro, inkubacji substancji naturalnych z próbkami mikrobioty jelitowej ex vivo, a także przygotowania i oczyszczania próbek. Warto podkreślić także umiejętność współpracy naukowej Doktoranta w międzynarodowym zespole naukowym – współautorami dwóch prac ze zbioru doktorskiego są badacze niemieccy, reprezentujący Freie Universität Berlin i Universität Münster.

Konieczne kompetencje badawcze Doktorant nabył w drodze pracy w doświadczonym zespole Laboratorium Środowiskowego Microbiota Lab oraz w trakcie trzech staży zagranicznych w Institute für Tierernährung i Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin (Berlin, Niemcy) oraz w NatuRA Lab, University of Antwerp (Antwerpia, Belgia). Środki na realizację staży pozyskał w drodze konkursów stypendialnych w ramach programów Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej PROM i Erasmus Plus.

Dzięki szerokiej współpracy Doktoranta, Jego dorobek naukowy nie ogranicza się do prac stanowiących zbiór doktorski, a obejmuje w sumie 9 publikacji w renomowanych czasopismach naukowych o sumarycznym współczynniku wpływu IF 36.875, co stanowi imponujący wynik na tym etapie kariery naukowej. Dorobek Doktoranta uzupełnia 8 komunikatów zjazdowych, w tym 6 z konferencji międzynarodowych, potwierdzając Jego dużą aktywność na arenie ponadnarodowej.

Oprócz uzyskania stypendiów stażowych, Doktorant gromadził doświadczenie w zakresie pozyskiwania środków na badania w ramach macierzystej Uczelni (Granty Młodego Naukowca WUM FW25/PM4/18 i 06/F/MBM/21 oraz projekt w ramach programu Inkubator Innowacyjności 4.0). Jest także wykonawcą grantu NCN (projekt nr 2018/29/B/ NZ7/01873), kierowanego przez prof. Sebastiana Granicę.

Przytoczone wyżej dane na temat dorobku publikacyjnego oraz pozostałej aktywności naukowej Doktoranta świadczą o Jego bardzo dobrym przygotowaniu po podjęcia nowych, samodzielnych wyzwań badawczych.

### **Pytania i komentarze**

Realizacja złożonego projektu badawczego to sztuka wyboru – przedmiotu badań, metod i technik badawczych, sposobu przedstawienia wyników, etc. Pozostawia to zawsze pole do dyskusji i komentarza. Nie inaczej jest i w tym przypadku. Oceniając wysoko recenzowaną dysertację w świetle obowiązujących kryteriów, poniżej zamieszczam listę pytań i komentarzy do niektórych wątków rozprawy, jako zachętę dla Doktoranta do dyskusji i przedstawienia własnych opinii w odniesieniu do poruszanych zagadnień.

1. Dlaczego materiał badawczy w przypadku Publikacji 1 stanowiły kwiaty wiązówki a nie farmakopealne ziele (*Filipendulae herba*)?
2. Czy Doktorant ma wiedzę/przypuszcza, czy efekt ochronny reszty acylowej zaobserwowany w Publikacji 1, tj. zwiększający odporność glikozydów na wpływ mikrobioty, jest typowy tylko dla reszty galoilowej, czy też jest możliwy także dla innych reszt, np. *p*-kumaroilowej lub kawoilowej, a jeśli tak, to czym można to wytłumaczyć?

3. Dlaczego Doktorant zrezygnował z opisu zmian zachodzących wśród pozaflawonoidowych składników naparu z kwiatów wiązówki oraz profilu innych tworzących się metabolitów poza urolitynami? Takie uzupełnienie z pewnością zwiększyłyby spójność pracy z Publikacją 2, w której analogiczne informacje są podane dla naparu z ziela nawłoci pospolitej.
4. W naparze z ziela nawłoci Doktorant nie wykrył obecności typowych dla gatunku saponin wyjaśniając ten fakt sposobem ekstrakcji; saponiny *Solidago* to jednak poliglikozydy, dobrze rozpuszczalne w wodzie – prosiłabym Doktoranta o szersze wyjaśnienie tej kwestii.
5. W warunkach in vivo składniki naparów podlegają procesom trawiennym już w górnych odcinkach przewodu pokarmowego, stąd wielu autorów sięga w swoich badaniach po symulację także tych etapów przemian metabolicznych produktów roślinnych. Czy Doktorant, np. na podstawie danych literaturowych lub własnych doświadczeń, może ocenić, jak bardzo wyniki pełnej symulacji trawienia różniłyby się od otrzymanych w pracy doktorskiej (Publikacje 1 i 2) w oparciu o inkubację z mikrobiotą jelitową?
6. W badaniach biotransformacji (Publikacje 1 i 2) wykorzystano próbki ludzkiego kału pochodzące od zdrowych ochotników. Jak wiadomo, skład gatunkowy i aktywność mikrobioty jelitowej może istotnie różnić się w przypadku różnych dawców – od ilu zatem dawców pochodziły próbki pozyskane na potrzeby projektu i czy Doktorant badał ewentualne różnice w przebiegu transformacji analizowanych naparów pod wpływem mikrobioty pochodzącej od różnych dawców?
7. Czy testowano powtarzalność eksperymentów inkubacyjnych i badań przenikalności?
8. Dlaczego Doktorant nie dokonał oceny zawartości poszczególnych analitów w wyciągach roślinnych i frakcjach poinkubacyjnych (Publikacje 2 i 3)? Takie dane ułatwiłyby dyskusję wyników analizy aktywności biologicznej oraz ich interpretację w kontekście wpływu poszczególnych związków i metabolitów.
9. Doktorant wskazał w pracy na zaobserwowane ograniczenia stosowanej metodyki analizy biodostępności, związane z niskim stężeniem wielu analitów w naparze i mieszaniu poinkubacyjnej oraz z niskim odzyskiem frakcji poinkubacyjnej – jak liczbowo kształtowała się ta wydajność i czy/jak Doktorant planuje rozwiązać ten problem w przyszłości?

### Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja w pełni spełnia formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim, określonym w Ustawie z dnia 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) i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr inż. Dominika Popowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną pracy, potwierdzoną wysokim współczynnikiem oddziaływania zbioru doktorskiego (IF=10.179) oraz całości dorobku Doktoranta (IF=36.875), a także jego aktywność w międzynarodowym środowisku naukowym, wnoszę do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Farmakognozji  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
  
dr hab. n. farm. prof. nadzw. Monika A. Olszewska