



**Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych
Katedra Farmakognozji i Botaniki Farmaceutycznej
UNIwersytet Medyczny w Lublinie**

ul. Chodźki 1, 20-093 LUBLIN

tel.: +48 81448 7080; e-mail: agnieszka.ludwiczuk@umlub.pl

Lublin, 3.06.2025

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne mgr farm. Kamila Wdowiaka zatytułowanej „**Amorficzne rozproszenia polifenoli stabilizowane polimerami jako droga do poprawy właściwości fizykochemicznych i biologicznych**” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Judyty Cieleckiej-Piontek w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji i Biomateriałów Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Ocena formalna. Na rozprawę doktorską mgr farm. Kamila Wdowiaka składa się spójny tematycznie cykl pięciu publikacji o łącznym IF 23.8, które ukazały się w latach 2023-2025 w czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu. Są to następujące prace:

1. Wdowiak K., Miklaszewski A., Pietrzak R., Cielecka-Piontek J.: Amorphous system of hesperetin and piperine – improvement of apparent solubility, permeability, and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, **2023**, 24(5): 4859
2. Wdowiak K., Pietrzak R., Tykarska E., Cielecka-Piontek J.: 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. *Molecules*, **2023**, 28(9): 3848
3. Wdowiak K., Tajber L., Miklaszewski A., Cielecka-Piontek J.: Sweeteners show a plasticizing effect on PVP K30 – a solution for the hot-melt extrusion of Badania przeprowadzone w ramach publikacji 3 wskazywają, że amorficzne kurkumina-hesperetyna solid dispersions. *Pharmaceutics*, **2024**, 16(5): 659
4. Wdowiak K., Miklaszewski A., Cielecka-Piontek J.: Amorphous polymer-phospholipid solid dispersions for the co-delivery of curcumin and piperine prepared via hot-melt extrusion. *Pharmaceutics*, **2024**, 16(8): 999

5. Wdowiak K., Tajber L., Miklaszewski A., Cielecka-Piontek J.: Application of the box-behnen design in the development of amorphous PVP K30 – phosphatidylcholine dispersions for the co-delivery of curcumin and hesperetin prepared by hot-melt extrusion. *Pharmaceutics*, **2025**, 17(1): 26

Rozprawa doktorska została zrealizowana ze wsparciem finansowym Narodowego Centrum Nauki, w ramach grantu OPUS UMO-2020/37/B/NZ7/03975 pt. „Ko-amorficzne układy polifenoli”.

Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich publikacji, a z załączonej dokumentacji wynika, że jego wkład w powstanie tych prac był znaczący. Jego zaangażowanie w badania naukowe, jak i powstanie publikacji, odnoszą się zarówno do etapów koncepcyjnych i projektowania badań, ale także do analizy i interpretacji otrzymanych wyników oraz finalnie do pisanie publikacji.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Kamila Wdowiaka ma charakter krótkiego omówienia naukowego ww. artykułów oraz podsumowania wyników. Całość rozpoczyna wstęp teoretyczny, który uzasadnia wybór tematyki podjętych badań. W części tej Doktorant opisuje polifenole, grupę metabolitów roślinnych o bardzo ciekawych właściwościach leczniczych, których stosowanie w praktyce klinicznej napotyka na pewne ograniczenia. Jednym z głównych wyzwań jest ich niska biodostępność wynikająca ze słabej rozpuszczalności tych związków. Wspomniane ograniczenia wymagają zastosowania pewnych rozwiązań np. tworzenia amorficznych stałych rozproszenia, w których substancja bądź substancje lecznicze znajdują się w stanie molekularnego rozproszenia w nośniku. Doktorant skrupulatnie opisuje tę formę produktów leczniczych. Następnie przedstawiony jest jasno sformułowany cel pracy oraz opis zadań, jakie doprowadziły do realizacji postawionego sobie celu. W dalszej części omówione są wyniki badań z podziałem na prace wchodzące w skład dysertacji. Następny rozdział to podsumowanie otrzymanych wyników oraz wnioski. Integralną częścią pracy są streszczenia i słowa kluczowe w języku polskim i angielskim oraz publikacje wchodzące w skład dysertacji wraz z oświadczeniami poszczególnych współautorów. Pracę dokorską uzupełnia bibliografia oraz opis dotychczasowej aktywności naukowej Doktoranta.

Z formalnego punktu widzenia rozprawa jest kompletna, jej treść jest poprawnie opracowana redakcyjnie, a całość spełnia wszystkie wymagania wstępne dla rozpraw kandydatów ubiegających się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk farmaceutycznych.

Ocena merytoryczna. Poprawa rozpuszczalności substancji leczniczych jest jednym z wiodących tematów prac badawczo-rozwojowych. Szacuje się, że 70% substancji stosowanych w leczeniu oraz kandydatów na leki jest trudno rozpuszczalnych. Substancje te charakteryzuje zwykle mała i zmienna dostępność biologiczna, która może prowadzić do

zmniejszenia ich skuteczności terapeutycznej. Do takich substancji należy również wiele związków pochodzenia naturalnego, w tym polifenole, które znalazły się w kręgu zainteresowań naukowych mgr Kamila Wdowiaka. Zjawisko ograniczonej biodostępności substancji leczniczych skłania do poszukiwania efektywnych sposobów poprawiających rozpuszczalność związków biologicznie aktywnych. Do metod zapewniających poprawę dostępności farmaceutycznej substancji leczniczych zalicza się m.in. amorfizację substancji leczniczej, a także tworzenie układów z nośnikami, w tym stałych rozproszeń.

Te właśnie stałe rozproszeń a dokładnie charakterystyka amorficznych stałych rozproszeń polimerowych i polimerowo-fosfolipidowych wybranych polifenoli stały się celem ocenianej pracy doktorskiej. Doktorant wybrał dwa związki polifenolowe, hesperetynę należącą do związków flawonoidowych oraz kurkuminę z grupy diarylheptanoidów. Dodatkowo do układów wprowadzono piperynę, alkaloid pochodzenia roślinnego, znany z tego, że wzmacnia przyswajalność i biodostępność innych substancji. Hipoteza badawcza postawiona przez Doktoranta zakładała, że przygotowanie amorficznych stałych rozproszeń wymienionych związków polifenolowych przełoży się na poprawę ich właściwości biofarmaceutycznych i biologicznych.

By osiągnąć założony cel Doktorant otrzymał amorficzne stałe rozproszeń polimerowe oraz polimerowo-fosfolipidowe wykorzystując układy typu fixed-dose, czyli hesperetyna-piperyna, kurkumina-piperyna oraz kurkumina-hesperetyna. Następnie przeprowadzono charakterystykę przygotowanych układów w oparciu o następujące metody: rentgenowską dyfrakcję proszkową (XRPD), spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) oraz różnicową kalorymetrię skaningową (DSC). W dalszej kolejności dokonano oceny właściwości biofarmaceutycznych, czyli szybkości rozpuszczania, rozpuszczalności oraz przenikalności przez błony biologiczne, a następnie aktywności biologicznej koncentrując się na właściwościach przeciwutleniających i zdolności hamowania aktywności enzymu butyrylocholinoesterazy.

W publikacji pierwszej (Wdowiak *et al.*, *IJMS* 2023, 24: 4859) i drugiej (Wdowiak *et al.*, *Molecules* 2023, 28: 3848) przygotowano układy amorficzne hesperetyny i piperyny oraz kurkuminy i piperyny z nośnikiem polimerowym, jakim był PVP VA64. W pierwszym przypadku amorfizacja przebiegała przy użyciu mielenia kulowego, natomiast w drugim użyto wytłaczania (ekstruzji) na gorąco. Systemy przygotowano w różnych stosunkach masowych substancji aktywnych do nośnika. Bazując na wynikach z analiz XRPD, DSC oraz FT-IR należy stwierdzić, że obie metody odniosły pozytywny skutek, a więc potwierdzono amorficzny charakter otrzymanych materiałów wskazując na zmieszanie się składników na poziomie molekularnym. Przygotowując amorficzne stałe rozproszczenia należy brać pod ich uwagę stabilność fizyczną. Układy przechowywano przez okres sześciu miesięcy w różnych warunkach: (i) w temperaturze otoczenia (25°C) bez kontroli wilgotności oraz (ii) w podwyższonej temperaturze (50°C) bez kontroli wilgotności. Badanie XRPD wykonane

po tym czasie nie wykazało obecności fazy krystalicznej, co oznacza, że układy zachowały stabilność fizyczną. W kolejnym etapie badań skoncentrowano się na charakterystyce biofarmaceutycznej układów. Profile rozpuszczania dla obu substancji wykazały wzrost pozornej rozpuszczalności w porównaniu do krystalicznych związków, wskazując na uzyskanie stanu przesylenia. Układy amorficzne osiągnęły stan plateau po około godzinie, który utrzymywał się na stałym poziomie przez cały czas trwania badania, czyli 6 godzin. W przypadku wszystkich układów amorficznych najkorzystniejszy profil rozpuszczania uzyskano dla układu hesperetyna/kurkumina-piperyna-PVP VA64 w stosunku masowym 1:1:16. Analiza przenikalności symulująca warunki jelitowe (PAMPA GIT) oraz barierę krew-mózg (PAMPA BBB) wykazała, że badane związki mają dobrą zdolność do przenikania przez wymienione bariery biologiczne na zasadzie dyfuzji biernej, co ustalono na podstawie obliczonego pozornego współczynnika przenikalności. Następnie przeprowadzono badanie aktywności biologicznej, które koncentrowało się na właściwościach antyoksydacyjnych i neuroprotektoryjnych badanych układów. Wykazano, że proces amorfizacji, a w konsekwencji poprawiona rozpuszczalność, miały korzystny wpływ na aktywność biologiczną.

W publikacji trzeciej (Wdowiak *et al.*, *Pharmaceutics* 2024, 16: 659) skupiono się na wytwarzaniu amorficznych układów zawierających kurkuminę i hesperetynę rozproszonych w matrycy polimerowej. Tym razem, użyto jednak poliwinylpirolidonu K30 (PVP K30) a nie jak w przypadku poprzednich prac Kallidonu VA64 (PVP VA64). W omówieniu wyników swoich badań Doktorant argumentuje wybór PVP K30 przeglądem literatury, który sugeruje ten polimer, jako najlepszy do opracowywania układów dostarczania kurkuminy, zapewniającego największą poprawę rozpuszczalności. Z racji tego, że amorfizacja miała przebiegać przy zastosowaniu ekstruzji na gorąco okazało się, że proces ten należałoby przeprowadzić w bardzo wysokiej temperaturze (min. 190°C), co stwarzało ryzyko częściowej degradacji związków. Celem obniżenia temperatury zdecydowano o użyciu plastyfikatora, wykorzystując do tego celu alkohole cukrowe: erytrytol, sorbitol i ksylitol. Finalnie przygotowano układy czteroskładnikowe (polimer-plastyfikator-kurkumina-hesperetyna) w dwóch różnych stosunkach masowych w stosunku do polifenoli, 30 i 15% (stosunek kurkuminy do hesperetyny, 1:1 w/w). Z przeprowadzonych badań stabilności fizycznej wynika, że układy zachowały amorficzność w trakcie sześciomiesięcznego badania. Wykazano, że alkohole cukrowe (erytrytol, ksylitol i sorbitol) wykazują efekt plastyfikujący na PVP K30, pozwalając na wykorzystanie go w ekstruzji na gorąco znacznie poniżej jego pierwotnego T_g. Najskuteczniejszym plastyfikatorem okazał się erytrytol pomimo wcześniejszych doniesień, że ten słodzik ma dużą tendencję do rekrystalizacji. Wynik ten wskazuje, że dobór odpowiedniego polimeru (w tym przypadku PVP K30) może prowadzić do uniemożliwienia rekrystalizacji związkom o słabej zdolności do tworzenia fazy amorficznej.

Uzyskane, w ramach tych badań, amorficzne układy łączące kurkuminę i hesperetynę w rozproszeniu fixed-dose, charakteryzowały się lepszymi właściwościami

biofarmaceutycznymi w porównaniu do związków w formie krystalicznej. Wyniki te mogą posłużyć do opracowania formulacji o zwiększonej biodostępności, bazującego na połączeniu kurkuminy i hesperetyny, wykazującego obiecujące właściwości neuroprotekcynie i przeciwstarzeniowe.

W publikacji czwartej (Wdowiak *et al.*, *Pharmaceutics* 2024, 16: 999) oraz piątej (Wdowiak *et al.*, *Pharmaceutics* 2025, 17: 26) opracowano stałe rozproszeń substancji leczniczych w matrycach polimerowo-fosfolipidowych metodą ekstruzji na gorąco. Matryce polimerowo-fosfolipidowe są jednym z innowacyjnych systemów dostarczania związków aktywnych. W takim układzie dostarczania polimer odpowiada za stabilność formy amorficznej w fazie stałej, a po rozpuszczeniu hamuje proces zarodkowania i krystalizacji związku aktywnego przyczyniając się do utrzymania stanu przesycenia. Z kolei fosfolipidy, ze względu na swoje amfifilowe właściwości, mogą oddziaływać w roztworze z cząsteczkami słabo rozpuszczalnego, a więc wykazującego właściwości hydrofobowe związku aktywnego, enkapsulując je. Tworzące się spontanicznie w roztworze wodnym micle, będą ograniczać możliwość rekrytalizacji substancji czynnej, stabilizując stan przesycenia. Pomimo połączenia dwóch uzupełniających się mechanizmów poprawy biodostępności, produkcja rozproszeń z wykorzystaniem fosfolipidów jest wymagająca ze względu na duże ryzyko otrzymywania układów o lipidowej (tłustej) teksturze. Takim układom, z powodu ich znacznej lepkości, brakuje wymaganej do procesów technologicznych sypkości. Dodatkowo układy lipidowe mają tendencję do agregacji i aglomeracji, co niekorzystnie wpływa na rozpuszczanie i wchłanianie substancji czynnych. W ramach badań zaproponowano zastosowanie fosfolipidu jako dodatku do polimeru, co poprawiło właściwości technologiczne fosfolipidów. W publikacji czwartej opracowanie mieszanki polimer-fosfolipid o pożądanej wytlaczalności rozpoczęto od ustalenia efektu plastyfikującego fosfolipidu na polimer PVP K25 (Kollidon K25), zaś w publikacji piątej na polimer PVP K30. Uzyskany efekt, w przypadku obu polimerów, był niestety niewystarczający, dlatego zdecydowano o wprowadzeniu dodatkowej substancji pomocniczej działającej jako plastyfikator i był nią ksylitol. Ustalono końcowy skład mieszanki polimer-fosfolipid-plastyfikator i w drugim etapie badań skupiono się na wytworzeniu i charakterystyce układów kurkumina-piperyna oraz kurkumina-hesperetyna. Wykazano, że opracowane rozproszenia zapewniają poprawę rozpuszczalności i przenikalności. Obserwowany korzystny wpływ na właściwości biofarmaceutyczne rozproszeń jest związany z konwersją związków roślinnych do stanu amorficznego, który wygenerował stan przesycenia. Forma amorficzna i spontaniczne tworzenie się struktur supramolekularnych, które otaczają cząsteczki związków, mogą być odpowiedzialne za zwiększoną rozpuszczalność. Ponadto wzrost rozpuszczalności jest związany z obecnością fosfolipidu działającego jako solubilizator i stabilizator stanu amorficznego. Model DoE (Design of Experiment), zastosowany w publikacji piątej wykazał, że statystycznie istotnymi czynnikami wpływającymi na rozpuszczalność badanych polifenoli są: ilość analizowanych związków roślinnych i ilość fosfatydylocholiney w nośniku. Czynniki te

mają negatywny wpływ, co oznacza, że mniejsza zawartość badanych związków roślinnych lub fosfatydylocholiny prowadzi do większego wzrostu rozpuszczalności.

Do najważniejszych walorów recenzowanej rozprawy należą:

- zaproponowanie technologii otrzymywania matryc polimerowo-fosfolipidowych, stanowiących innowacyjny system dostarczania związków trudno rozpuszczalnych, za pomocą łatwo skalowalnego procesu ekstruzji na gorąco,
- zaprojektowanie nośnika o pożądanych właściwościach termicznych poprzez zmodyfikowanie poliwinylpirolidonu K30 (PVP K30) z wykorzystaniem alkoholi cukrowych. Ta modyfikacja pozwala na zastosowanie tego polimeru w procesie ekstruzji na gorąco w szerokim zakresie temperatur,
- opracowanie i otrzymanie amorficznych stałych rozproszeń polimerowych i polimerowo-fosfolipidowych wybranych trudno rozpuszczalnych polifenoli wykorzystując układy typu fixed-dose. Rozproszenia te zapewniają poprawę rozpuszczalności, szybkości rozpuszczania i przenikalności w warunkach symulujących ściany układu pokarmowego i barierę krew-mózg (model PAMPA).
- sposób zaplanowania eksperymentów, właściwy dobór metod badawczych oraz interpretacja uzyskanych wyników połączona z wnikliwą i rzeczową analizą, co świadczy o wysokich kompetencjach naukowo-badawczych Doktoranta i są dowodem Jego przygotowania merytorycznego do prowadzenia badań naukowych,
- dużą przejrzystość pracy i uporządkowany wywód naukowy.

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, całość przygotowanej rozprawy oceniam bardzo wysoko, zarówno pod względem tematycznym, merytorycznym (poziomu naukowego, planowania i realizacji eksperymentów, elementów nowości naukowej, interpretacji wyników), jak i edytorskim. Nie mniej jednak wypada także zwrócić uwagę na te aspekty rozprawy, które budzą pytania bądź wymagają dodatkowego komentarza:

- Do przygotowania układów amorficznych wybranych do badań metabolitów roślinnych zastosowano różne nośniki polimerowe. Były to PVP VA64 (publikacje 1 i 2), PVP K30 (publikacje 3 i 5) oraz PVP K25 (publikacja 4). Jak pisze Doktorant: „*Rolą polimeru w amorficznym stałym rozproszeniu jest zapewnienie stabilności fizycznej postaci amorficznej w fazie stałej poprzez zmniejszenie ruchliwości molekularnej oraz zapewnienie utrzymania stanu przesylenia w czasie rozpuszczania*”. Nasuwa się więc pytanie, który z polimerów był najlepszy pod kątem zapewnienia najlepszej biodostępności otrzymanych układów, a który pod kątem technologii otrzymywania?
- W przypadku polimerów PVP K30 oraz PVP K25 niezbędne było użycie plastyfikatorów. Wykorzystano do tego celu alkohole cukrowe: erytrytol, ksylitol i sorbitol. Badania przeprowadzone w ramach publikacji 3 wykazały, że erytrytol

okazał się być najskuteczniejszym plastyfikatorem, a zdolność plastyfikacyjna słodzików na PVP K30 wzrastała w kolejności sorbitol < ksylitol < erytrytol, co można wyjaśnić wartościami Tg amorficznych form słodzików. Nie mniej jednak w badaniach opisanych w publikacjach 4 i 5 użyto ksylitolu. Dlaczego?

Powyższe uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam wysoko. Recenzowana rozprawa doktorska zasługuje na szczególne uznanie, świadczy o doskonałym przygotowaniu merytorycznym, jak i ogromnej biegłości warsztatowej Doktoranta. Pan mgr Kamil Wdowiak skutecznie opanował umiejętność planowania, a następnie sukcesywnej realizacji badań naukowych. Podjęty przez Doktoranta temat badawczy uważam za uzasadniony i niezwykle ważny z punktu widzenia metodologicznego i aplikacyjnego.

Wnioski końcowe

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr Kamila Wdowiaka stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789 ze zm.), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.).

W związku z powyższym, wnoszę do Rady Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie rozprawy mgr Kamila Wdowiaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny recenzowanej rozprawy i jej wkład w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych, oryginalność i wartość naukową przeprowadzonych badań, oraz bogaty dorobek naukowy Doktoranta (łączna liczba publikacji 10 o łącznym współczynniku wpływu IF 51,042 i 1240 punktów MNiSW) wnioskuję o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Kamila Wdowiaka**. Wniosek o wyróżnienie uzasadniam szerokim zakresem i pracowitością przeprowadzonych badań, interdyscyplinarnym podejściem badawczym, oryginalnością otrzymanych wyników, nowatorską metodyką oraz walorami nowości.

A. Ludwiczuk

KIEROWNIK
Zakładu Farmakognozji
z Ogrodem Roślin Leczniczych,
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

dr hab. Agnieszka Ludwiczuk,
Profesor uczelni