

Dr hab. Anetta Hanć, prof. UAM  
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza  
Wydział Chemii, Zakład Analizy Śladowej  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8  
61-614 Poznań

Poznań, 27.11.2024r

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Iskandar Azmy Harahap

pt. „The study on the impact of isoflavones and probiotics on calcium bioaccessibility and calcium status – *in vitro* and *in vivo* studies”

„Badanie wpływu izoflawonów i probiotyków na biodostępność i gospodarkę wapnia – badania *in vitro* i *in vivo*”

wykonanej w *Katedrze Żywienia Człowieka i Dietetyki Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu*

pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Suliburskiej

### 1. Podstawa formalna przygotowania recenzji

Formalną podstawą przygotowania recenzji jest pismo od Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia, prof. UPP dr hab. Doroty Cais-Sokolińskiej z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (nr NZDT-4000-24/2024) z dnia 31.10.2024r., informujące o uchwale Rady Naukowej i powierzeniu mi obowiązków recenzenta, a tym samym przygotowania oceny rozprawy doktorskiej mgr Iskandar Azmy Harahap. Recenzja została sporządzona na podstawie wymagań ustawowych określonych w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zmianami).

### 2. Przedstawienie podstawowych danych o kandydacie

Mgr Iskandar Azmy Harahap w 2016 roku uzyskał tytuł magistra (M.Sc.) na Wydziale Nauk o Żywności i Technologii na Uniwersytecie Gadjah Mada w Indonezji, a następnie podjął pracę w Indonezyjskim Instytucie Nauk (LIPI) jako pracownik naukowy. Jako młodszy pracownik naukowy w tej instytucji badawczej zdobył wiele prestiżowych grantów badawczych, zarówno w kraju, jak i za granicą. W 2020 roku, w celu dalszego rozwoju swojej kariery naukowej,

rozpoczął studia doktoranckie na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu w Katedrze Żywienia Człowieka i Dietetyki Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Suliburskiej. Mgr Iskandar Azmy Harahap, jest współautorem 26 publikacji naukowych, w 16 z nich jest pierwszym autorem a w 2 autorem korespondencyjnym oraz współautorem 4 rozdziałów w monografiach. Mgr Iskandar Azmy Harahap jest współautorem 4 zgłoszeń patentowych (1 Polska, 3 Indonesia) a także beneficjentem 8 grantów badawczych krajowych i międzynarodowych. Warto podkreślić, że mgr Iskandar Azmy Harahap był pierwszym laureatem programu Młody Naukowiec na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu UP w Poznaniu. W 2021 roku znalazł się w pierwszej piątce laureatów grantu Preludium finansowanego przez Polskie Narodowe Centrum Nauki. Ponadto w tym samym roku otrzymał stypendium doktoranckie Fundacji Nutricia, będąc jedynym doktorantem, który uzyskał ten grant w Polsce. Ponadto mgr Iskandar Azmy Harahap uczestniczył w kilku stażach międzynarodowych między innymi w 2021 roku w 3 miesięcznym stażu doktoranckim Erasmus+ na Uniwersytecie Porto w Portugalii, czy w roku 2024 w 7 miesięcznym stażu w Leibniz Universität Hannover w Niemczech. Brał czynny udział w 12 konferencjach naukowych w różnych krajach prezentując badania zarówno w formie wystąpień jak i posterów. W 2024 roku podczas International Conference of Food Digestion w Portugalii został finalistą nagrody dla młodych naukowców. Ponadto w 2024r otrzymał nagrodę Travel Grant Award i został zaproszony do wygłoszenia wykładu w International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) w Irlandii, co niewątpliwie jest uznaniem dla pracy naukowej doktoranta. W ramach międzynarodowej aktywności naukowej mgr Harahap wykazuje także swoje zaangażowanie jako recenzent manuskryptów nadesłanych do czasopism o dużej renomie/ z bazy JCR (np. PloS One, Current Medical Science, Obesity Reviews). Aktualny indeks Hirsha wynosi 9 a liczba cytowań, według bazy Scopus, 205.

### 3. Przedmiot recenzji – ocena formalna i merytoryczna rozprawy doktorskiej

Przedmiotem recenzji jest praca zatytułowana „Badanie wpływu izoflawonów i probiotyków na biodostępność i gospodarkę wapnia – badania in vitro i in vivo”, napisana pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Suliburskiej. Rozprawa doktorska mgr Iskandar Azmy Harahap stanowi zbiór pięciu publikacji spójnych pod względem tematycznym, które zostały opublikowane w latach 2021-2024.

Zgłoszony dorobek obejmuje następujące publikacje:

P1. Harahap, I. A. & Suliburska, J. (2021). Probiotics and Isoflavones as a Promising Therapeutic for Calcium Status and Bone Health: A Narrative Review. *Foods*, 10(11), 2685–2685.

P2. Harahap, I. A., Olejnik, A., Kowalska, K., & Suliburska, J. (2024). Effects of Daidzein, Tempeh, and a Probiotic Digested in an Artificial Gastrointestinal Tract on Calcium Deposition in Human Osteoblast-like Saos-2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 1008–1008.

P3. Harahap, I. A., Kuligowski, M., Cieslak, A., Kołodziejski, P. A., & Suliburska, J. (2024). Effect of Tempeh and Daidzein on Calcium Status, Calcium Transporters, and Bone Metabolism Biomarkers in Ovariectomized Rats. *Nutrients*, 16(5), 651– 651.

P4. Harahap, I. A., Schmidt, M., Pruszyńska-Oszmałek, E., Sassek, M., & Suliburska, J. (2024). Impact of Lactobacillus acidophilus and its Combination with Isoflavone Products on Calcium Status, Calcium Transporters, and Bone Metabolism Biomarkers in a Post-menopausal Osteoporotic Rat Model. *Nutrients*, 16(15), 2524–2524.

P5. Harahap, I. A., Moszak, M., Czapka-Matyasik, M., Skrypnik, K., Bogdański, P., & Suliburska, J. (2024). Effects of Daily Probiotic Supplementation with Lactobacillus acidophilus on Calcium Status, Bone Metabolism Biomarkers, and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A Controlled and Randomized Clinical Study. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1401920.

Publikacje wchodzące w skład cyklu są dobrze przygotowane i niewątpliwie wnoszą nowość naukową do dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF wskazanych prac, według bazy JCR wynosi 23,2, co jest równe 560 punktom MNiSW (wg. Komunikatu Ministra Nauki z dnia 5 stycznia 2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych).

Cykl publikacji naukowych został przedłożony do oceny wraz z autoreferatem. Biorąc pod uwagę, że wszystkie publikacje składające się na rozprawę zostały starannie opracowane i pozytywnie ocenione przez recenzentów w procesie publikacji, a także zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych o szerokim zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku wpływu, skupię się na formalnej i merytorycznej ocenie autoreferatu. Autoreferat rozpoczyna się wstępem, który jest bardzo ważny z punktu widzenia uzasadnienia tematu badawczego w ramach wybranej dyscypliny. Sposób przygotowania wstępu dowodzi, że doktorant posiada umiejętność krytycznej analizy literatury naukowej oraz planowania badań, z odpowiednim cytowaniem źródeł. W kolejnych podrozdziałach doktorant formułuje główne tezy i cele badawcze. Głównym celem tej rozprawy zdefiniowanym przez doktoranta jest zbadanie wpływu izoflawonów i probiotyki, które zwiększają biodostępność wapnia i wspomagają zdrowie kości, szczególnie w kontekście osteoporozy pomenopauzalnej, łącząc badania *in vitro* i *in vivo*. Dalej autor uzasadnia wybór publikacji do cyklu zgłaszanego jako osiągnięcie naukowe. Następnie uzasadnia i opisuje metody badawcze zastosowane podczas wykonywania badań do pracy doktorskiej. Prezentuje i analizuje uzyskane w ramach badań wyniki oceniając ich znaczenie dla dziedziny naukowej. W rozdziale autoreferatu dotyczącym wyników badań Autor opisuje kolejne publikacje wybrane do cyklu [P1-P5], łącząc to z celami szczegółowymi badań.

Praca [P1] ma charakter przeglądowy, w której zebrano najważniejsze informacje na temat składników odżywczych o działaniu terapeutycznym, ze szczególnym uwzględnieniem probiotyków i izoflawonów w kontekście kontrolowania wchłaniania wapnia i poprawy zdrowia kości. Pozostałe prace [od P2 do P5] to współautorskie oryginalne artykuły badawcze. W pierwszym etapie badań [P2] przeprowadzono eksperyment *in vitro* wykorzystując komórki Caco-2 i Saos-2 do symulacji trawienia ludzkiego i aktywności osteoblastów w procesie mineralizacji kości. Badania te dostarczyły cennych informacji na temat zróżnicowanych efektów działania daidzeiny, tempeh i probiotyków *L. acidophilus* na biodostępność i odkładanie się wapnia w komórkach krwiotwórczych-osteoblastach. Dwie kolejne prace [P3 i P4], dotyczyły badań *in vivo* gdzie zastosowano model szczurzy OVX w celu opisanie mechanizmów będących podstawą problemów zdrowotnych występujących podczas menopauzy. W modelu tym wykorzystano samice szczurów, którym usunięto chirurgicznie jajniki, aby wywołać efekt hormonalny podobny do menopauzy u kobiet. Badania podzielono na dwie części. W pierwszej części [P3] badano wpływ czystej daidzeiny i tempehu na stan wapnia, transportery wapnia i metabolizm kości u szczurów, natomiast w drugiej części [P4] oceniono wpływ terapeutyczny probiotyków *L. acidophilus* i ich połączenie z produktami izoflawonowymi, takimi jak daidzeina i tempeh. Uzyskane wyniki badań sugerują współzależność między składnikami diety, metabolizmem wapnia i zdrowiem kości w okresie menopauzy. Ostatnia praca [P5] włączona przez Doktoranta do cyklu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej dotyczy badań klinicznych z udziałem kobiet po menopauzie. Ta praca znacząco poszerza zakres badań prowadzonych przez mgr Iskandar Azmy Harahap, ponieważ integruje wyniki badań laboratoryjnych i przedklinicznych z interwencjami klinicznymi. To nadaje jej szczególnego naukowego znaczenia. W autoreferacie zawarte są również liczne schematy badań w formie rysunków, co pozytywnie wpływa na odbiór pracy. W podsumowaniu autoreferatu mgr Iskandar Azmy Harahap podkreśla wzajemne powiązania między poszczególnymi publikacjami dowodząc, że stanowią one całościowe osiągnięcie naukowe. Istotnym elementem autoreferatu jest rozdział dotyczący ograniczeń oraz perspektyw przyszłych badań. Uwzględnienie ograniczeń pokazuje, że Doktorant potrafi krytycznie ocenić swoją pracę, co jest kluczowe w nauce, natomiast wskazanie perspektyw może inspirować do dalszych badań, które mogą te ograniczenia przezwyciężyć, co pomaga w rozwoju danego obszaru nauki. Kolejne rozdziały obejmują informacje o finansowaniu badań, piśmiennictwo oraz spis tabel i rysunków oraz orzeczenia Komisji Bioetycznej. W przypadku rozprawy doktorskiej opartej na cyklu współautorskich publikacji, istotnym elementem recenzji jest ocena indywidualnego wkładu doktoranta w publikacje składające się na rozprawę. Zgodnie z wymaganiami, do rozprawy dołączono oświadczenia wszystkich współautorów publikacji oraz samego Doktoranta, które jednoznacznie potwierdzają, że wkład mgr Iskandar Azmy Harahap w prowadzenie badań i przygotowanie wszystkich publikacji był

znaczący. Indywidualny wkład w przygotowanie publikacji obejmował między innymi konceptualizację badań, ich realizację, opracowanie i wizualizację danych oraz przygotowanie publikacji do druku.

#### 4. Najważniejsze osiągnięcia naukowe doktoranta

Temat podjęty przez mgr Iskandar Azmy Harahap jest bardzo interesujący i ważny zarówno pod względem poznawczym, jak i praktycznym. Mocną stroną pracy jest niewątpliwie kompleksowe podejście do tematu badań. Rozprawa łączy badania kliniczne *in vitro*, *in vivo* i na ludziach, zapewniając holistyczne spojrzenie na potencjalne korzyści i ograniczenia izoflawonów i probiotyków w zakresie biodostępności wapnia i zdrowia kości. Ta różnorodność metodologiczna zwiększa solidność i wiarygodność ustaleń.

Badania prowadzone przez doktoranta nad połączeniem efektu działania daidzeiny i tempehu z probiotykami, takimi jak *L. acidophilus*, na metabolizm wapnia i zdrowie kości, są jednymi z pierwszych systematycznych i szeroko zakrojonych badań przedstawionych w literaturze. Zastosowanie sztucznego modelu przewodu pokarmowego do badania trawienia oraz późniejszego wpływu na odkładanie się wapnia w komórkach osteoblastycznych jest szczególnie nowatorskim aspektem, dostarczającym wyraźnych wskazówek na temat bioaktywnego potencjału tych związków po trawieniu. Istotne są również wyniki uzyskane przez doktoranta w badaniach prowadzonych na modelach szczurzych OVX. Badania te dostarczają dowodów sugerujących, że produkty bogate w izoflawony, takie jak tempeh i daidzeina, w połączeniu z probiotykami, mogą służyć jako realne alternatywy lub uzupełnienie konwencjonalnych metod leczenia osteoporozy. Kluczowe w kontekście prowadzonych przez doktoranta badań jest badanie kliniczne z udziałem kobiet po menopauzie. Ustalenie, że codzienne przyjmowanie *L. acidophilus* stabilizuje obrót kostny, mimo niewielkich zmian w gęstości mineralnej kości, stanowi fundament dla przyszłych badań i ewentualnych zaleceń dietetycznych dla kobiet po menopauzie.

Uzyskane wyniki wskazują potencjalnie korzystne interwencje dietetyczne w leczeniu osteoporozy menopauzalnej, oferując praktyczne rozwiązania, które można wdrożyć w rzeczywistych scenariuszach. Rozprawa łączy kilka dyscyplin nauki - takie interdyscyplinarne podejście wzbogaca badanie i poszerza jego możliwości aplikacyjne. Innowacyjne podejście doktoranta wnosi znaczący wkład w dziedzinę nauk o żywności i żywieniu, a także nauk medycznych. W pracy określono także perspektywy badawcze na przyszłość, co ma istotne znaczenie dla rozwoju nauki.

## 5. Szczegółowe uwagi i dyskusja

Pod względem formalnym i merytorycznym, badania przeprowadzone przez Doktoranta oceniam bardzo pozytywnie. Praca zasługuje na wysoką ocenę, szczególnie ze względu na wyjątkową spójność tematyczną cyklu publikacji. Warto zauważyć, że przedstawione badania wykazują istotne powiązania, każda kolejna praca stanowi kontynuację poprzedniego etapu. Taka struktura umożliwia kompleksowe zrozumienie wpływu izoflawonów i probiotyków na biodostępność wapnia oraz zdrowie kości w różnych modelach eksperymentalnych, w tym eksperymentach *in vitro*, badaniach na zwierzętach oraz badaniach klinicznych na ludziach. Po szczegółowej analizie treści rozprawy nasunęło mi się kilka ogólnych pytań, które chciałabym, aby Doktorant omówił podczas obrony.

- Przy wyborze preparatu suplementacyjnego istotna wydaje się forma chemiczna pierwiastka. W swoich badaniach zastosował Pan cytrynian wapnia. Na jakiej podstawie dokonano wyboru tej formy chemicznej wapnia? Czy rozważał Pan zastosowanie innych form, na przykład takich, które z chemicznego punktu widzenia zawierają większą ilość wapnia elementarnego?

- Z literatury wynika, że na zwiększenie wchłaniania wapnia wpływa wiele czynników, nie tylko witamina D i K, o której wspominał Pan w ograniczeniach pracy [P2, P3]. Istotny jest również stosunek wagowy wapnia do fosforu. W pracy [P2, P4] wskazuje Pan, że biodostępność wapnia w układzie pokarmowym niekoniecznie koreluje z jego odkładaniem się w komórkach kostnych/kościach. W związku z tym nasuwa się pytanie, czy kontrolował Pan w badaniach prowadzonych *in vitro* i *in vivo* stosunek wapnia do fosforu? Odpowiedni stosunek tych pierwiastków również ma wpływ na wzajemne wchłanianie i wykorzystanie przez organizm.

- W badaniach ilościowych, w szczególności dotyczących oznaczania wapnia, kluczowe jest uzyskanie miarodajnych wyników. W swoich pracach wskazuje Pan na spójność pomiarową poprzez stosowanie certyfikowanych materiałów odniesienia oraz podaje wartość poprawności stosowanej procedury analitycznej (która zawsze wynosi 92%, dla różnych CRM). Niemniej jednak, w żadnej z prac nie zawarto informacji dotyczących parametrów kontroli jakości uzyskanych wyników pomiarów ocenionych podczas walidacji stosowanej metody analitycznej. Czy wyznaczał Pan inne parametry walidacyjne stosowanej procedury takie jak np. granica wykrywalności, granica oznaczalności, zakres pomiarowy, precyzja pomiaru?

## 6. Podsumowanie recenzji

Podsumowując uważam, że rozprawa doktorska mgr Iskandar Azmy Harahap jest starannie zaplanowanym i wykonanym badaniem potencjalnych korzyści izoflawonów i probiotyków dla biodostępności i gospodarki wapnia w organizmie. Zastosowane kompleksowe podejście, nowatorskie spostrzeżenia i praktyczne implikacje sprawiają, że niniejsza rozprawa stanowi znaczący wkład w dziedzinę nauk medycznych i nauk o zdrowiu, torując drogę dla przyszłych badań i potencjalnych zastosowań klinicznych. **Z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż rozprawa doktorska spełnia ustawowe wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).** Na tej podstawie w pełni przekonana o słuszności wnioskuję do Rady Dyscypliny Wydziału Technologii Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Iskandar Azmy Harahap do kolejnych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie proszę o rozważenie możliwości wyróżnienia rozprawy doktorskiej, a stosowny dokument wraz z uzasadnieniem dołączam do recenzji.

UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU  
Wydział Chemii  
Zakład Analizy Śladowej  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań  
tel. 61 829 16 05



dr hab. Anetta Hanć, prof. UAM

Dr hab. Anetta Hanć, prof. UAM  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
Wydział Chemii, Zakład Analizy Śladowej  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8  
61-614 Poznań

Poznań, 27.11.2024r

### WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszym zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Wydziału Technologii Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Iskandar Azmy Harahap zatytułowanej „Badanie wpływu izoflawonów i probiotyków na biodostępność i gospodarkę wapnia – badania *in vitro* i *in vivo*” wykonanej w Katedrze Żywnienia Człowieka i Dietetyki na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem promotora pani prof. dr hab. Joanny Suliburskiej.

Ogólną wartość merytoryczną przedstawionej mi do oceny pracy oceniam bardzo wysoko. Uważam, że niniejsza praca doktorska ma znaczące walory nowości i oryginalności naukowej i istotnie przekracza średni poziom prac doktorskich, biorąc pod uwagę jakość i zakres prowadzonych badań. Unikalność przeprowadzonych badań polega na analizie synergistycznych efektów między izoflawonami a probiotykami oraz na ocenie potencjalnych zastosowań praktycznych uzyskanych wyników w leczeniu osteoporozy pomenopauzalnej. Badania pokazują, że produkty bogate w izoflawony, takie jak tempeh i daidzeina, w połączeniu z probiotykami, mogą służyć jako alternatywa lub uzupełnienie konwencjonalnych metod leczenia osteoporozy. Kompleksowy charakter badań, obejmujący badania *in vitro*, *in vivo* i na ludziach, zapewnia holistyczne spojrzenie na badania w zakresie biodostępności wapnia i zdrowia kości. Uzyskane wyniki, dostarczają praktycznych rozwiązań, które można wdrożyć w realnych sytuacjach i niewątpliwie dostarczają cennych informacji zarówno w dziedzinie nauk o żywności i żywieniu jak i nauk medycznych.

O nowatorskim charakterze prowadzonych przez doktoranta badań i otrzymanych wyników świadczą zarówno publikacje naukowe, które składają się na cykl publikacji, będące podstawą rozprawy doktorskiej (1 praca o charakterze przeglądowym i 4 o charakterze oryginalnym), jak i pozostałych 21 publikacji, w których mgr Iskandar Azmy Harahap jest współautorem. Wszystkie prace są opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR, o wysokim współczynniku IF i już wielokrotnie cytowane, co najdobitniej świadczy o ich wysokich walorach naukowych.



Dr hab. Anetta Hanć, prof. UAM