



UNIwersYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI
KATEDRA ROZWOJU FUNKCJONALNYCH PRODUKTÓW ŻYWNOŚCIOWYCH

dr hab. inż. Małgorzata Korzeniowska, prof. UPWr

Wrocław, 22.11.2024 r.

Katedra Rozwoju Funkcjonalnych Produktów Żywnościowych

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Iskandara Azmy Harahap

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

wykonanej w Katedrze Żywienia Człowieka i Dietetyki

Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Joanny Suliburskiej

Recenzja została wykonana w oparciu o uchwałę Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 24 października 2024 r. w związku z postępowaniem o nadanie mgr. Iskandarowi Azmy Harahap stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w dyscyplinie Technologia żywności i żywienia.

Dobór i znaczenie tematu

Wybór tematu rozprawy doktorskiej mgr. Iskandara Azmy Harahap, skupiającej się na niedoborze wapnia u kobiet w okresie pomenopauzalnym w odniesieniu do ryzyka występowania osteoporozy, został oparty na zidentyfikowanej luce w obecnym stanie wiedzy w tej dziedzinie żywienia człowieka i medycyny. Wapń jest niezbędnym i najbardziej obficie występującym minerałem w organizmie człowieka, odgrywającym i wspomagającym wiele funkcji zapewniając prawidłowe funkcjonowanie organizmu, m. in. tworząc strukturę kości i zębów, regulując skurcz włókien mięśniowych, a także działanie układu nerwowego i sercowo-naczyniowego. Wapń występuje w wielu popularnych produktach spożywczych, takich jak

UNIwersYTET PRZYRODNICZY WE WROCLAWIU
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI
KATEDRA ROZWOJU FUNKCJONALNYCH PRODUKTÓW ŻYWNOŚCIOWYCH
UL. J. CHEŁMOŃSKIEGO 37, 51-630 WROCLAW
TEL. +48 71 320 7782 • FAX +48 71 320 7781
E-MAIL: DFFPD@UPWR.EDU.PL •





produkty mleczne i ryby (sardynki), a także w warzywach liściastych, brokułach i jarmużu, jednak jego pozyskanie ze składników diety może zostać znacznie ograniczone przez słabą biodostępność lub wybrane diety limitujące (wegetariańskie i wegańskie), preferencje żywieniowe (dzieci) oraz leki. Niedobór wapnia może prowadzić do wielu poważnych problemów w organizmie, m.in. zaburzenia funkcjonowania mięśni, funkcji serca i mózgu, ale przede wszystkim choroby niedoborowe wapnia (hipokalcemia), tj. osteopenia i osteoporoza, wpływające na układ kostny i zęby. Grupy demograficzne bardzo podatne na niedobór wapnia to osoby starsze i kobiety po menopauzie, u których obniżenie wydzielania estrogenu powoduje szybsze ścięczenie kości, co zmniejsza gęstość kości i zwiększa ryzyko złamań. Ze względu na słabe wchłanianie wapnia związane ze starzeniem się organizmu, problemy trawienne lub niedobór witaminy D (ograniczona ekspozycja na światło słoneczne), a także niekorzystne skutki leczenia z udziałem bisfosfonianów, poszukiwanie innych sposobów przyjmowania wapnia oraz zwiększenia jego biodostępności i statusu ma kluczowe znaczenie w naukach o żywieniu i zdrowiu.

Ocena strony formalnej pracy

Rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Iskandara Azmy Harahap pt.: „Badanie wpływu izoflawonów i probiotyków na biodostępność i status wapnia – badania *in vitro* i *in vivo*” liczy 52 strony i dzieli się na: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Krótka biografia i najważniejsze osiągnięcia doktoranta, Zwięzły opis opublikowanych prac z uzasadnieniem złożenia ich w monotematyczny cykl, Wstęp, Materiały i metody, Najważniejsze wyniki badań, Wnioski, Aspekty nowości i ograniczenia przeprowadzonych badań, Perspektywy na przyszłość, Bibliografia, Spis 13 publikacji pomocniczych, których doktorant jest współautorem. Do części opisowej rozprawy doktorskiej dołączono wydruk publikacji składających się na rozprawę doktorską, a następnie Oświadczenia współautorów publikacji rozprawy doktorskiej. Całość rozprawy składa się z pięciu artykułów, jednego przeglądowego i czterech oryginalnych prac badawczych, opublikowanych w czasopismach naukowych wydawnictw MDPI i Frontiers. Cały cykl prezentuje prawidłowo opracowane i przeprowadzone badania skupiające się na niedoborze wapnia u kobiet w okresie pomenopauzanym do diety których wprowadzono odpowiednie dawki tempehu, daidzeiny i bakterii probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* podzielonych na badania *in vitro*, *in vivo* oraz kliniczne. Łączna ocena cyklu prac wynosi IF=23,2, co odpowiada 560 pkt. MNiE. Mgr Harahap jest pierwszym autorem wszystkich przedłożonych publikacji.

Oceniana rozprawa spełnia wymagania formalne dla tego typu prac przedstawianych w postępowaniu o stopień doktora, tj. ma charakter eksperymentalny i zawiera wszystkie niezbędne rozdziały ułożone w typowej kolejności. Opracowanie jest spójne, napisane poprawnie jasnym i zrozumiałym językiem.



Ocena merytoryczna pracy

Wprowadzenie do podjętej tematyki rozprawy doktorskiej zawiera kluczowe informacje o wapniu, jako niezbędnym składniku odżywczym i fizjologicznym, w organizmie człowieka. Autor wskazał proponowany mechanizm wchłaniania wapnia i problemy związane z niedoborem tego składnika, zwłaszcza u kobiet po menopauzie. Mgr Iskandar Harahap zwrócił również uwagę na uznane i stosowane leczenie medyczne osteoporozy, wskazując ich ograniczenia i ryzyko terapii, głównie w aspekcie leczenia z udziałem bisfosfonianów. Jako alternatywę Kandydat, w oparciu o dane literaturowe, zaproponował tempeh czyli tradycyjny indonezyjski produkt powstający w trakcie procesu fermentacji ziaren soi, w połączeniu z probiotycznym szczepem *Lactobacillus acidophilus* w celu minimalizacji i/lub wyeliminowania problemu niedoboru wapnia u kobiet w okresie po menopauzie. Do części wprowadzającej włączono także informacje zebrane i przedstawione w pierwszej publikacji (Probiotics and Isoflavones as a Promising Therapeutic for Calcium Status and Bone Health: A Narrative Review, *Foods*, 2021, 10, 2685), która jest spójnym artykułem przeglądowym o potencjale probiotyków i izoflawonów w utrzymaniu pożądanego stężenia wapnia w organizmie człowieka.

Cel pracy i hipotezy badawcze – Na podstawie danych literaturowych mgr Iskandar Azmy Harahap prawidłowo sformułował trzy krótkie i zrozumiałe hipotezy badawcze, jako punkt wyjścia do wytyczenia jednego ogólnego i czterech szczegółowych celów badań. Doktorant stwierdził, że izoflawony (tempeh, daidzeina) i probiotyki (*Lactobacillus acidophilus*) zwiększają biodostępność i status wapnia w organizmie, poprawiając zdrowie kości u kobiet po menopauzie, zwłaszcza ze względu na ich równoczesne odkładanie i efekt synergistyczny. Cele są sformułowane prawidłowo i możliwe do osiągnięcia dzięki prawidłowo zaplanowanej serii eksperymentów.

Wyniki i dyskusja – Tematem wiodącym czterech oryginalnych prac badawczych tworzących monotematyczny cykl jest biodostępność i status wapnia w wybranych tkankach po interwencji polegającej na włączeniu do diety tempehu, daidzeiny i bakterii probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* na trzech poziomach *in vitro*, *in vivo* i w badaniu klinicznym z udziałem kobiet po menopauzie. Wszystkie publikacje zostały przygotowane w oparciu o oryginalne wyniki badań uzyskane przez mgr. Iskandar Harahap podczas prac eksperymentalnych wykonanych w trakcie kształcenia w szkole doktorskiej.



Publikacja 2 Effects of daidzein, tempeh, and a probiotic digested in an artificial gastrointestinal tract on calcium deposition in human osteoblast-like Saos-2 cells, opublikowana w International Journal of Molecular Sciences (25(2), 1008, IF 4.9; 140 pkt.) przedstawia wyniki pierwszego eksperymentu nad wpływem daidzeiny, tempehu i *Lactobacillus acidophilus* na odkładanie wapnia w ludzkich osteoblastopodobnych komórkach Saos-2 poprzez trawienie w modelowym układzie przewodu pokarmowego. Praca eksperymentalna skupiała się na analizie biodostępności wapnia z badanych materiałów w warunkach symulowanego trawienia, a następnie wchłaniania jelitowego w modelu komórek nabłonka jelitowego Caco-2 a ostatni etap dotyczył biodostępności i procesów komórkowych związanych z kośćmi w ludzkich osteoblastopodobnych komórkach Saos-2. Głównym odkryciem badań na tym poziomie było stwierdzenie braku efektu synergistycznego, jak również znacznej poprawy odkładania wapnia, gdy stosowano daidzeinę, tempeh i *Lactobacillus acidophilus*. MSc Harahap zasugerował również wpływ testowanych izoflawonów i bakterii probiotycznych na różnicowanie osteogeniczne w komórkach Saos-2, co może potencjalnie zachować lub poprawić zdrowie kości.

Pytania: 1. Na jakiej podstawie wybrano konkretny szczep *Lactobacillus acidophilus* do badań?
2. Jakie są ograniczenia spożycia tempehu i jaka jest zalecana dzienna dawka tego produktu?
3. W przedstawionym badaniu (P2) w warunkach *in vitro*, tempeh, *Lactobacillus acidophilus* i daidzeina nie miały wpływu na odkładanie wapnia w komórkach Saos-2. Jednym z możliwych powodów jest hamujące działanie substancji obecnych w tempehu. Jednak *in vivo* wystąpiło bardzo silne odkładanie wapnia w kościach nóg szczurów karmionych tempeh. Czy to oznacza, że substancje obecne w tempeh nie wykazały swojej aktywności hamującej *in vivo*? Czy w literaturze znane są inne potencjalne mechanizmy dla tego zjawiska?

Publikacja 3 Effect of tempeh and daidzein on calcium status, calcium transporters, and bone metabolism biomarkers in ovariectomized rats (Nutrients, 16, 651, IF 4,8; 140 pkt.) przedstawia wyniki badań na modelu szczura po owariektomii, w którym zwierzęta były karmione codziennie tempehem i daidzeiną. Stężenie wapnia, ekspresja transporterów wapnia i biomarkery metabolizmu kości zostały przeanalizowane w celu symulacji warunków osteoporozy pomenopauzalnej. W porównaniu do leczenia bisfosfonianami, wykazano iż tempeh i daidzeina poprawiły stan wapnia, zwiększyły ekspresję transporterów wapnia i pozytywnie wpłynęły na biomarkery metabolizmu kości u szczurów. Na podstawie przeprowadzonych badań zasugerowano, że wybrane izoflawony mogą być dobrym źródłem wapnia w diecie oraz istotnym czynnikiem w zapobieganiu i leczeniu niedoborów wapnia.

Trzecia eksperymentalna część cyklu przedstawiona w pracy doktorskiej (**Publikacja 4:** Impact of *Lactobacillus acidophilus* and its combination with isoflavone products on calcium status,



calcium transporters, and bone metabolism biomarkers in a postmenopausal osteoporotic rat model. *Nutrients* (16, 2524, IF 4,8; 140 pkt.) skupia się na synergistycznym działaniu równoczesnego podania *Lactobacillus acidophilus*, tempehu i daidzeiny na stężenie wapnia, transportery wapniowe i biomarkery metabolizmu kości w modelu szczura po ovariectomii. Zebrane wyniki i obserwacje badania wykazały, że codzienne spożywanie probiotycznego *Lactobacillus acidophilus* i jego połączenia z izoflawonami zwiększa zawartość wapnia w kości udowej, jednak ten rodzaj diety zmniejszył stężenie wapnia w surowicy krwi. Wykazano pozytywny wpływ zastosowanej modyfikacji diety na biomarkery metabolizmu kości, parametry hematologiczne oraz zawartość cholesterolu i trójglicerydów, jednak przy jednoczesnym podwyższeniu poziomu glukozy we krwi.

Pytanie: 1. W badaniach *in vivo* na szczurach (P3 i P4) wyraźnie widać, że daidzeina, tempeh i *L. acidophilus* prowadzą do znacznego obniżenia stężenia wapnia we krwi szczura. Według niektórych danych literaturowych (doi:10.1538/expanim.61.399) normalny poziom wapnia w surowicy szczurów wynosi od 1,32 do 3,24 mmol/l. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że w grupie szczurów karmionych tempehem kalcemia została obniżona do poziomu 1,4 mM (osiągając prawie dolną granicę), podczas gdy ta grupa zwierząt charakteryzowała się najwyższym spożyciem wapnia w porównaniu do wszystkich pozostałych grup. Czy oznacza to, że spożywanie daidzeiny, tempehu z lub bez dodatkowego *L. acidophilus*, przez dłuższy okres czasu i w większych ilościach, może hipotetycznie prowadzić do hipokalcemii i wszystkich związanych z tym konsekwencji, w tym funkcjonowania układu nerwowego i mięśni?

2. W badaniach przedstawionych w P3 daidzeina i w P4 tempeh i pałeczki kwasu mlekowego poważnie prowadziły do podwyższenia poziomu AST (aminotransferazy asparaginianowej) u szczurów doświadczalnych. Czy wskazuje to na ich możliwą hepatotoksyczność przy dłuższym okresie stosowania i w większych ilościach?

3. Stwierdzono, że daidzeina (P3) i daidzeina z pałeczkami kwasu mlekowego oraz tempeh z pałeczkami kwasu mlekowego (P4) znacząco obniżyły poziom trójglicerydów w surowicy szczurów doświadczalnych (szczególnie tempeh z pałeczkami kwasu mlekowego). Czy oznacza to, że daidzeina i tempeh mogą być hipotetycznie stosowane w celu obniżenia poziomu trójglicerydów u ludzi?

Ostatnia część pracy (**Publikacja 5** 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, IF 4,0; 70 pkt.) dotyczy badań klinicznych przeprowadzonych u ludzi, w którym kobiety w okresie po menopauzie uzupełniały swoją codzienną dietę *Lactobacillus*



acidophilus pod kątem poziomu wapnia, biomarkerów metabolizmu kości i profili gęstości mineralnej kości. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że chociaż suplementacja probiotykami nie wpłynęła znacząco na gęstość mineralną kości, pomogła ustabilizować obrót kostny. Badanie sugeruje również, że ta interwencja dietetyczna prowadziła do wystąpienia zaburzeń w stężeniu wapnia i glukozy we krwi u ludzi.

Pytania: 1. Jaki był powód nieprzetestowania suplementacji probiotykami diety ludzkiej *Lactobacillus acidophilus* wraz z tempeh i daidzeiną, jak w poprzednich eksperymentach *in vitro* i *in vivo* na szczurach.

2. Czy istnieją niekorzystne skutki jednoczesnego (i długotrwałego) spożywania probiotyków i izoflawonów na zdrowie człowieka?

Najważniejsze osiągnięcia przedstawione w pracy podsumowano czterema **wnioskami** odpowiadającymi publikacjom zawartym w rozprawie doktorskiej. Sformułowano także ogólny wniosek podsumowujący całość wykonanych prac. Na podkreślenie zasługuje przedstawiona praktyczna rekomendacja uzyskanych wyników, która jest jednak nieco zbyt ogólna. Wskazanie elementów nowości oraz przyszłych kierunków badań w obszarze depozycji wapnia i mechanizmów regulacji minerałów to również dobre punkty rozprawy. Identyfikacja ograniczeń przedstawionych badań jest bardzo interesującym punktem pracy sugerującym inne potencjalne ścieżki i sposoby zrozumienia procesów i mechanizmów metabolicznych.

Wniosek końcowy

Podsumowując, chciałabym stwierdzić, że oceniana rozprawa doktorska ma wysoki potencjał naukowy z elementami nowości wskazującymi na potencjalnie możliwy mechanizm ograniczania niedoboru wapnia, szczególnie przy wprowadzeniu do diety kobiet w okresie po menopauzie produktów bogatych w izoflawony w połączeniu z probiotycznymi szczepami bakterii *Lactobacillus acidophilus*. Wszystkie eksperymenty zostały starannie zaplanowane i przeprowadzone z właściwie dobraną i dostępną metodologią oraz sprzętem w warunkach *in vitro*, *in vivo*, jak i w badaniach klinicznych z udziałem grupy kobiet w okresie po menopauzalnym. Uzyskane wyniki zostały starannie zebrane, poddane analizie statystycznej, omówione i zinterpretowane w sposób wnikliwy, co pozwoliło na ich publikację w uznanych czasopismach naukowych, co świadczy o nowości i wysokim poziomie przeprowadzonych badań (łączny IF 23,2 i 560 punktów ministerialnych). Treść rozprawy doktorskiej mgr Iskandara Azmy Harahap pt.: „**Badanie wpływu izoflawonów i probiotyków na biodostępność i gospodarkę wapnia – badania *in vitro* i *in vivo***” oraz wynikające z niej cenne możliwości praktycznej aplikacji upoważniają mnie do stwierdzenia, że oceniana rozprawa



UNIwersytet
Przyrodniczy
we Wrocławiu

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Katedra Rozwoju Funkcjonalnych Produktów Żywnościowych

doktorska spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.). W związku z powyższym z pełnym przekonaniem składam wniosek do Rady dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Iskandara Azmy Harahap do publicznej obrony.

dr hab. inż. Małgorzata Korzeniowska, prof. UPWr



RESEARCH IN RESEARCH

UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Katedra Rozwoju Funkcjonalnych Produktów Żywnościowych
ul. J. Chelmońskiego 37, 51-630 Wrocław
TEL. +48 71 320 7782 • FAX +48 71 320 7781
E-MAIL: DFFPD@UPWR.EDU.PL •