



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ul. Wojska Polskiego 75

60-625 Poznań

tel. +48 61 848 78 24

e-mail: chemiatd@up.poznan.pl

WYDZIAŁ LEŚNY I TECHNOLOGII DREWNA

Katedra Chemii

Prof. dr hab. Agnieszka Waśkiewicz

Poznań, dn. 29.11.2025 r.

Katedra Chemii

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ul. Wojska Polskiego 75

60-625 Poznań

tel. 061-8487841

e-mail: agnieszka.waskiewicz@up.poznan.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana **mgr inż. Adama Grzywaczyka**

pt. *„Interaction of surfactants of natural origin with phospholipid membranes”*

wykonana na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, w Zakładzie Chemii Organicznej i Bioorganicznej Instytutu Technologii i Inżynierii Chemicznej

pod kierunkiem Pani prof. dr hab. inż. Ewy Kaczorek

Podstawa formalna wykonania recenzji

Podstawą przygotowania recenzji było pismo Pani prof. dr hab. inż. Ewy Kaczorek Dziekan Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej z dnia 7 października 2025 roku (RD-12/4/2025) informujące o uchwale Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne, zgodnie z którą przyjęto rozprawę doktorską Pana mgr inż. Adama Grzywaczyka i powołano niżej podpisaną na recenzentkę.

Sylwetka naukowa Doktoranta

Pan mgr inż. Adam Grzywaczyk realizował pracę doktorską w Zakładzie Chemii Organicznej i Bioorganicznej Instytutu Technologii i Inżynierii Chemicznej na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. inż. Ewy Kaczorek. Jest współautorem trzynastu publikacji naukowych, czterech monografii oraz dwóch patentów. Tak imponujący dorobek naukowy zgromadzony w okresie realizacji pracy doktorskiej zasługuje na szczególne podkreślenie. Doktorant wykazał równie wysoką aktywność w obszarze realizacji aż 9 projektów badawczych finansowanych zarówno

ze środków Uczelni, jak i Narodowego Centrum Nauki, Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego czy też z budżetu Unii Europejskiej pełniąc różne funkcje - wykonawcy, kierownika czy lidera zespołu. Wyniki swoich badań prezentował podczas 21 konferencji zarówno krajowych, jak i międzynarodowych w formie posterów i wystąpień ustnych. Jest także członkiem organizacji i towarzystw naukowych oraz współzałożycielem spółki spin-off. Tak szeroka i ponadprzeciętna aktywność naukowa Pana mgr inż. Adama Grzywaczka zaowocowała przyznaniem prestiżowych nagród przez instytucje krajowe i międzynarodowe.

Dobór i znaczenie tematu

W obliczu narastającego zagrożenia ze strony drobnoustrojów wielolekoopornych konieczne staje się poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych, które zwiększą skuteczność antybiotyków i pozwolą przełamać bariery wynikające z oporności. Jednym z kluczowych elementów warunkujących skuteczność leczenia jest błona komórkowa mikroorganizmów – struktura dynamiczna, kontrolująca transport substancji, integralność komórki oraz działanie licznych mechanizmów obronnych. Jej złożona budowa oraz zmienność lipidowa sprawiają, że błona stanowi trudną do pokonania barierę dla wielu leków, a zmiana jej właściwości może decydować o powodzeniu terapii.

W tym kontekście szczególnego znaczenia nabierają badania nad naturalnymi surfaktantami, zwłaszcza saponinami. Dzięki amfifilowej strukturze związki te mogą, w zależności od składu lipidów i obecności steroli, rozluźniać upakowanie dwuwarstwy, indukować dodatnią krzywiznę oraz tworzyć lokalne porowate struktury, co potencjalnie zwiększa przepuszczalność błony i ułatwia penetrację leków do wnętrza komórki. Mechanizmy te są niezwykle istotne, ponieważ przełamanie bariery błonowej może prowadzić do zwiększonej akumulacji antybiotyków i umożliwić skuteczniejsze zwalczanie opornych bakterii i grzybów.

Zrozumienie sposobu, w jaki saponiny integrują się z lipidami, zmieniają organizację dwuwarstwy i wpływają na mikrośrodowisko błony, ma kluczowe znaczenie zarówno w kontekście biologii podstawowej, jak i projektowania nowych terapii.

Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt.: „Interaction of surfactants of natural origin with phospholipid membranes” została przygotowana w języku angielskim i stanowi spójny tematycznie cykl pięciu oryginalnych prac eksperymentalnych, opublikowanych w latach 2023-2025 w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym posiadających współczynnik wpływu IF w zakresie 3,7-4,9 i znajdujących się w części A wykazu czasopism Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW). Sumaryczny IF dla zaprezentowanych prac wynosi 20,8, co odpowiada 450 pkt MNiSW.

P1. Adam Grzywaczyk, Wojciech Smutek, Agnieszka Zgoła-Grześkowiak, Ewa Kaczorek, Anna Zdziennicka, Bronisław Jańczuk Nanofiltered saponin-rich extract of *Saponaria officinalis* – Adsorption and aggregation properties of particular fractions. *Colloids and Surfaces A*:

- Physicochemical and Engineering Aspects 661 (2023) 130937 DOI: 10.1016/j.colsurfa.2023.130937. **IF: 4.9 MNiSW: 70**
- P2. Monika Rojewska, Wojciech Smulek, Adam Grzywaczyk, Ewa Kaczorek, Krystyna Prochaska Study of interactions between saponin biosurfactant and model biological membranes: Phospholipid monolayers and liposomes. *Molecules* 2023, 28, 1965. DOI: 0.3390/molecules28041965. **IF: 4.2 MNiSW: 140**
- P3. Adam Grzywaczyk Wojciech Smulek, Ewa Kaczorek *Saponaria officinalis* saponins as a factor increasing permeability of *Candida* yeasts' biomembrane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2024) 40:152. DOI: 10.1007/s11274-024-03961-9. **IF: 4.0 MNiSW: 70**
- P4. Adam Grzywaczyk, Monika Rojewska, Wojciech Smulek, Daniel A. McNaughton, Krystyna Prochaska, Philip A. Gale, Ewa Kaczorek *Glycyrrhiza glabra* L. saponins modulate the biophysical properties of bacterial model membranes and affect their interactions with tobramycin. *Langmuir* 2025, 41, 18, 11701–11710. DOI: 10.1021/acs.langmuir.5c00927. **IF: 3.7 MNiSW: 100**
- P5. Adam Grzywaczyk, Wojciech Smulek, Anna Olejnik, Urszula Guzik, Agnieszka Nowak, Ewa Kaczorek Co-interaction of nitrofurantoin antibiotics and the saponin-rich extract on gram-negative bacteria and colon epithelial cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2023) 39:221. DOI: 10.1007/s11274-023-03669-2. **IF: 4.0 MNiSW: 70**

W czterech publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, a w dwóch z nich także autorem korespondencyjnym. Na podstawie zamieszczonych oświadczeń współautorów, nie ma wątpliwości, że udział Doktoranta w ich powstanie był znaczący - uczestniczył w tworzeniu koncepcji badawczej, wykonaniu szeregu analiz i interpretacji uzyskanych wyników badań, a także redakcji manuskryptu.

Praca doktorska została przygotowana z dużą starannością w formie maszynopisu liczącego 181 stron, a jej struktura odpowiada standardom obowiązującym dla tego typu opracowań naukowych. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim wraz przeglądem najnowszej literatury naukowej, stanowiącym merytoryczne wprowadzenie do podjętej problematyki badawczej. Na podstawie krytycznej analizy dotychczasowego stanu wiedzy Doktorant sformułował hipotezę badawczą, która stanowi kompleksowe rozszerzenie istniejących doniesień naukowych w tym obszarze. Precyzyjnie określił cel główny rozprawy oraz cele szczegółowe. W pracy zamieszczono również wykaz publikacji naukowych składających się na osiągnięcia prezentowane w dysertacji. Po zwięzłym omówieniu najważniejszych wyników badań oraz ich interpretacji, przedstawiono wnioski końcowe, a także bogatą bibliografię obejmującą 132 pozycje literaturowe oraz wykaz osiągnięć naukowych Doktoranta. Integralną część rozprawy stanowią załączniki obejmujące kopie pięciu publikacji naukowych wraz z materiałami dodatkowymi oraz oświadczeniami współautorów dotyczącymi ich wkładu w przygotowanie manuskryptów. W pracy zamieszczono również informację o finansowaniu badań z Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu OPUS 20 (2020/39/B/NZ9/03196).

Ocena merytoryczna

Realizacja prac badawczych obejmowała cztery główne etapy: (1) otrzymywanie ekstraktów roślinnych, ich oczyszczanie oraz analizę składu poszczególnych frakcji, (2) ocenę interakcji saponin z jednowarstwami lipidowymi oraz pęcherzykami liposomalnymi jako modelami błon, (3) określenie wpływu ekstraktów na właściwości komórek drożdżowych i bakteryjnych, (4) analizę efektów współdziałania saponin z antybiotykami oraz ich wpływu na komórki ludzkie.

Przedmiotem badań zaprezentowanych w publikacji nr 1 było zbadanie właściwości powierzchniowo czynnych i zachowania agregacyjnego frakcji ekstraktów pozyskanych z korzenia mydlnicy lekarskiej *Saponaria officinalis*. Badania wykazały, że dwustopniowa filtracja membranowa pozwoliła uzyskać frakcję (0,5–3 kDa) o wysokiej zawartości saponin. Zdolność wytypowanej frakcji do obniżania napięcia powierzchniowego i formowania stabilnych agregatów wskazuje na jej potencjał jako naturalnego surfaktantu w szeregu zastosowań.

W publikacji 2, wykorzystując metody opracowane w artykule 1, zbadano interakcję ekstraktów bogatych w saponiny pozyskanych z korzenia lukrecji (*Glycyrrhiza glabra* L.) z uproszczonymi modelami błon biologicznych, wykorzystując zarówno systemy dwuwymiarowe (monowarstwa), jak i trójwymiarowe (liposomy). Badania wykazały, że saponiny integrują się z fosfolipidami, lokalizując się głównie w obszarze głów lipidowych i modyfikując właściwości biofizyczne błon, takie jak płynność i przepuszczalność, bez wywoływania jednoznacznego uszkodzenia komórek, a staranne frakcjonowanie ekstraktów zwiększa skuteczność i specyficzność tych zmian, które zależą również od zastosowanego modelu.

W publikacji nr 3 oceniono wpływ ekstraktów bogatych w saponiny z mydlnicy lekarskiej *Saponaria officinalis* na przepuszczalność błony komórkowej drożdży *Candida albicans* i *Candida krusei*, wykorzystując sferoplasty pozbawione ściany komórkowej jako modelu umożliwiającego bezpośrednią analizę oddziaływań na błonę biologiczną. Wykazano, że zarówno ekstrakt surowy, jak i oczyszczona frakcja o masie cząsteczkowej 0,5–3 kDa zwiększają przepuszczalność błon grzybów w sposób zależny od stężenia, przy czym frakcja wzbogacona w saponiny była efektywniejsza. Równocześnie zaobserwowano przesunięcia potencjału zeta w stronę bardziej ujemnych wartości, co wskazuje na silne oddziaływanie saponin z powierzchnią błony i potencjalne wiązanie ze sterolami. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają, że saponiny mogą modulować integralność i właściwości biofizyczne błony drożdży bez natychmiastowej lizy komórek, co sugeruje mechanizm działania istotny z punktu widzenia zastosowań terapeutycznych. Badanie stanowi pierwszy etap przełożenia obserwacji uzyskanych w modelowych układach błonowych na biologicznie istotny system i potwierdza potencjał saponin jako adiuwantów zwiększających skuteczność terapii przeciwgrzybiczej ukierunkowanej na błony.

Przedmiotem badań przedstawionych w kolejnej 4 publikacji było określenie, czy saponiny wyekstrahowane z korzenia lukrecji *Glycyrrhiza glabra* wpływają na parametry

fizykochemiczne modelowych błon bakteryjnych oraz zwiększają skuteczność wybranych antybiotyków. Wykorzystano tobramycynę jako lek wymagający pokonania bariery błonowej, analizując potencjalny efekt adiuwancyjny wynikający z obecności saponin. Badania na monowarstwach oraz liposomach wykazały, że saponiny wbudowują się w struktury lipidowe, zmniejszając ich sztywność i zwiększając płynność, przy jednoczesnym zachowaniu integralności błony. Obserwowane zmiany biofizyczne korelowały ze zmianą potencjału zeta i istotnym zwiększeniem elastyczności monowarstwy, co sugeruje korzystną modulację oddziaływań antybiotyk–błona. W połączeniu z tobramycyną efekt ten był bardziej wyraźny niż przy stosowaniu pojedynczych związków, wskazując na synergistyczny charakter interakcji. Wyniki potwierdzają, że saponiny mogą zwiększać dostępność antybiotyku do miejsca działania poprzez łagodne zaburzenie organizacji lipidów i poprawę przepuszczalności błony.

W publikacji 5 oceniono praktyczne znaczenie wcześniej opisanych interakcji saponin z błonami bakteryjnymi, analizując synergizm z antybiotykami nitrofuranowymi oraz bezpieczeństwo dla komórek ludzkich. Jako źródło biosurfaktantów zastosowano saponiny z *Sapindus mukorossi*, testując ich działanie adiuwantowe wobec bakterii Gram-ujemnych z rodzaju *Pseudomonas*, przy jednoczesnej ocenie cytotoksyczności względem ludzkich komórek nabłonka jelita grubego (CCD 841CoN). Połączenie saponin z nitrofurantoiną lub furazolidonem wykazało wyraźny efekt synergistyczny, co dowodzi zwiększenia skuteczności antybiotyków bez konieczności podnoszenia dawek. Równocześnie nie zaobserwowano istotnej cytotoksyczności wobec komórek ludzkich, co potwierdza selektywność działania i bezpieczeństwo proponowanego podejścia terapeutycznego. Uzyskane wyniki stanowią praktyczne potwierdzenie mechanizmu zorientowanego na błonę, wykazanego wcześniej w modelowych układach lipidowych.

Uzyskane wartościowe wyniki wskazują na dwa główne kierunki zastosowań: wykorzystanie saponin jako adiuwantów antybiotyków przy leczeniu zakażeń spowodowanych drobnoustrojami opornymi oraz ich potencjalne użycie jako funkcjonalnych składników nośników lipidowych w systemach kontrolowanego uwalniania leków. Badania dostarczają zatem cennych, eksperymentalnych podstaw do dalszego rozwoju innowacyjnych technologii terapeutycznych opartych na naturalnych surfaktantach.

Podczas czytania rozprawy doktorskiej nasunęły mi się następujące uwagi i pytania:

1/ Proszę o wyjaśnienie czym kierował się Pan wybierając roślinne źródła saponin i dlaczego w swoich badaniach nie skupił się Pan na jednej dobrze scharakteryzowanej roślinie, która stanowiłaby porównywalny materiał na wszystkich etapach badań.

2/ W publikacji 1 przedstawił Pan wyniki z jakościowej analizy chromatograficznej ekstraktów z mydlnicy lekarskiej, na podstawie której wytypowana została frakcja najbogatsza w saponiny. Na jakiej podstawie uznał Pan, że dla pozostałych dwóch materiałów roślinnych (korzeń lukrecji *Glycyrrhiza glabra* i orzechy piorące *Sapindus mukorossi*) będzie to ta sama frakcja bez wykonania analizy chromatograficznej?

3/ W mojej opinii zastosowane techniki chromatograficzne nie umożliwiają pełnego określenia składu ekstraktów, precyzyjna analiza jakościowa wymagałaby zastosowania

wysokorozdzielczej spektrometrii mas, pozwalającej na wyznaczenie mas cząsteczkowych z dużo większą dokładnością.

4/ Ekstrakcję saponin z materiałów roślinnych prowadził Pan przy użyciu aparatu Soxhleta, czy testował Pan wydajność tego procesu stosując alternatywne techniki ekstrakcyjne?

Podsumowując, prosiłabym Doktoranta o wyrażenie opinii, w którym kierunku należałoby poprowadzić dalsze badania by wykorzystać w pełni terapeutyczny potencjał saponin.

Przedstawione w recenzji pytania i spostrzeżenia mają charakter uzupełniający i dyskusyjny i nie obniżają wartości poznawczej oraz aplikacyjnej przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej, służą jedynie doskonaleniu warsztatu naukowego Doktoranta.

Posumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując analizę recenzowanej rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Adama Grzywaczyka stwierdzam, że Doktorant pełnił kluczową rolę w realizacji wszystkich doświadczeń i tworzeniu manuskryptów. Należy podkreślić, że tak kompleksowe podejście do realizacji założonego celu badawczego wymagało dużego zaangażowania i umiejętności dobrej organizacji warsztatu badawczego, co świadczy o dużej dojrzałości młodego Naukowca.

W mojej opinii, rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymogom Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) stawianym pracom doktorskim i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne o dopuszczenie Pana mgr inż. Adama Grzywaczyka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze interdyscyplinarny i nowatorski charakter badań dotyczących zastosowania naturalnych saponin jako adiuwantów zwiększających skuteczność antybiotyków poprzez ich zdolność do modulowania właściwości błon biologicznych, jak również znaczący wkład Doktoranta w realizację i opracowanie wartościowych wyników oraz wysoki potencjał aplikacyjny tych osiągnięć w obszarze rozwoju innowacyjnych technologii terapeutycznych opartych na naturalnych surfaktantach, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne o wyróżnienie niniejszej rozprawy w stosownym trybie.

Agnieszka Horkiewicz