



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. Irma Podolak
Katedra i Zakład Farmakognozji

Kraków, 28. 05. 2024

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Natalii Rosiak

pt.

„Amorficzne dyspersje polifenoli”

Uwagi dotyczące strony formalnej i układu rozprawy

Pani mgr inż. Natalia Rosiak jest zatrudniona na stanowisku naukowo-technicznym w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji i Biomateriałów Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Badania wchodzące w skład pracy doktorskiej zrealizowała w macierzystej jednostce, pod opieką naukową Promotora, prof. dr hab. n. farm. Judyty Cieleckiej-Piontek oraz Promotora interdyscyplinarnego, prof. dr hab. n. farm. Ewy Tykarskiej. Warto podkreślić, że badania te były finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu OPUS (UMO-2020/37/B/NZ7/03975).

Rozprawa, zgodnie z zapisem ustawy, została przygotowana jako zbiór artykułów naukowych. Jest to pięć prac oryginalnych, których łączny współczynnik oddziaływania (IF) wynosi 26,8, a punktacja MNiSW: 700. Mgr inż. Natalia Rosiak jest pierwszą autorką tych publikacji. Oświadczenia pozostałych współautorów w sposób jednoznaczny potwierdzają Jej znaczący indywidualny udział i wiodącą rolę w ich tworzeniu, natomiast zamieszczone kopie wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim, pozwalają stwierdzić, że zbiór ten jest tematycznie powiązany. Od strony formalnej rozprawa autorstwa mgr inż. Natalii Rosiak nie budzi zastrzeżeń i jest zgodna z aktualnymi wymogami dotyczącymi prac doktorskich, określonymi w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 (z późn. zm.), artykuł 187, pkt. 3 i 4.

Artykuły, stanowiące trzon rozprawy, zostały opublikowane w latach 2023-24 na łamach trzech recenzowanych czasopism o zasięgu międzynarodowym wydawnictwa MDPI, z których wszystkie charakteryzują się wysokimi wskaźnikami naukowymi, jak *impact factor*. Są to: *Pharmaceutics* (IF=5,4) – 1 artykuł, *International Journal of Molecular Sciences* (IF=5,6) – 3 artykuły, *Molecules* (IF=4,6) – 1 artykuł. Czasopisma te cieszą się renomą w dyscyplinie nauk farmaceutycznych, są wymieniane w wykazie ISI Master Journal List, są także wysoko punktowane na listach MNiSW (140p).

Katedra i Zakład Farmakognozji
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 55 60, fax +48 12 620 55 75
e-mail: farmakog@cm-uj.krakow.pl, www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

Podolak



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

per se, to tzw. słabo działające, jak flawonoidy, fenolokwasy, saponiny czy irydoidy, z reguły są składowymi leków złożonych, wytwarzanych z substancji roślinnych. Badania ich dotyczące są zatem ukierunkowane głównie na aspekt poznawczy: ustalenie struktury, aktywności farmakologicznej czy mechanizmu działania. Niezależnie od danych potwierdzających potencjał terapeutyczny, rzadziej trafiają one do leczenia jako wyodrębnione związki, a w konsekwencji mniej liczne są też badania dotyczące ich biodostępności, farmakokinetyki, czy formulacji.

Jedną z grup wyspecjalizowanych metabolitów roślinnych, w przypadku których można zauważyć chyba największą dysproporcję, jeśli chodzi o ww. kwestie, są polifenole, będące przedmiotem badań Doktorantki. Klasycznym przykładem jest tu kurkumina, związek, z którym wiąże się wielkie nadzieje z racji szerokiego spektrum aktywności farmakologicznej, potwierdzonej ogromną liczbą publikacji, a który nadal funkcjonuje w sferze jedynie potencjalnych zastosowań, ze względu na niską biodostępność i szybki metabolizm. Zatem, podjęcie przez mgr inż. Natalię Rosiak tej tematyki uważam za bardzo trafne i dostarczające w perspektywie wyników o wartości aplikacyjnej.

Wśród różnych sposobów, służących poprawie rozpuszczalności związków bioaktywnych, można wymienić tworzenie amorficznych stałych rozproszeń (ASD z ang. *amorphous solid dispersions*). Choć to podejście jest eksplorowane od kilku dekad, zastosowano je z sukcesem dla niektórych związków fenolowych pochodzenia roślinnego dopiero w ostatnich kilku latach. Są to jednak nadal badania pilotażowe.

Autorka rozprawy skupiła się na opracowaniu amorficznych stałych rozproszeń czterech wybranych bioaktywnych polifenoli, traktując to zadanie w sposób kompleksowy. Po pierwsze, wytworzone ASD miały się charakteryzować lepszymi właściwościami fizykochemicznymi, niż referencyjne krystaliczne związki, a w konsekwencji także wyższą aktywnością ocenioną w modelach *in vitro*; po drugie, zastosowana metoda miała w założeniu być zgodna z zasadami „zielonej chemii”; po trzecie, stabilność fizyczna i mieszalność składników ASD, a także oddziaływania między nimi, miały być potwierdzone technikami rentgenowskiej dyfraktometrii proszkowej i spektroskopowymi wspartymi modelowaniem matematycznym i modelowaniem molekularnym. Podjęty problem badawczy jest, w mojej opinii, ciekawy i skutkujący dostarczeniem nowatorskich danych, szczególnie, że cztery związki, którymi zajęła się Doktorantka, nie były dotychczas przedmiotem podobnych rozważań.

W tym miejscu chcę wyróżnić dobór polifenoli, dla których podjęto się opracowania amorficznych stałych rozproszeń o pożądanym cechach. Są to trzy flawonoidy, tj. kemferol, mirycetyna i fisetyna, oraz przedstawiciel stylbenów – pterostylben. Niska rozpuszczalność tych związków w wodzie nie była jedynym determinantem, o ich wyborze zdecydowała bioaktywność, a nade wszystko zainteresowanie możliwościami

Katedra i Zakład Farmakognozji

30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 55 60, fax +48 12 620 55 75

e-mail: farmakog@cm-uj.krakow.pl, www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Opublikowane wyniki są efektem szeroko zakrojonych prac eksperymentalnych, obejmujących zarówno doświadczenia laboratoryjne, jak i analizy *in silico*. Mając na uwadze fakt, że w każdym przypadku zespół autorski tworzyły jedynie trzy osoby, tj. Doktorantka oraz obie Promotorki, kompetencje badawcze i samodzielność naukowa mgr inż. Natalii Rosiak nie budzą wątpliwości i zasługują na uznanie.

Potwierdzają to także zamieszczone w rozprawie informacje, nie odnoszące się bezpośrednio do badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej. Autorka przedstawiła bowiem nie tylko krótką notkę na temat swojego wykształcenia, lecz również wykaz działań, składających się na całokształt aktywności naukowej. Ten całościowy dorobek jest imponujący. Obejmuje 29 opublikowanych prac (sumaryczny IF=142, punkty MNiSW: 3490, indeks Hirscha 7, cytowania wg bazy Web of Science: 162), 20 posterowych doniesień konferencyjnych oraz 3 wystąpienia ustne, udział w 3 projektach naukowych, w tym dwóch NCN OPUS, udział w 10 szkoleniach i stażach.

Rozprawa mgr inż. Natalii Rosiak, poza wymienionymi wyżej składowymi (kopie publikacji, streszczenia, sygnowane oświadczenia współautorów, dane o aktywności naukowej Doktorantki), zawiera ponadto trzypięciowy wstęp, wprowadzający w podjętą tematykę badawczą, cel i założenia pracy, komentarz dotyczący najważniejszych efektów poszczególnych publikacji (13 stron) i wreszcie, wnioski oraz perspektywy dalszych badań. Całość uzupełnia spis odpowiednio dobranych 112 pozycji literaturowych, w większości z ostatnich pięciu lat, w bezpośredni sposób odnoszących się do tematyki prowadzonych badań własnych, a także wykaz zastosowanych skrótów. Układ tej części rozprawy nie odbiega od ogólnie przyjętego schematu, jednak niektóre rozdziały, szczególnie wstęp, zostały potraktowane zbyt syntetycznie.

Uwagi dotyczące tematyki badawczej i ocena merytoryczna

Rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Rosiak wpisuje się w istotny obszar badań w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, jakim jest poszukiwanie skutecznych rozwiązań w zakresie formulacji, prowadzących do poprawy efektywności leku. Jednym z kluczowych problemów, wpływających na możliwość zastosowania w terapii bioaktywnych związków jest ich słaba rozpuszczalność w wodzie i wynikająca z tego niska biodostępność po podaniu doustnym.

Problem ten dotyczy zarówno związków syntetycznych, jak i naturalnych, jednak w przypadku tych ostatnich widoczna jest zdecydowana dysproporcja, jeśli chodzi o badania w tym zakresie, szczególnie w odniesieniu do substancji znanych. Wynika to częściowo z tradycji stosowania produktów naturalnych jako przetworów złożonych, na czym opiera się klasyczne ziołolecznictwo tradycyjnych systemów medycznych świata, i na czym bazuje współczesna fitoterapia. Choć izolowane związki pochodzenia roślinnego z grup metabolitów silnie działających, jak np. alkaloidy czy glikozydy nasercowe, stanowią leki

Katedra i Zakład Farmakognozji

30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 55 60, fax +48 12 620 55 75

e-mail: farmakog@cm-uj.krakow.pl, www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

Handwritten signature: K. Oblet



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

wykorzystania w celach terapeutycznych, wyrażające się w znaczącej liczbie prowadzonych badań klinicznych (cytowanych wg. bazy ClinicalTrials.gov). Mając na względzie rosnącą tendencję, jeśli chodzi o liczbę obecnych na rynku suplementów diety, zawierających ww. związki, w przypadku których kwestie dotyczące biodostępności nie są z reguły rozpatrywane, ukierunkowanie pracy mgr inż. Natalii Rosiak na badania, których efektem jest dostarczenie wyników o wartości aplikacyjnej w odniesieniu do tych właśnie polifenoli, uważam za szczególnie cenne i mające przełożenie na sukces w ich ewentualnym dalszym rozwijaniu jako substancji wiodących o określonej aktywności, a w konsekwencji rejestracji jako leków.

Zakres przedstawionych w rozprawie eksperymentów jest bardzo szeroki. Obejmuje zarówno prace technologiczne, uwzględniające analizę amorficzności i mieszalności składników, wraz z oceną efektu końcowego, gdzie wpływ amorfizacji na badane cechy fizykochemiczne (jak m.in. rozpuszczalność) wzbogacono o badanie aktywności (antyoksydacyjna, hamowanie acetylo- i butyrylocholinoesterazy), a także prace teoretyczne. Badania *in silico*, oparte na modelach matematycznych i modelowaniu molekularnym, przeprowadzono w celu predykcji optymalnego składu ASD czy też dla wyjaśnienia oddziaływań między składnikami wytworzonych amorficznych stałych rozproszeń. Z kolei metodą dokowania molekularnego badano sposób wiązania danego polifenolu z miejscem aktywnym cholinoesteraz. Zastosowane metody mechanochemiczne i analityczne oraz modele *in vitro* i *in silico* są adekwatnie dobrane, a poprawność metodologiczna przeprowadzonych eksperymentów została już oceniona w trakcie procesu recenzyjnego międzynarodowych czasopism, w których Doktorantka opublikowała wyniki swoich badań.

Jak już wspomniałam wcześniej, wąski zespół współautorów artykułów, będących podstawą ocenianej rozprawy, wskazuje bezsprzecznie na wysokie kompetencje badawcze mgr inż. Natalii Rosiak. Nie bez znaczenia jest też wykształcenie Doktorantki, która jako fizyk, specjalizujący się w badaniach spektroskopowych, swobodnie porusza się w tematyce związanej z badaniem interakcji molekularnych występujących w ASD. Opublikowane prace potwierdzają także Jej wysokie umiejętności w zakresie technologii postaci leku, jak również opanowanie szeregu testów oceniających aktywność antyoksydacyjną (ABTS, DPPH, CUPRAC, FRAP), czy aktywność enzymatyczną (hamowanie AChE, BChE), które z kolei wykorzystuje się w badaniach fitofarmakologicznych, nie tylko w kontekście polifenoli.

Wskazując osiągnięcia Doktorantki, będące efektem przeprowadzonych badań, chcę wyróżnić zwłaszcza:

- i. otrzymanie amorficznych stałych rozproszeń (ASD) dla czterech bioaktywnych polifenoli, tj. mirycetyny, fisetyny, kemferolu i pterostylbenu, w przypadku

Katedra i Zakład Farmakognozji

30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 55 60, fax +48 12 620 55 75

e-mail: farmakog@cm-uj.krakow.pl, www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

16.06.2011



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Dyskusja wyników, zawarta w poszczególnych publikacjach, wskazuje na dogłębną orientację Doktorantki w realizowanej tematyce badawczej. Krótkie streszczenie założeń i najistotniejszych wyników prac, ujętych w tych artykułach, zawarte w rozprawie, uważam za przejrzyste i wystarczające. Niedosyt pozostawia zbyt syntetyczne potraktowanie treści teoretycznych, zawartych w rozdziale wstępnym rozprawy, o czym wspomniałam wcześniej. Brakowało mi zwłaszcza szerszej charakterystyki wybranych polifenoli, np. podsumowania ich cech fizykochemicznych czy przypomnienia struktur.

Ponadto, szkoda, że Autorka, wymieniając przykłady innych związków roślinnych, dla których otrzymano amorficzne stałe rozproszeń, nie pokusiła się o choćby zwięzły komentarz, dotyczący ich zalet, stabilności czy odmienności metodyki (vs. badania własne). Szczególnie, że wspomniane cytowania odnoszą się do flawonoidów, strukturalnie zbliżonych do badanych trzech związków, oraz resweratrolu, którego pochodną jest badany pterostylben.

Niezależnie od tej treściowej lapidarności, omawiane części rozprawy napisane są rzeczowo, poprawnym językiem naukowym. Nie dostrzegłam większych uchybień edytorskich. Poniżej wymieniam kilka przykładów pewnych nieścisłości, w większości nomenklaturowych.

- i. zarówno w tytule rozprawy jak i w tekście, Autorka używa pojęcia „amorficzne dyspersje” co jest anglicyzmem. Prawidłowe określenie to amorficzne stałe rozproszenia;
- ii. sformułowanie „młynek kulowy” jest zdrobnieniem, powinno być: młyn kulowy;
- iii. „potrójne ASD” (str. 29) to raczej trójskładnikowe ASD;
- iv. określenie kilku gatunków na str. 11 jako „obfitujących w fisetynę” jest nadinterpretacją, szczególnie gdy nie podaje się danych ilościowych; w tym kontekście warto było wspomnieć o truskawkach;
- v. kemferol jest związkiem szeroko rozpowszechnionym w świecie roślin, jego obecność potwierdzono nie tylko w wymienionych kilku gatunkach, z kolei opisując występowanie mirycetyny można było, obok rodzin, wymienić jakies przykłady gatunków źródłowych, żeby zachować podobny schemat opisu;
- vi. określenie „jagody” w kontekście źródeł stylbenów (str. 12) jest nieprecyzyjne, odnosi się ono wyłącznie do typu owocu.
- vii. określenie „właściwości neuroprotektoryjne”, w oparciu jedynie o wyniki inhibicji enzymów AChE i BChE, jest pewną nadinterpretacją.

Reasumując, treści zawarte w tekście rozprawy oraz publikacjach potwierdzają szeroką wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie, którą reprezentuje, jak również umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że oceniana rozprawa spełnia wymóg zawarty w art. 187, pkt.1 Ustawy.

Katedra i Zakład Farmakognozji

30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 55 60, fax +48 12 620 55 75

e-mail: farmakog@cm-uj.krakow.pl, www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

W. Kozłowski



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

- trzech ostatnich po raz pierwszy na świecie, oraz wykazanie, że charakteryzują się one lepszą rozpuszczalnością niż związki krystaliczne;
- ii. potwierdzenie w wybranych modelach *in vitro*, zgodnie z przyjętą hipotezą badawczą, że wytworzenie amorficznych stałych rozproszeń badanych polifenoli przełoży się na wyższą aktywność antyoksydacyjną oraz wyższy potencjał neuroprotektyny, oceniany poprzez inhibicję cholinesteraz (AChE, BChE);
 - iii. uzyskanie polepszonej przenikalności przez sztuczne błony biologiczne w testach PAMPA-GIT (błona jelitowa) oraz PAMPA-BBB (bariera krew-mózg) dla ASD pterostylbenu, co może zwiększyć efektywność neuroprotektyny i przeciwstarzeniową tego związku przy zastosowaniu klinicznym zaprojektowanej formacji;
 - iv. określenie oddziaływań między cząsteczkami badanych polifenoli a nośnikiem, uzyskując w ten sposób istotne dane dotyczące mechanizmów uzyskiwania ASD;
 - v. wykazanie, że spektroskopia w podczerwieni, wraz z analizą głównych składowych, może być efektywnym narzędziem służącym do potwierdzania stanu amorficznego w układach dwuskładnikowych (na przykładzie ASD kemferol-Eudragit®);
 - vi. potwierdzenie, na przykładzie ASD fisetyny, że hydroksypropylo- β -cyklodekstryna może pełnić rolę efektywnego solubilizatora w układach trójskładnikowych;
 - vii. opracowanie protokołów do wytworzenia stabilnych ASD badanych polifenoli, zgodnych z zasadami „zielonej chemii”, co jest podejściem proekologicznym, w kontekście przeniesienia procedury do skali przemysłowej.

Przeprowadzone przez mgr. inż. Natalię Rosiak badania dostarczają nowatorskich wyników, zarówno o charakterze poznawczym, jak i aplikacyjnym. Mają one znaczenie nie tylko w kontekście wypracowania nowych metod pozyskiwania amorficznych stałych rozproszeń metabolitów roślinnych, lecz również zrozumienia mechanizmów, szczególnie poznania oddziaływań między cząsteczkami bioaktywnego związku a nośnikiem. Zaletą pracy jest próba szerszego spojrzenia na ocenę walorów otrzymanych ASD. Analizie poddano nie tylko rozpuszczalność, ale również testowano takie właściwości, jak przenikalność przez błony biologiczne oraz bioaktywność w modelach *in vitro*. Z punktu widzenia szerszego wykorzystania bioaktywnych związków pochodzenia roślinnego, których cechy fizykochemiczne stanowią ograniczenie przy projektowaniu doustnych postaci leku, pionierskie prace Doktorantki nad wybranymi polifenolami stanowią świetną bazę do dalszych badań, bardzo potrzebnych w kontekście rozwoju nauk farmaceutycznych, a także praktyki lekarskiej.

Handwritten signature



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Ponadto, wymienione powyżej osiągnięcia jednoznacznie dowodzą oryginalności rozwiązań problemów naukowych przez mgr inż. Natalię Rosiak i nowatorskiego charakteru badań, spełniając tym samym wymaganie sformułowane w artykule 187, pkt. 2 Ustawy.

W trakcie lektury nasunęło mi się kilka pytań:

- i. Czy badane bioaktywne polifenole są związkami, których rozpuszczalność zależy od pH? Jako nośniki stałych rozprożeń Doktorantka proponuje m.in. zastosowanie polimerów anionowych i kationowych (Eudragity®).
- ii. Czym podyktowany był wybór akurat hydroksypropylo- β -cyklodekstryny jako dodatkowego nośnika? Cyklodekstryny tworzą kompleksy inkluzyjne z substancjami leczniczymi. Czy badano tworzenie takich kompleksów z fisetyną lub pozostałymi polifenolami analizowanymi w pracy?
- iii. Jaka była czystość pterostylbenu, użytego do badań w publikacji nr. 1?
- iv. Na czym polegało "odparowanie rozpuszczalnika z liofilizacją (str. 14)" - z technologicznego punktu widzenia liofilizacja to również metoda odparowania rozpuszczalnika. W jakim celu zastosowano liofilizację w tym konkretnym przypadku?
- v. Jak wygląda stabilność badanego pterostylbenu w porównaniu do resweratrolu? Czy w kontekście uzyskanych wyników korzystniej byłoby skupić się na tej właśnie pochodnej, zamiast na poszukiwaniu rozwiązań dla poprawy niekorzystnych cech samego resweratrolu?

Pytania powyższe wynikają z ciekawości i mogą być podstawą do dyskusji podczas obrony.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Podsumowując, **rozprawa doktorska, autorstwa mgr inż. Natalii Rosika spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.)**. Badania, których efektem są artykuły naukowe, wchodzące w skład rozprawy, stanowią w mojej opinii **istotny wkład w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych**, zarówno w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym. W ich wyniku uzyskano szereg nowatorskich danych eksperymentalnych, na których można bazować, projektując leki, zawierające w swoim składzie bioaktywne roślinne polifenole, które cechuje trudna rozpuszczalność w wodzie.

W związku z powyższym zwracam się do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu z wnioskiem o

M. Rosiak



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

dopuszczenie rozprawy mgr inż. Natalii Rosiak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto, ze względu na wysoką wartość merytoryczną rozprawy, **wnioskuję o jej wyróżnienie.**

Katedra i Zakład
Farmakognozji UJ CM
Irma Podolak
prof. dr. hab. Irma Podolak
kierownik

Irma Podolak

Katedra i Zakład Farmakognozji

30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 55 60, fax +48 12 620 55 75

e-mail: farmakog@cm-uj.krakow.pl, www.farmacja.cm-uj.krakow.pl