



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

Warszawa 03.06.2025

Ocena rozprawy doktorskiej mgr farm. Kamila Wdowiaka

pt.: „*Amorficzne rozproszenia polifenoli stabilizowane polimerami jako droga do poprawy właściwości fizykochemicznych i biologicznych*”

Praca dotyczy aktualnego i istotnego zagadnienia z pogranicza farmacji i technologii postaci leku – poprawy rozpuszczalności oraz biodostępności biologicznie czynnych polifenoli roślinnych poprzez wytwarzanie ich amorficznych dyspersji stałych z udziałem nośników polimerowych. Polifenole są związkami o udokumentowanym korzystnym działaniu prozdrowotnym (m.in. działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, neuroprotektoryjne czy przeciwcukrzycowe), jednak ich praktyczne wykorzystanie terapeutyczne ogranicza bardzo słaba rozpuszczalność wielu z nich w wodzie, a co za tym idzie – niska biodostępność. W rozprawie podjęto próbę rozwiązania tego problemu poprzez amorfizację wybranych związków takich jak kurkumina, hesperetyna oraz piperyna i stabilizację otrzymanych form amorficznych za pomocą polimerów farmaceutycznych oraz innych dodatków pomocniczych. Dzięki temu możliwe jest zwiększenie rozpuszczalności takich związków i tym samym intensyfikacja ich działania biologicznego.

Praca ma charakter eksperymentalny i składa się z części literaturowej oraz obszernej części doświadczalnej. Rozprawę obejmuje wprowadzenie, przegląd literatury, cel i założenia badawcze, szczegółowy opis wyników badań własnych wraz z ich omówieniem na podstawie publikacji naukowych stanowiących podstawę oraz podsumowanie z wnioskami końcowymi. Całość rozprawy liczy 171 stron maszynopisu, zawiera szereg rycin w postaci wykresów i a bibliografia obejmuje NN pozycji, głównie najnowszych publikacji zagranicznych z ostatnich lat. Struktura pracy jest logiczna i typowa dla rozprawy naukowej – od przedstawienia problemu badawczego i stanu wiedzy, poprzez opis użytych metod, aż do wyników i ich analizy prowadzącej do sformułowania wniosków. Tytuł rozprawy jednoznacznie odzwierciedla jej treść, a układ treści świadczy o przemyślanym zaplanowaniu badań przez Doktoranta.



WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY
WUM

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 983
botanika@wum.edu.pl

Ocena merytoryczna rozprawy

Przegląd literatury zawarty w pierwszej części rozprawy jest napisany rzetelnie i stanowi solidne podstawy teoretyczne dla podjętych badań. Autor szczegółowo omawia charakterystykę polifenoli – ich występowanie, właściwości chemiczne oraz udokumentowane efekty farmakologiczne. Szczególny nacisk położono na te aspekty, które uzasadniają cel pracy, czyli na problem ich ograniczonej rozpuszczalności w wodzie i wynikające z tego trudności w osiągnięciu odpowiedniego stężenia terapeutycznego *in vivo*. W przeglądzie omówiono również dostępne metody poprawy rozpuszczalności substancji słabo rozpuszczalnych, ze szczególnym uwzględnieniem amorficznych dyspersji stałych (ASD) oraz różnych technik ich otrzymywania (m.in. mielenie mechaniczne, liofilizacja, suszenie rozpyłowe, wytłaczanie na gorąco – *hot-melt extrusion*). Autor prezentuje aktualny stan wiedzy na temat zastosowania polimerów jako nośników stabilizujących formy amorficzne substancji czynnych, a także przytacza przykłady literaturowe dotyczące amorfizacji polifenoli. Przegląd literatury jest obszerny (obejmuje najważniejsze prace z ostatnich lat, także z 2022–2024) i dowodzi, że Doktorant bardzo dobrze orientuje się w tematyce swojej rozprawy. Pozwala to czytelnikowi zrozumieć naukowe tło pracy i jasno wskazuje na lukę badawczą oraz potrzebę przeprowadzenia zaplanowanych badań.

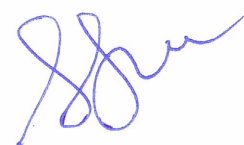
W zakończeniu części literaturowej sformułowano cel pracy oraz postawiono konkretne hipotezy badawcze. Celem rozprawy było opracowanie amorficznych układów polifenoli (wybranych przedstawicieli tej grupy, charakteryzujących się skrajnie niską rozpuszczalnością) z udziałem polimerowych substancji nośnikowych i dodatkowych komponentów stabilizujących, w celu zwiększenia ich rozpuszczalności i oceny wpływu takiej formy na właściwości fizykochemiczne (rozpuszczalność, szybkość uwalniania, trwałość) oraz potencjalne właściwości biologiczne (przepuszczalność przez bariery biologiczne, aktywność biologiczna *in vitro*). Sformułowane hipotezy zakładały m.in., że wytworzenie stałych dyspersji amorficznych wybranych polifenoli z odpowiednimi nośnikami pozwoli znacząco poprawić ich rozpuszczalność w wodzie i że poprzez odpowiedni dobór składników (polimerów, współsubstancji takich jak fosfolipidy czy środki pomocnicze) możliwe będzie uzyskanie stabilności amorficznej formy oraz potencjalnie zwiększenie przenikania tych związków przez bariery biologiczne. Cele i założenia badawcze zostały sformułowane jasno, są ambitne, a zarazem realne do osiągnięcia w ramach pracy doktorskiej.

Dobór metod badawczych świadczy o wysokich kompetencjach Doktoranta i znajomości nowoczesnych technik analitycznych stosowanych w badaniach nad postacią leku. Do otrzymywania amorficznych dyspersji polifenoli Pan Kamil Wdowiak zastosował przede wszystkim metodę wytłaczania na gorąco (HME, hotmelt extrusion), która pozwala na

jednoczesne stopienie i rozproszenie substancji czynnej w matrycy polimerowej. Istotnym elementem metodologicznym pracy jest zastosowanie metodologii Box-Behnken w celu optymalizacji składu i warunków procesu HME – takie podejście statystyczne do planowania eksperymentu jest stosunkowo rzadkie w pracach doktoranckich i zasługuje na uznanie, gdyż zwiększa wiarygodność i kompletność uzyskanych rezultatów. W badaniach wykorzystano nowoczesne techniki charakteryzacji otrzymanych układów: rentgenowską dyfraktometrię proszkową (XRPD) do potwierdzenia amorficzności otrzymanych dyspersji, różnicową kalorymetrię skaningową (DSC) do oceny temperatur przemian fazowych i ewentualnej mieszalności składników, oraz spektroskopię w podczerwieni (FTIR) do analizy potencjalnych oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy badanym związkiem a nośnikiem. Oceny właściwości fizykochemicznych układów dokonano poprzez pomiary rozpuszczalności i szybkości uwalniania substancji aktywnych z uzyskanych form stałych (testy rozpadu/uwalniania w warunkach *in vitro*). Co więcej, w celu zbadania potencjalnej poprawy dostępności biologicznej, Doktorant przeprowadził testy przepuszczalności przez modelowe bariery biologiczne z wykorzystaniem modelu PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay), symulującego przenikanie przez barierę jelitową (GIT) oraz barierę krew-mózg (BBB). Zastosowanie tak szerokiego wachlarza metod – od technik fizykochemicznych po modelowe badania biologiczne – jest mocną stroną rozprawy. Pozwala to na kompleksową ocenę otrzymanych układów amorficznych w kontekście zakładanych zastosowań farmaceutycznych.

Warto podkreślić, że Doktorant wybrał do badań reprezentatywne polifenole o różnej strukturze i aktywności, co zwiększa zakres oddziaływania wyników pracy. Przedmiotem badań uczyniono m.in. kurkuminę – polifenol o silnym potencjale przeciwzapalnym i przeciwnowotworowym, hesperetynę (aglikon hesperydyny o działaniu przeciwutleniającym i neuroprotekcyjnym) oraz piperynę – alkaloid z pieprzu czarnego (nie polifenol), znany z synergistycznego zwiększania biodostępności innych związków (np. kurkuminy). Polimery zastosowane jako nośniki to głównie poliwinylpirolidon (PVP K30) oraz dodatkowe komponenty, takie jak fosfolipidy (fosfatydylocholina) czy wybrane poliole (słodziki) pełniące rolę środków uplastyczniających. Tak przemyślany dobór zarówno substancji aktywnych, jak i nośników oraz dodatków, świadczy o dużej pomysłowości i wiedzy Doktoranta.

Wyniki badań zostały przedstawione przejrzyście. Autor konsekwentnie prowadzi czytelnika przez kolejne etapy eksperymentów i obserwacje. Na wstępie zaprezentowano wyniki badań nad zastosowaniem substancji pomocniczych obniżających temperaturę zeszklenia polimeru PVP K30, co miało ułatwić proces wytłaczania na gorąco w niższej temperaturze. Wykazano, że dodatek popularnych słodzików (erytrytol, ksylitol, sorbitol) może pełnić rolę



plastyfikatorów PVP – szczególnie erytrytol okazał się najbardziej efektywny w połączeniu z matrycą polimerową.

Następnie Doktorant przedstawił wyniki dotyczące otrzymania stałych dyspersji amorficznych kurkuminy i hesperetyny przy użyciu zoptymalizowanych warunków HME. Wykorzystanie wcześniej dobranej matrycy (erytrytolu) umożliwiło uzyskanie jednorodnych układów amorficznych zawierających stałą dawkę dwóch substancji aktywnych (kurkuminy i hesperetyny) w matrycy polimerowej. Analiza za pomocą XRPD i DSC jednoznacznie potwierdziła brak krystaliczności obu związków w otrzymanych dyspersjach, co świadczy o sukcesie procesu amorfizacji. Co więcej, badania stabilności przechowalniczej wykazały, że amorficzny stan kurkuminy i hesperetyny został utrzymany przez co najmniej 6 miesięcy, co dowodzi skuteczności zastosowanych polimerów i dodatków w stabilizacji formy bezpostaciowej.

Kolejnym ważnym segmentem wyników są eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem metody Box-Behnken, w których Doktorant zbadał wpływ ilości poszczególnych składników (udział polifenoli oraz fosfolipidu) oraz temperatury procesu na jakość i właściwości otrzymanych dyspersji amorficznych. Badania te dotyczyły również układów wieloskładnikowych – kurkuminy i hesperetyny rozproszonej wspólnie w mieszaninie PVP i fosfatydylocholiny. Zastosowanie fosfolipidu miało podwójny cel: dodatkową stabilizację formy amorficznej oraz potencjalną poprawę biogodności i przenikania substancji aktywnych. Wyniki optymalizacji wykazały, że zarówno stężenie polifenoli, jak i dodatek fosfolipidu istotnie wpływają na profil uwalniania i rozpuszczalność substancji czynnych z matrycy. Otrzymane dyspersje amorficzne cechowały się wysoce zwiększoną rozpuszczalnością kurkuminy i hesperetyny w medium wodnym (bufor fosforanowy pH 6,8) w porównaniu z surowymi, niezmodyfikowanymi związkami. Co istotne, zaobserwowano zróżnicowane profile uwalniania – np. w niektórych formulacjach uwalnianie kurkuminy zachodziło szybciej niż hesperetyny, co można było regulować składem matrycy. Świadczy to o możliwości dostosowania właściwości uwalniania do potrzeb terapeutycznych poprzez odpowiedni dobór nośników.

Badania przepuszczalności w modelu PAMPA przyniosły bardzo interesujące wyniki, wskazujące na zwiększenie przenikania zarówno kurkuminy, jak i hesperetyny z otrzymanych dyspersji w porównaniu z formą krystaliczną. Dotyczyło to zarówno modelu przewodu pokarmowego, jak i bariery krew-mózg. Szczególnie istotne jest, że w przypadku bariery krew-mózg zaobserwowano kilkukrotny wzrost przepuszczalności kurkuminy – co może mieć znaczenie w kontekście jej potencjalnego działania neuroprotektynowego. Wyniki te sugerują, że amorficzne rozproszenia polifenoli nie tylko poprawiają rozpuszczalność, ale mogą także

ułatwiać ich transport przez bariery biologiczne, zwiększając szansę na osiągnięcie efektu farmakologicznego w tkankach docelowych.

W rozprawie omówiono również przypadek amorficznej dyspersji innej pary związków – kurkuminy i piperyny. Wykazano, że dzięki wprowadzeniu obu tych substancji do jednej matrycy polimerowej uzyskano jednoczesną poprawę ich rozpuszczalności. Co więcej, piperyna (znana z działania zwiększającego biodostępność kurkuminy poprzez hamowanie jej metabolizmu) w połączeniu z kurkuminą w formie amorficznej może dodatkowo potęgować efekt synergistyczny. Otrzymany układ amorficzny kurkumina–piperyna charakteryzował się szybszym uwalnianiem i większą ilością rozpuszczonej substancji w medium niż porównywalne mieszaniny krystalicznych form tych związków.

Autor sugeruje, że takie połączenie mogłoby przełożyć się na wzmocnienie aktywności biologicznej (np. przeciwzapalnej) obu składników, co jednak wymagałoby dalszych badań *in vivo*. Niemniej już na etapie badań *in vitro* praca dostarcza przekonujących dowodów na korzyści płynące z zastosowania amorficznych form i łącznego podawania tych dwóch związków.

Analiza i dyskusja wyników przeprowadzona przez Autora jest wnikliwa i świadczy o jego dojrzałości naukowej. Doktorant skrupulatnie porównuje uzyskane dane z danymi literaturowymi, wyjaśnia zaobserwowane zjawiska odwołując się do teorii i wyników innych badaczy. Na przykład, wzrost rozpuszczalności polifenoli w matrycach polimerowych tłumaczy nie tylko brakiem krystaliczności, ale również możliwymi specyficznymi oddziaływaniami (wiązania wodorowe) między cząsteczkami polifenoli a nośnikiem, co znalazło potwierdzenie w przesunięciach charakterystycznych pasm w widmach FTIR. Również stabilność amorficznych form została dokładnie przedyskutowana – Autor wskazuje, że obecność drugiej substancji (czy to drugiego polifenolu, czy dodatku typu fosfolipid) może działać jako inhibitor krystalizacji, co jest zgodne z najnowszymi doniesieniami o tzw. układach ko-amorficznych.

Trzeba zaznaczyć, że Doktorant nie unika również krytycznej oceny swoich wyników. Wskazuje ograniczenia przeprowadzonych badań, np. fakt, że testy przepuszczalności PAMPA są modelem *in vitro* i nie odzwierciedlają w pełni złożoności procesów *in vivo*. Zasugerował jednak kierunki dalszych badań, w tym potrzebę weryfikacji uzyskanych rezultatów w badaniach biologicznych na liniach komórkowych lub modelach zwierzęcych. Takie podejście świadczy o dojrzałości naukowej i zrozumieniu, że praca doktorska stanowi pewien etap w rozwijaniu danego tematu, a nie ostateczne zamknięcie zagadnienia.

Podsumowując ocenę merytoryczną – rozprawa przedstawia oryginalne wyniki naukowe o istotnym znaczeniu dla nauk farmaceutycznych. Autor osiągnął założone cele badawcze w pełni. Praca wnosi nową wiedzę na temat formulacji polifenoli w postaci amorficznych dyspersji

stałych, demonstrując praktyczne rozwiązania (np. zastosowanie erytrytolu jako plastyfikatora, użycie matrycy polimerowofosfolipidowej) pozwalające pokonać ograniczenia biodostępności tych cennych związków. Nowatorski charakter badań potwierdza chociażby fakt, że część wyników została wyróżniona przez czasopisma naukowe (jedna z publikacji Doktoranta została opatrzona mianem “Editor’s Choice”), co dowodzi wysokiej jakości i oryginalności uzyskanych rezultatów.

Dorobek naukowy doktoranta

Ocena rozprawy doktorskiej nie może być pełna bez uwzględnienia aktywności naukowej i dorobku publikacyjnego jej Autora. Pan mgr Kamil Wdowiak w trakcie przygotowywania rozprawy wykazał się ponadprzeciętną aktywnością naukową, co znalazło odzwierciedlenie w liczbie i jakości opublikowanych prac. Jest współautorem co najmniej 4 publikacji naukowych, z których trzy stanowią bezpośrednią realizację tematyki rozprawy i zostały opublikowane w cenionych czasopismach międzynarodowych z listy JCR. Należą do nich m.in.:

- artykuł badawczy pt. „Hot-Melt Extrusion as an Effective Technique for Obtaining an Amorphous System of Curcumin and Piperine with Improved Properties Essential for Their Better Biological Activities” opublikowany w czasopiśmie *Molecules* (2023, vol. 28, 3848),
- artykuł pt. „Sweeteners Show a Plasticizing Effect on PVP K30 – A Solution for the Hot-Melt Extrusion of Fixed-Dose Amorphous Curcumin-Hesperetin Solid Dispersions” opublikowany w *Pharmaceutics* (2024, 16(5), 659) – wyróżniony jako “Editor’s Choice Article”,
- najnowsza praca pt. „Application of the Box-Behnken Design in the Development of Amorphous PVP K30-Phosphatidylcholine Dispersions for the Co-Delivery of Curcumin and Hesperetin Prepared by Hot-Melt Extrusion” opublikowana w *Pharmaceutics* (2024, vol. 17(1), 26).

Ponadto Doktorant jest pierwszym autorem pracy przeglądowej na temat biodostępności hesperydyny i hesperetyny (opublikowanej w *Nutrients* w 2022 roku), co pokazuje, że już na wczesnym etapie studiów doktoranckich aktywnie uczestniczył w działalności naukowej, podsumowując aktualny stan wiedzy w zakresie swojej specjalizacji. Należy podkreślić, że we wszystkich wymienionych pracach Pan Wdowiak występuje jako pierwszy autor, co świadczy o jego wiodącym wkładzie w planowanie i realizację badań oraz opracowanie wyników. Sumaryczny dorobek publikacyjny Doktoranta jest imponujący – publikacje ukazały się w czasopismach o wysokim prestiżu i impact factor, łączna liczba punktów MNiSW/MEiN za te



artykuły znacznie przekracza minimalne wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wyniki badań były też prezentowane na konferencjach naukowych (krajowych i międzynarodowych), gdzie spotkały się z zainteresowaniem środowiska naukowego, o czym świadczą uzyskane nagrody i wyróżnienia (np. wyróżnienie pracy w *Pharmaceutics*).

Tak bogaty dorobek w trakcie przygotowywania rozprawy dowodzi dużego zaangażowania Doktoranta, umiejętności pracy w zespole badawczym (współpraca m.in. z ośrodkami zagranicznymi, jak Trinity College Dublin), a także wysokich kompetencji merytorycznych. Jest to dorobek zdecydowanie wybijający się ponad przeciętny poziom doktorantów na podobnym etapie kariery i stanowi dodatkowy argument przemawiający za wyróżnieniem rozprawy.

Niemniej, w trakcie analizy przedłożonej rozprawy pojawiły się pewne kwestie wymagające doprecyzowania. Proszę, aby Doktorantka odniosła się do nich w czasie publicznej obrony pracy doktorskiej.

1. W rozprawie jako jeden ze związków modelowych wybrano piperynę. Nie jest to związek z grupy polifenoli a wymienianie go na równi z pozostałymi dwoma może wprowadzać czytelnika w błąd.
2. Czy w dalszych lub innych pracach niewchodzących w skład rozprawy doktorant potwierdził możliwość zastosowania swojej koncepcji do innych związków pochodzenia naturalnego?
3. Czy doktorant sądzi, że podawanie doustne badanych polifenoli umieszczonych w nośniku polimerowym może wpływać np.: ograniczać metabolizm tych związków w przewodzie pokarmowym?
4. Czy planowana jest komercjalizacja wyników badań zawartych w rozprawie?

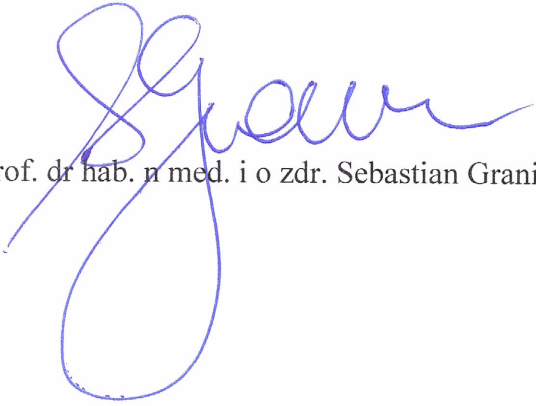
Podsumowanie i wnioski

Rozprawa doktorska mgr farm. Kamila Wdowiaka pt. *„Amorficzne rozproszenia polifenoli stabilizowane polimerami jako droga do poprawy właściwości fizykochemicznych i biologicznych”* stanowi oryginalne rozwiązanie ważnego problemu naukowego z dziedziny nauk farmaceutycznych, spełniając tym samym wszystkie kryteria stawiane przez **Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce art. 187** oraz odpowiednie akty wykonawcze w zakresie nadawania stopni naukowych. Praca dowodzi, że Autor posiada wszechstronną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie farmacja, a także wysokie umiejętności planowania i prowadzenia badań naukowych. Wykazane w rozprawie wyniki cechują się **wysoką wartością naukową**, nowatorskim podejściem metodologicznym oraz potencjałem aplikacyjnym (możliwość wykorzystania uzyskanych formułacji w projektowaniu nowych leków lub

suplementów diety o lepszej biodostępności). Na podstawie przeprowadzonej oceny stwierdzam, że **rozprawa w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim** i jednoznacznie potwierdza posiadanie przez Pana Kamila Wdowiaka umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Mając na uwadze powyższe, w pełni **popieram nadanie mgr. Kamilowi Wdowiakowi stopnia naukowego doktora**. Co więcej, uważam, że rozprawa wyróżnia się pod wieloma względami na tle innych prac doktorskich. Kryteria nadania wyróżnienia rozprawy doktorskiej (takie jak: **wybitny poziom merytoryczny pracy, nowość i oryginalność uzyskanych wyników, znaczenie praktyczne wyników oraz ponadprzeciętny dorobek publikacyjny doktoranta**) są w tym przypadku spełnione. Praca przynosi istotny wkład do rozwoju wiedzy w zakresie formulacji farmaceutycznych polifenoli, przedstawia nowatorskie rozwiązania potwierdzone w światowej literaturze (własne publikacje autora), a jej wyniki mają potencjalne przełożenie na poprawę terapii z wykorzystaniem naturalnych związków czynnych. Również aktywność naukowa Doktoranta oraz wysoka jakość publikacji wynikających z rozprawy znacząco przekraczają typowe oczekiwania.

W świetle powyższych argumentów, **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej** Pana mgra farm. Kamila Wdowiaka. Uważam, że poziom i osiągnięcia zaprezentowane w niniejszej pracy w pełni na to zasługują, dając znakomite świadectwo kompetencji naukowych Doktoranta i stanowiąc wzorcowy przykład rozprawy doktorskiej o wyjątkowych walorach.



prof. dr hab. n med. i o zdr. Sebastian Granica