



WARSZAWSKI  
UNIwersYTET  
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I FARMAKOGENOMIKI

dr hab. n. farm. Monika Ewa Czerwińska  
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki  
Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Wydział Farmaceutyczny  
Adres e-mail: [monika.czerwinska@wum.edu.pl](mailto:monika.czerwinska@wum.edu.pl)

Warszawa, 14.02.2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr farm. Anny Stasiłowicz-Krzemień**

**„Wielofunkcyjne układy dostarczania roślinnych związków aktywnych o działaniu neuroprotektoryjnym”**

**przedstawiona Kolegium Nauk Farmaceutycznych**

**Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr farm. Anny Stasiłowicz-Krzemień została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. farm. Judyty Cieleckiej-Piontek w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji i Biomateriałów Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Biodostępność związków nie tylko syntetycznych, ale również naturalnych jest kluczowym krokiem w zapewnieniu skuteczności terapeutycznej. Jednak wciąż sprawa przyswajalności wielu składników leków roślinnych czy żywności jest tematem dyskusji naukowej i problemem klinicznym. Na biodostępność, zwłaszcza po podaniu doustnym, wpływa wiele różnych czynników, m.in. efekt matrycy, transportery, struktury molekularne, enzymy metabolizujące czy rodzaj spożywanego pokarmu. Podstawowym sposobem poprawy skuteczności już na poziomie badań biologicznych czy skuteczności terapeutycznej w praktyce klinicznej jest zwiększenie biodostępności, co wydaje się być celem nadrzędnym w poszukiwaniu nowych leków i przygotowywaniu ich postaci farmaceutycznej. W związku z tym obecnie opracowywane i wdrażane są różne technologie poprawiające biodostępność ksenobiotyków. Niewątpliwie jest to istotnym zadaniem współczesnej farmacji. Do najbardziej znanych technologii farmaceutycznych można zaliczyć modyfikacje strukturalne poprzez tworzenie soli lub kokryształów, mikronizację, amorfizację, kompleksowanie, tworzenie liposomów, nanotechnologię i zastosowanie układów koloidalnych. Jednym z bardziej znanych przykładów modyfikacji substancji pochodzenia naturalnego jest diosmina, która w postaci mikronizowanej frakcji flawonoidowej jest obecnie najczęściej stosowana jako środek zmniejszający przepuszczalność oraz zwiększający napięcie ścian naczyń żylnych. Według systemu *Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation* (GRADE), którego celem jest unifikacja oceny różnic wynikających ze stosowania wielu systemów klasyfikacji dowodów i zaleceń klinicznych. Według tego systemu po przeprowadzeniu analizy aktywności

naczyniowej produktów leczniczych zawierających diosminę, mikronizowaną frakcję zaklasyfikowano do grupy 1B (silna rekomendacja dotycząca stosowania i umiarkowana skuteczność kliniczna), podczas gdy niezmodyfikowana diosmina została przypisana do kategorii 2C (słaba rekomendacja dotycząca stosowania i niska jakość dowodów klinicznych). W badaniach klinicznych stwierdzono, że zmniejszenie wielkości cząsteczek frakcji flawonowej z 20 do 2  $\mu\text{m}$  poprawia wchłanianie jelitowe diosminy. Z drugiej strony jako nośniki w produkcji farmaceutyków, szeroko stosowane także w przemyśle spożywczym, chemicznym czy kosmetycznym, są cyklodekstryny i ich pochodne. Należą one do związków łatwo rozpuszczalnych w wodzie i przyjmują kształt o hydrofobowym wnętrzu, dzięki czemu mogą tworzyć kompleksy inkluzyjne ze związkami hydrofobowymi. Tworzenie ich kompleksów z substancjami pochodzenia naturalnego wciąż nie jest powszechnie stosowaną praktyką, dlatego przedstawione w dysertacji zagadnienia wnoszą istotny wkład w rozwój technologii środków pochodzenia naturalnego.

Ze względu na różnorodność chemiczną związków występujących w substancjach roślinnych, a także różne mechanizmy wchłaniania hydrofilowych i lipofilowych związków bioaktywnych, poznanie i poprawa biodostępności fitofarmaceutyków jest wyzwaniem. Ich ograniczona rozpuszczalność sprawia trudności już na etapie badań podstawowych, m.in. w prowadzeniu eksperymentów w warunkach *in vitro*. Jednak co najbardziej istotne, ze względu na ograniczoną przepuszczalność bariery krew-mózg szczególne problemy farmakokinetyczne spotykane są w terapii chorób neurodegeneracyjnych. W związku z tym podjęta przez Panią mgr Annę Stasiłowicz-Krzemiń tematyka jest bardzo aktualna i realizuje współczesne kierunki badań substancji pochodzenia naturalnego mające na celu poprawę ich rozpuszczalności i biodostępności, zwiększenie aktywności biologicznej i skuteczności, a w konsekwencji możliwości zastosowania w terapii.

Obiektem badań Doktorantki były związki z klasy flawonoidów (naryngenina) i kwasów fenolowych/depsydów (kwas kawowy, kwas rozmarynowy) oraz ekstrakty zawierające kanabinoidy (kanabidiol, kwas kanabidiolowy, kanabichromen) czy prenylowane flawonoidy (ksantohumol) oraz kwasy  $\beta$ -goryczowe (lupulon). Pani Magister postawiła hipotezę, że przygotowane układy dostarczania związków pochodzenia roślinnego, a w szczególności polifenoli, otrzymane w efekcie stosowania metod mechanosyntezy zapewniają lepszą rozpuszczalność i przenikalność, a jednocześnie zwiększają aktywność neuroprotekcijną. Celem badawczym Doktorantki była poprawa rozpuszczalności oraz przenikalności związków pochodzenia roślinnego poprzez tworzenie kompleksów z różnego rodzaju nośnikami oraz ocena ich aktywności przeciwutleniającej i neuroprotekcyjnej w układach bezkomórkowych. Wiązało się to z realizacją celów szczegółowych, takich jak:

- 1) otrzymanie za pomocą mechanosyntezy układów dostarczania naryngeniny, kwasu rozmarynowego oraz kwasu kawowego z wykorzystaniem m.in.  $\beta$ -cyklodekstryny, hydroksypropylo-  $\alpha$ -,  $\beta$ - lub  $\gamma$ -cyklodekstryny, hydroksypropylometylocelulozy czy nośników metakrzemianu magnezu i glinu (Neusilin US2), kopolimeru winylopirolidonu/octanu winylu (Kollidon VA 64), kopolimeru kwasu metakrylowego i metakrylanu metylu (Eudragit L100),
- 2) ekstrakcja dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym ( $\text{scCO}_2$ ) szyszek chmielu,
- 3) badanie rozpuszczalności wytworzonych kompleksów w wodzie w zróżnicowanym pH środowiska,
- 4) badania spektroskopowe (w podczerwieni) czy chromatograficzne oraz badania z zakresu modelowania molekularnego czy dyfrakcji rentgenowskiej dla wybranych kompleksów,
- 5) badanie przepuszczalności wytworzonych kompleksów w warunkach *in vitro* za pomocą równoległego testu przepuszczalności sztucznej błony (PAMPA),
- 6) ocena działania przeciwutleniającego (ABTS, CUPRAC, FRAP, DPPH) oraz hamującego aktywność acetylocholinesterazy, butyrylocholinesterazy czy tyrozyminy,



7) porównanie składu i aktywności wyciągów scCO<sub>2</sub> z liści i kwiatostanów konopi.

Realizując powyższe zadania mgr Anna Stasiłowicz-Krzemień korzystała z szerokiego wachlarza metod badawczych – fizykochemicznych, biologicznych, bioinformatycznych. W związku z tym można zauważyć, że przedstawiony do recenzji projekt doktorski uwzględnia szereg złożonych etapów badawczych i reprezentuje wysoki poziom zróżnicowania warsztatu naukowego. Warto podkreślić, że Doktorantka podjęła się ambitnego zadania naukowego, ujęła je i rozwinęła w sposób wieloaspektowy. W pracy dają się zauważyć dwie ścieżki prowadzonych badań – jedna dotycząca kompleksowania wybranych związków fenolowych, a druga – badania składu, aktywności i preparatyki substancji roślinnych uzyskanych z *Cannabis sativa* czy *Humulus lupulus*.

Przedstawiona mi do oceny praca stanowi cykl siedmiu publikacji. Dysertacja łącznie z opisem aktywności naukowej mgr farm. Anny Stasiłowicz-Krzemień oraz oświadczeniami współautorów liczy 252 strony. W skład cyklu powiązanych tematycznie publikacji wchodzi 6 prac oryginalnych oraz jedna praca przeglądowa o łącznym wskaźniku oddziaływania *Impact Factor* 42,208 według *Journal Citation Reports* (JCR). Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 940. Tak wysokie wskaźniki numeryczne dla cyklu publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej należy z całym przekonaniem uznać za imponujące i raczej rzadko spotykane w rozprawach doktorskich. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wyniki badań przedstawionej do recenzji dysertacji zostały opublikowane w czasopismach, takich jak *International Journal of Molecular Sciences*, *Pharmaceutics*, *Antioxidants* ujętych w I kwartyle JCR (Q1). We wszystkich pracach włączonych do cyklu, stanowiącego podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora, Pani Stasiłowicz-Krzemień jest pierwszym autorem. We wszystkich publikacjach pełniła rolę autora wiodącego, a Jej udział polegał na współtworzeniu koncepcji prac i manuskryptów. W opisanych badaniach odpowiadała za przygotowywanie ekstraktów i układów dostarczania, badania szybkości rozpuszczania i przenikalności, a także wykonanie eksperymentów dotyczących oceny właściwości antyoksydacyjnych czy hamowania aktywności acetylocholinesterazy, butyrylocholinesterazy i tyrozynazy. Autorka przeprowadziła również badania chromatograficzne oraz analizę statystyczną. W związku z tym można stwierdzić, że większość zadań Doktorantka wykonała samodzielnie, bardzo dobrze opanowała warsztat pracy badawczej, co daje Jej dobre podstawy do planowania i wykonywania projektów w przyszłej pracy naukowej. Poza doktorskim cyklem publikacyjnym mgr Stasiłowicz-Krzemień jest współautorką 15 artykułów. Jak dotąd była wykonawcą w pięciu projektach o zasięgu krajowym, a w projekcie w ramach konkursu PRELUDIUM – finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki – pełni funkcję kierownika. Wyniki swoich badań prezentowała w postaci trzech wystąpień ustnych, a ponadto kilkanaście razy – w formie posterów. Należy podkreślić, że prezentacje te zyskały uznanie międzynarodowego gremium i zostały uhonorowane nagrodami konferencyjnymi.

We wstępie do dysertacji Doktorantka w sposób zwięzły opisała obecną sytuację dotyczącą rozwoju chorób neurodegeneracyjnych oraz potencjalnej, neuroprotektoryjnej roli polifenoli, a także przytoczyła system klasyfikacji biofarmaceutycznej substancji chemicznych. W dalszej części Autorka przedstawiła cel pracy oraz omówiła zagadnienia zawarte w publikacjach stanowiących podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora. Trzy publikacje (1, 6, 7) dotyczą przeglądu zastosowania *Cannabis sativa* oraz ekstrakcji metabolitów wtórnych za pomocą dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym, natomiast pozostałe dotyczą opracowania układów dostarczania naryngeniny (Publikacja 2), kwasu rozmarynowego (Publikacja 3) oraz kwasu kawowego (Publikacja 4). W Publikacji 5. Doktorantka za pomocą scCO<sub>2</sub> przygotowała wyciągi z szyszek chmielu, oceniła ich aktywność antyoksydacyjną oraz przygotowała układy z nośnikami – HP-β-CD i Neusilin US2. Zagadnienia omawiane w streszczeniach publikacji stanowią dobre uzasadnienie i wprowadzenie do publikacji, w których

szczegółowo opisana została część doświadczalna. Dobór stosowanych metod badawczych nie budzi zastrzeżeń. W badaniach potencjału antyoksydacyjnego Doktorantka zastosowała Trolox jako kontrolę pozytywną. Nie zauważyłam natomiast kontroli pozytywnych w modelu przepuszczalności PAMPA, choć zostały przytoczone dane teoretyczne odnośnie do zakresów przepuszczalności substancji chemicznych. Metodyka pracy została przedstawiona w sposób bardzo staranny i przejrzysty. Część wstępną przedstawionej dysertacji zamykają wnioski. Warto zwrócić uwagę, że dyskusje w załączonych do cyklu publikacjach są bardzo obszerne i w sposób wyczerpujący odnoszą się do aktualnej literatury w danym zakresie tematycznym. Liczba pozycji literaturowych w każdej z publikacji w cyklu jest znacząca. W ostatniej części dysertacji zostały zamieszczone oświadczenia wszystkich współautorów, potwierdzające wiodącą rolę mgr farm. Anny Stasiłowicz-Krzemiń.

Analizując wyniki pracy, które nie budzą moich jakichkolwiek zastrzeżeń, nasunęło mi się kilka pytań, które kieruję do Doktorantki.

Na jakiej podstawie dokonano wyboru związków, tj. naryngeniny, kwasu rozmarynowego oraz kwasu kawowego, do opracowania układów dostarczania? Dlaczego zdecydowano się na zbadanie związków z klasy flawonoidów, kwasów fenolowych i depsydów, a nie z innych grup fitochemicznych?

Jaki czynnik brano pod uwagę przy wyborze tak zróżnicowanych nośników do wytworzenia kompleksów dla poszczególnych związków, np. dla naryngeniny i kwasu rozmarynowego pochodne cyklodekstryny, a dla kwasu kawowego – metakrzemian magnezu i glinu, kopolimer winylopirolidonu/octanu winylu, kopolimer kwasu metakrylowego i metakrylanu metylu?

Jakie stężenia związków lub kompleksów stosowano do oceny przepuszczalności błonowej w modelu PAMPA? Czy zastosowane zostały substancje kontrolne?

Jako innowację technologiczną Doktorantka wskazała sprzężenie ekstrakcji  $\text{scCO}_2$  z ekstrakcją etanolem dla szyszek chmielu oraz zastosowanie jako nośnika kopolimeru glikolu polietylenowego, winylokaprolaktamu i octanu winylu (Soluplus®) do przygotowania układu dostarczania kanabinoidów z kwiatostanów konopi odmiany Henola. Czy w związku z tym dokonano zgłoszenia patentowego? Czy znane są Doktorantce aktualne zastrzeżenia patentowe dotyczące modyfikacji strukturalnych badanych w przedstawionej pracy roślinnych metabolitów wtórnych?

Jaki jest przewidywany wpływ procesów trawienia na zastosowane układy dostarczania i czy dotychczas badano wpływ flory bakteryjnej na stabilność opracowanych systemów?

Czy aktywność opracowanych systemów została zbadana na liniach komórkowych, czyli w warunkach, w których stosowane są media hodowlane? Czy przewidywany może być wzrost aktywności badanych związków tak jak obserwowano to w układach bezkomórkowych? Czy Doktorantka mogłaby się odnieść do potencjalnej cytotoksyczności takich kompleksów?

Podsumowując najważniejsze osiągnięcia recenzowanej pracy doktorskiej, należy wymienić rezultaty o największym, nowatorskim znaczeniu, takie jak:

- wytworzenie układów inkluzyjnych naryngeniny z 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryną, a kwasu rozmarynowego – z hydroksypropylo- $\gamma$ -cyklodekstryną;
- wytworzenie układu kwasu kawowego z metakrzemianem magnezu i glinu (Neusilin US2) w stosunku 1:3 o największej rozpuszczalności spośród badanych układów oraz wykrycie w tym systemie oddziaływań jonowych;
- wykazanie znacznej poprawy rozpuszczalności oraz właściwości biologicznych, zwłaszcza antyoksydacyjnych oraz hamujących aktywność tyrozynazy, acetylocholinesterazy czy butyrylocholinesterazy przez wytworzone kompleksy;
- opracowanie metody pozyskiwania związków z szyszek chmielu na drodze ekstrakcji dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym sprzężonej z ekstrakcją etanolem;

- przygotowanie systemu dostarczania kanabinoidów z kwiatostanów konopi odmiany Henola za pomocą nośnika kopolimeru glikolu polietylenowego, winylokaprolaktamu i octanu winylu (Soluplus®).

W związku z powyższym badania podjęte przez Panią mgr Stasiłowicz-Krzemień dostarczają oryginalnych informacji, które stanowią doskonałą podstawę do dalszych formułacji i obróbki technologicznej związków z grupy flawonoidów, kwasów fenolowych i kanabinoidów. Niewątpliwie mają one znaczny potencjał aplikacyjny i dostarczają materiał do przyszłych, obiecujących badań *in vitro* czy *in vivo*. W mojej opinii recenzowana praca oraz liczne kursy i szkolenia, które odbyła Doktorantka, potwierdzają, że jest Ona gotowa do samodzielnego planowania i prowadzenia projektów naukowych. Szeroki zakres metod i realizacja założonych, wielokierunkowych celów badawczych pozwala mi na przedstawienie pozytywnej opinii na temat rozprawy doktorskiej mgr Anny Stasiłowicz-Krzemień.

Przechodząc do wniosków końcowych stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca mgr Anny Stasiłowicz-Krzemień spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dn. 20.07.2018r. (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm., dział V, rozdział 1 i 2, art. 186, 187 pkt.1-4). Na tej podstawie wnioskuję do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr farm. Anny Stasiłowicz-Krzemień do dalszych etapów postępowania doktorskiego, rekomendując tym samym nadanie Pani mgr Annie Stasiłowicz-Krzemień stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Jednocześnie będąc przekonaną o wysokiej wartości naukowej przedstawionej dysertacji, jej wkładu w rozwój dyscypliny, a także uwzględniając całokształt dorobku naukowego Doktorantki, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr farm. Anny Stasiłowicz-Krzemień.

*Monika Czerwińska*

dr hab. n. farm. Monika Czerwińska  
Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki