

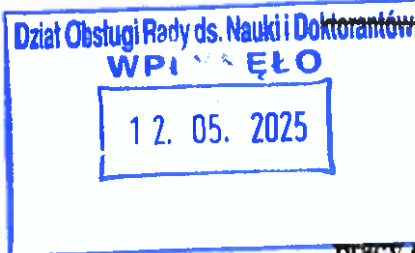


UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w
POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD FARMACJI FIZYCZNEJ I FARMAKOKINETYKI

Adres: ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań
mkaraz@ump.edu.pl

tel. (61) 641-83-67



Poznań 2025-05-09

RECENZJA

pracy doktorskiej wykonanej przez mgr. Krzysztofa Stępnia
pt: „Wybrane aspekty jakości niektórych suplementów diety zawierających aminokwasy”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr. Krzysztofa Stępnia wykonana pod kierunkiem dr hab. n. farm. Joanny Giebułtowicz w Zakładzie Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dotyczy analizy wybranych suplementów diety w aspekcie ich składu jakościowego i ilościowego, a także przewidywania potencjalnej skuteczności na podstawie profilu uwalniania aktywnych składników. Niedostateczna regulacja rynku suplementów diety oraz niewystarczające działania organów nadzoru sprawiają, że produkty te mogą zawierać niebezpieczne substancje, a ich skład często nie odpowiada deklaracjom producentów. Sfałszowane leki i podrobione suplementy diety to nie tylko dochodowy biznes dla grup przestępczych, lecz także realne zagrożenie dla zdrowia i życia pacjentów. W związku z powyższym praca doktorska mgr. Stępnia doskonale wpisuje się swoją tematyką w aktualny obecnie problem zwalczania przestępczości farmaceutycznej.

Struktura przedstawionej mi do oceny pracy obejmuje wykaz publikacji składających się na rozprawę doktorską oraz powiązanych z nią doniesień zjazdowych. Ponadto, w jej skład wchodzi streszczenie w języku polskim i angielskim, teoretyczne wprowadzenie do badanej tematyki, jasno sprecyzowany cel badań, artykuły będące integralną częścią rozprawy oraz podsumowanie i wnioski. Szkoda, że zabrakło chociaż krótkiego omówienia poszczególnych publikacji wchodzących w skład pracy oraz wskazania opisanych w nich kluczowych osiągnięć, co ułatwiłoby mi jako recenzentowi interpretację uzyskanych danych. Jednak rozumiem, że Doktorant kierował się

wytycznymi swojego macierzystego Uniwersytetu w zakresie przygotowania rozprawy w przedstawionej mi do oceny formie.

Szeroki zakres badań przeprowadzonych przez mgr. Stępnia udokumentowano w pięciu spójnych tematycznie publikacjach (1 praca przeglądowa i 4 oryginalne). Praca przeglądowa pochodzi z 2019 r., natomiast artykuły oryginalne zostały opublikowane w latach 2022 - 2024 w międzynarodowych czasopismach (*Pharmaceuticals, Life, Food Additives and Contaminants, Microchemical Journal*), posiadających wysokie współczynniki oddziaływania *Impact Factor* w zakresie 2,5 – 4,9. Sumaryczny współczynnik oddziaływania cyklu prac wynosi 15,2. Do rozprawy dołączono oświadczenia Doktoranta oraz współautorów opublikowanych manuskryptów. Wynika z nich, że udział p. mgr. Krzysztofa Stępnia w przygotowaniu tych prac był znaczący (55 - 80%) i obejmował aktywne uczestnictwo w opracowaniu metodyki i realizacji przeprowadzonych eksperymentów, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptów. Ponadto, wyniki badań objętych rozprawą prezentowane były w formie wystąpień ustnych i podczas sesji plakatowych na 7 konferencjach. Z dołączonych informacji wynika, że p. Krzysztof Stępień jest również współautorem dwóch publikacji oraz 4 doniesień zjazdowych spoza cyklu.

W rozdziale pierwszym rozprawy, będącym teoretycznym wprowadzeniem w podjętą tematykę badań, Doktorant przedstawił charakterystykę polskiego rynku suplementów diety oraz dane na temat świadomości Polaków w odniesieniu do stosowania suplementacji. Opisał przyczyny niskiej jakości produktów powołując się na konkretne przykłady substancji czynnych dostępne w piśmiennictwie. Doktorant trafnie wykorzystał przedstawione powyżej zagadnienia teoretyczne do podkreślenia zasadności podjęcia badań przeprowadzonych w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej. Zwrócił uwagę na ograniczoną liczbę danych na temat badania uwalniania oraz rzeczywistego składu jakościowego i ilościowego suplementów diety zawierających aminokwasy. Badania objęte rozprawą doktorską można uznać za nowatorskie, gdyż uzupełniają brakujące informacje dotyczące jakości dostępnych w Polsce suplementów zawierających tryptofan, prolinę, tyrozynę i karnitynę. Jedyne, czego mi zabrakło w tej części pracy, to nawiązanie do metodyki badania uwalniania substancji czynnych, a szczególnie specyfiki aparatury PhysioCell wykorzystanej w przeprowadzonych badaniach.

Cel pracy oraz konieczne do jego zrealizowania zadania badawcze zostały jasno sprecyzowane w rozdziale drugim. Doktorant postawił sobie ambitne zadanie przeprowadzenia szeregu badań obejmujących przegląd piśmiennictwa dotyczącego powszechności stosowania suplementów diety oraz zagrożeń związanych z ich

stosowaniem, analizę ilościową głównych składników badanych tabletek i kapsułek oraz identyfikację substancji niezadeklarowanych przez producentów. Zaplanowano również badania uwalniania głównego składnika z analizowanych formułacji, a w przypadku małych ilości uwolnionej substancji próbę wyjaśnienia przyczyn tego zjawiska. Kolejnym zadaniem badawczym była ocena przydatności farmakopealnych metod badania uwalniania substancji do identyfikacji suplementów diety o niskiej jakości oraz zastosowanie aparatu PhysioCell do wyjaśnienia zachowania się produktów niskiej jakości w przewodzie pokarmowym. Pozytywnie oceniam plan badań, który stanowi logiczny ciąg eksperymentów prowadzących do rozwiązania problemu badawczego.

Pierwsza praca ujęta w rozprawie doktorskiej to publikacja przeglądowa, w której Autor charakteryzuje najliczniejsze grupy suplementów stosowanych w Polsce wskazując przede wszystkim na preparaty zawierające magnez, bakterie probiotyczne, witaminy, mikroelementy oraz preparaty na odporność. Przedstawia również strukturę rozwoju tej gałęzi przemysłu farmaceutycznego oraz regulacje prawne obowiązujące w Polsce i Unii Europejskiej. Bardzo ważnym tematem podjętym w publikacji są zagrożenia związane z nieprawidłowym stosowaniem suplementów diety, wśród których Doktorant wskazuje przede wszystkim na nieuzasadnione stosowanie tych produktów, co może prowadzić do przekroczenia zalecanych norm żywienia. Kolejnym ważnym problemem są interakcje z produktami leczniczymi prowadzące do wystąpienia działań niepożądanych, obniżenia lub braku efektu terapeutycznego. Co bardzo cenne, Autor podaje konkretne przykłady interakcji leków z substancjami pochodzenia roślinnego, witaminami i składnikami mineralnymi. Wskazuje również na zagrożenia związane z brakiem kontroli jakości, powołując się na przykładowe wyniki badań jakościowych dotyczących obecności niedozwolonych składników, czystości mikrobiologicznej czy zawartości substancji leczniczej. Praca podejmuje ważny temat przestępczości farmaceutycznej dotyczącej fałszowania suplementów, szczególnie preparatów na odchudzanie, dla sportowców, wpływających na sprawność seksualną, łagodzących ból i nasennych. Autor wskazuje na konieczność podejmowania działań mających na celu dokonanie precyzyjnej oceny jakości suplementów diety. Postulat ten realizuje w kolejnych publikacjach wskazując badania, które powinny być przeprowadzone w ramach kontroli jakości.

Po zapoznaniu się z tą publikacją, nasunęło mi się pytanie, na które Doktorant mógłby odpowiedzieć podczas obrony pracy doktorskiej: Jaka jest popularność wśród Polaków suplementów zawierających aminokwasy, które są tematem przewodnim cyklu prac, oraz jakie zagrożenia wynikają z nadmiernego stosowania i fałszowania tych konkretnych preparatów?

Kolejna publikacja dotyczy zastosowania chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) do analizy jakości suplementów diety zawierających tryptofan. Doktorant poddał badaniom jakościowym i ilościowym 22 suplementy w formie tabletek lub kapsułek produkowanych w USA, Wielkiej Brytanii, Niemczech, Francji, Czechach i Polsce. Przeprowadził analizę jakościową głównego składnika oraz badania przesiewowe pod kątem obecności zanieczyszczeń. Dokonał identyfikacji wykrytych związków i podzielił je na pięć grup, do których należały metabolity tryptofanu, produkty kondensacji tryptofanu i związków karbonylowych, produkty degradacji tryptofanu i kynureniny oraz inne zanieczyszczenia, takie jak glukozamina i melatonina. Analiza ilościowa wykazała, że żadna z formulacji nie zawierała ilości głównego składnika deklarowanej przez producenta. Dodatkowo, badane produkty nie spełniły wymogów dotyczących uwalniania. Autor jako możliwe przyczyny tych obserwacji wskazał niewystarczającą zawartością głównego składnika w preparacie, nieprawidłowo dobrane parametry procesu i/lub nieprawidłowo dobrane substancje pomocnicze. Do głównych walorów publikacji należy z pewnością zastosowanie nowoczesnej techniki LC-MS/MS zarówno do badań jakościowych i ilościowych oraz szczegółowa analiza zanieczyszczeń obecnych w suplementach z uwzględnieniem procesów, które mogły doprowadzić do ich powstania.

Proszę o wyjaśnienie, dlaczego w preparacie C6 zawartość tryptofanu jest znacznie mniejsza niż ilość uwolniona w pH 1,2 i 6,8 (Rycina 4. Porównanie ilości Trp uwalnianej przy pH 1,2 (symulowane warunki żołądkowe), pH 6,8 (symulowane warunki jelitowe) z ilością określoną w suplementach diety w kapsułkach (a) i tabletkach (b)).

Publikacja nr 3 objęta rozprawą doktorską dotyczy badań oceniających jakość siedmiu suplementów diety zawierających prolinę. Podobnie jak w poprzedniej pracy, ocena jakości obejmowała wykrycie potencjalnych zanieczyszczeń, oznaczenie zawartości głównego składnika oraz stopnia uwalniania proliny z preparatów. Tutaj również do analizy zanieczyszczeń i zawartości głównego składnika zastosowano technikę LC-MS/MS. Badania potwierdziły, że analogicznie jak w przypadku tryptofanu, również suplementy z proliną nie zawierały tej substancji w ilości deklarowanej przez producenta. Dodatkowo, pięć z siedmiu analizowanych suplementów uwalniało mniej niż 80% substancji. Doktorant wykrył pięć dodatkowych substancji o różnych właściwościach, przy czym żadna z nich nie była produktem przemian proliny. Na podstawie wyznaczonych wartości m/z, profilu izotopowego oraz widm fragmentacji, zaproponował prawdopodobne struktury zanieczyszczeń, przy czym jak sam zauważył, identyfikacja tych substancji wymaga dalszej analizy z wykorzystaniem standardów porównawczych. To stwierdzenie

świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktoranta, który krytycznie analizuje własne odkrycia i jest świadomy ograniczeń prowadzonych badań.

Użyteczność techniki LC-MS/MS w badaniach jakości suplementów diety została udowodniona również w publikacji nr 4. Jest to bardzo ciekawa praca, ukazująca problem fałszowania suplementów diety poprzez dodawanie substancji farmakologicznie czynnych, które są zakazane w tej kategorii produktów. W ramach prowadzonych badań Doktorant przeanalizował 21 legalnie zarejestrowanych suplementów oraz 9 preparatów przejętych przez polską policję z nielegalnego zakładu produkcyjnego. Wykazał obecność 32 zanieczyszczeń w 30 przebadanych suplementach diety, przy czym wiele z tych substancji, nawet w niskich dawkach może wykazywać działanie biologiczne. Istotną zaletą pracy jest szczegółowy opis zidentyfikowanych substancji, z uwzględnieniem ich działania i potencjalnych skutków ubocznych, które mogą wystąpić u pacjentów. Autor pracy trafnie zauważył, że szczególne zagrożenie stanowią analogi inhibitorów fosfodiesterazy 5, ponieważ nie zostały one zarejestrowane, a tym samym nie zostały ocenione pod względem bezpieczeństwa stosowania. Wg mnie, jest to najważniejsza publikacja z przedstawionego mi do oceny cyklu prac, podkreślająca wagę problemu niskiej jakości suplementów diety. Publikacja ta wnosi istotny wkład w toczącą się dyskusję na temat regulacji rynku tych preparatów. Dodatkowo, wskazuje na wysoką użyteczność opracowanego przez Doktoranta podejścia analitycznego, które ma potencjał do szerokiego zastosowania w ocenie jakości suplementów, a tym samym może przyczynić się do opracowania odpowiednich przepisów prawnych.

Ostatnia publikacja z cyklu prac dotyczy badania uwalniania wybranych substancji czynnych: proliny, tryptofanu, tyrozyny, karnityny i witaminy C, z dostępnych na rynku suplementów diety w postaci tabletek i kapsułek. Do realizacji badań Doktorant wykorzystał standardowe metody farmakopealne, a dla produktów charakteryzujących się najniższym stopniem uwalniania $< 25\%$, dokonał ponownej analizy próbek, tym razem z użyciem innowacyjnej aparatury PhysioCell. Zastosowanie tego systemu, symulującego motorykę przewodu pokarmowego doprowadziło do zwiększenia poziomów uwalniania, zwłaszcza w przypadku kapsułek (w zakresie 11 - 106%) i umożliwiło pełniejsze zrozumienie zachowania formulacji w przewodzie pokarmowym. Jest to bardzo ważne spostrzeżenie, które dowodzi, że rozpuszczanie badanych formulacji może być zależne od motoryki przewodu pokarmowego, co może przyczyniać się do dużej zmienności w warunkach *in vivo*. Bardzo ważnym osiągnięciem przedstawionych w publikacji badań było również wykazanie przez Doktoranta, że podstawowe aparaty farmakopealne dostarczają wiarygodnych danych umożliwiających rzetelną i jednoznaczną ocenę jakości

suplementów. Mogą więc być prostym i łatwo dostępnym narzędziem w przypadku ustanowienia regulacji dotyczących obowiązkowego testowania produkowanych suplementów.

W przedstawionej mi do oceny rozprawie zamieszczono podsumowanie oraz wnioski w formie 8 rozbudowanych punktów podsumowujących wyniki przeprowadzonych badań, które zostały opisane w publikacjach wchodzących w skład cyklu. Wg mnie bardziej czytelne byłoby zredukowanie tego rozdziału do formy krótkiego podsumowania oraz wyłonienia kluczowych wniosków wskazujących na konkretne osiągnięcia uzyskane z poszczególnych badań. Ponadto, uważam, że wniosek nr 6 nie oddaje w sposób precyzyjny rzeczywistej interpretacji wyników uzyskanych z użyciem systemu PhysioCell, wskazując zbyt ogólnie na zależność rozpadu suplementów od warunków panujących w przewodzie pokarmowym. Wg mnie druga część wniosku powinna brzmieć następująco: „Wyniki potwierdziły, że jakość formulacji suplementów diety w większości analizowanych preparatów była niska, a proces ich rozpadu może zależeć od motoryki przewodu pokarmowego, co może przyczyniać się do dużej zmienności zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzsobniczej.”

Podsumowując, recenzowana praca jest oryginalna i nowatorska, zwraca uwagę na ważny problem, jakim jest fałszowanie suplementów diety i konieczność działań na rzecz poprawy jakości tych preparatów. Zaproponowane podejście analityczne, obejmujące analizę jakościową i ilościową oraz badania uwalniania, które mogłoby być wykorzystane w ocenie jakości suplementów diety, stanowi twórczy wkład Doktoranta w działania mające na celu stworzenie odpowiednich regulacji prawnych dotyczących tych produktów. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571), tzn. prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie nauki farmaceutyczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgr. Krzysztofa Stępnia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej ze względu na wysoki aplikacyjny charakter przeprowadzonych badań w dziedzinie oceny jakości suplementów diety. O ich wartości świadczy również fakt, że zostały opublikowane w specjalistycznych czasopismach z bazy JCR o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF= 15,2.

Marta Karaźniewicz-Łada

Prof. dr hab. Marta Karaźniewicz-Łada