



Poznań, 10 maja 2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Rosiak
pt.

„Amorficzne dyspersje polifenoli”

(opracowana na zlecenie Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kancelarza Kolegium Nauk Farmaceutycznych)
(pismo z dnia 25 kwietnia 2024 r.)

Informacje ogólne

Przesłana do recenzji rozprawa doktorska, Pani mgr inż. Natalii Rosiak, dotyczy uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Promotorem powyższej rozprawy doktorskiej jest Pani prof. dr hab. n. farm. Judyta Cielecka-Piontek a promotorem pomocniczym Pani prof. dr hab. n. farm. Ewa Tykarska.

Praca doktorska Pani mgr inż. Natalii Rosiak stanowi spójny tematycznie zbiór 5 publikacji naukowych, indeksowanych na liście Journal Citation Reports (JCR), tzw. „lista filadelfijska”. Zatem przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowiąca zbiór opublikowanych już, recenzowanych przez uznane międzynarodowe środowisko naukowe, spójnych publikacji naukowych sprawia, że rola recenzenta sprowadza się w dużej mierze do syntetycznej oceny formalnej i merytorycznej badań opisanych w publikacjach stanowiących treść rozprawy doktorskiej.

Otrzymana do recenzji rozprawa doktorska jest poświęcona badaniom polifenoli, które to wykazują szereg korzystnych dla zdrowia właściwości. Zaliczyć do nich można aktywność przeciwzapalną, neuroprotekcijną, przeciwcukrzycową, antyapoptotyczną, kardioprotekcijną oraz aktywność hepatoprotekcijną. Stąd, z danych i doniesień literaturowych, można wnioskować, że związki polifenolowe doskonale działają jako naturalne przeciwutleniacze, co z kolei doskonale nadaje się do neutralizacji wolnych rodników. Niestety związki te charakteryzują się niską biodostępnością po podaniu doustnym. Ograniczone wchłanianie i dostępność dla organizmu związane są m.in. ze słabą

rozpuszczalnością. Z literatury wiadomo, że istnieją jednak możliwości zwiększenia ich rozpuszczalności, do których należy otrzymywanie nanocząstek, hydrożeli, czy amorficznych stałych dyspersji. Te ostatnie, formy amorficzne, wykazują zdecydowanie zwiększoną rozpuszczalność, szybkość rozpuszczania a tym samym biodostępność w porównaniu z krystalicznymi tego typu związkami. Stąd też stały się one zasadniczym obszarem badań prowadzonych przez Doktorantkę. Znajomość tych związków, poznanie ich natury, form chemicznych, ich charakterystyka fizykochemiczna, interakcje molekularne, jak również stabilność termodynamiczna staje się bardzo ważnym zagadnieniem i wyznawaniem naukowym w celu ich szerokiego zastosowania medycznego.

Motorem tego typu badań, zawartych w recenzowanej rozprawie, jest niewątpliwie ciągła potrzeba poszukiwania i zarazem projektowania nowej klasy związków charakteryzujących się dobrą biodostępnością. Jednym z nich są amorficzne polifenole, a zamierzeniem naukowym jest ich poprawa stabilności poprzez rozproszenie substancji czynnej w nośniku polimerowym. Projektowanie tego typu układów, określanych mianem amorficznych stałych dyspersji (ang. *amorphous solid dispersion*, ASD) i stało się coraz powszechniejszym rozwiązaniem.

Ocena rozprawy doktorskiej

Dorobek Doktorantki stanowiący treść rozprawy doktorskiej to, jak już wspomniano wcześniej, 5 publikacji naukowych, opublikowanych w latach 2023-2024. Sumaryczny współczynnik oddziaływania dorobku naukowego Doktorantki (*Impact Factor*) stanowiący treść recenzowanej rozprawy to 26,8, natomiast sumaryczna liczba tzw. punktów ministerialnych wskazanych prac wynosi 700. Oba wymienione powyżej wskaźniki bibliometryczne, w kontekście realizacji pracy doktorskiej w formie zbioru spójnych publikacji, są na bardzo wysokim poziomie, jeśli chodzi o osiągnięcie naukowe doktorantki.

Do zbioru artykułów składających się na rozprawę doktorską, Pani mgr inż. Natalia Roszak dołączyła 30 stronicowy „komentarz autorski”, który zawiera wykaz prac naukowych wchodzących w skład rozprawy, opis osiągnięcia naukowego, aktywność naukową doktorantki, przedmiot badań, perspektywy na przyszłość oraz spis literatury. Dołączono również oświadczenia doktorantki i współautorów o ich udziale w prezentowanych publikacjach naukowych będących elementem rozprawy doktorskiej.

Całkowity dorobek doktorantki, wg. bazy Scopus (na dzień 10 maja 2024 r.), to 31 publikacji naukowych, 210 cytowań a indeks Hirscha wynoszący 10. To bardzo dobre parametry

bibliometryczne na tym etapie kariery naukowej. Świadczy to już o dużej rozpoznawalności doktorantki i jej badań wśród środowiska naukowego. Niewątpliwie parametry te ulegną jeszcze szybko wzrostowi, choćby ze względu na opublikowanie nowych prac naukowych (lata 2023-2024) będących m.in. częścią tej rozprawy doktorskiej. Jeśli chodzi o inną aktywność naukową doktorantki, to jest ona dodatkowo współautorem 26 prac naukowych. Brała też czynny udział w realizacji trzech projektów badawczych jako wykonawca. Na tym etapie kariery naukowej, w mojej opinii, to niewątpliwie ponadprzeciętne osiągnięcia zasługujące na uznanie i wyróżnienie.

Wspomniane wyżej artykuły stanowiące osiągnięcie naukowe, wchodzące w skład rozprawy doktorskiej to:

1. Rosiak Natalia, Ewa Tykarska, Judyta Cielecka-Piontek
„Amorphous Pterostilbene Delivery Systems Preparation—Innovative Approach to Preparation Optimization”, *Pharmaceutics* 15.4 (2023): 1231.
2. Rosiak Natalia, Ewa Tykarska, Judyta Cielecka-Piontek
„Enhanced Antioxidant and Neuroprotective Properties of Pterostilbene (Resveratrol Derivative) in Amorphous Solid Dispersions”, *International Journal of Molecular Sciences* 25.5 (2024): 2774.
3. Rosiak Natalia, Ewa Tykarska, Judyta Cielecka-Piontek
„The Study of Amorphous Kaempferol Dispersions Involving FT-IR Spectroscopy”, *International Journal of Molecular Sciences* 24.24 (2023): 17155
4. Rosiak Natalia, Ewa Tykarska, Judyta Cielecka-Piontek
„Mechanochemical Approach to Obtaining a Multicomponent Fisetin Delivery System Improving Its Solubility and Biological Activity”, *International Journal of Molecular Sciences* 2024, 25(7), 3648
5. Rosiak Natalia, Ewa Tykarska, Judyta Cielecka-Piontek
„Myricetin Amorphous Solid Dispersions—Antineurodegenerative Potential”, *Molecules* 2024, 29(6), 1287

Załączone w “komentarzu autorskim” oświadczenia współautorów publikacji naukowych, wskazują na dominujący udział we wszystkich pracach Pani mgr inż. Natalii Rosiak. Dodatkowo, doktorantka we wszystkich pracach będących cyklem publikacji stanowiącym podstawę do nadania stopnia doktora, jest pierwszym autorem. Doktorantka wykazała również swój realny wkład, poza współtworzeniem koncepcji badań, nadzorem nad przebiegiem prac, czy też współudziałem przy tworzeniu manuskryptu, włożony w prace eksperymentalne takie jak: badania XRPD, DSC, FT-IR, HPLC, preparatyka amorficznych dyspersji, modelowanie teoretyczne DFT, badania aktywności przeciwutleniających i inne. Na podstawie przedstawionych wyników oraz oświadczeń doktorantki

i współautorów publikacji widać pełne zaangażowanie i dominujący udział w planowaniu, badaniach i powstaniu prac naukowych.

Ocena merytoryczna

W ramach recenzowanej pracy doktorskiej prowadzono badania w kierunku otrzymania mieszalnych ASD wybranych polifenoli (fisetyna, kemferol, mirycetyna i pterostylben). Główny cel pracy postawiony przez doktorantkę było otrzymanie i charakteryzacja amorficznych dyspersji polifenoli o potwierdzonej mieszalności i poprawionych właściwościach fizykochemicznych w stosunku do krystalicznego związku aktywnego. Doktorantka w tym celu zaproponowała odpowiednie narzędzia i procedury badawcze takie jak: zastosowanie metod mechanochemii, zastosowanie metod XRPD, DSC, FT-IR, zastosowanie modeli matematycznych oraz teoretycznych z wykorzystaniem teorii funkcjonału gęstości oraz modelowanie molekularne, zastosowanie badań in-vitro oraz dokowanie molekularne. Wybór technik badawczych i analiz teoretycznych jest bardzo szeroki, dobrze dobrany i zaplanowany i zaprojektowany na realizację głównego celu badawczego. Świadczy to o swobodnym poruszaniu się Doktorantki w temacie, przemyśleniu badań i dojrzałości naukowej w planowaniu i realizowaniu badań.

Analiza treści pięciu artykułów, będących całością rozprawy doktorskiej, wykazuje zawarcie w nich wszystkich elementów będących założeniami pracy doktorskiej.

Publikacja nr 1 w głównej swojej treści odnosi się do przygotowanie amorficznych systemów dostarczania pterostilbenu (PTR) w celu uzyskania większej rozpuszczalności i aktywności przeciwtleniającej. Praca opisuje PTR przygotowaną poprzez mielenie na sucho w młynie kulowym, gdzie nośnikiem rozpraszającym był związek Soluplus® (SOL), polimerowy solubilizator o amfifilowej strukturze chemicznej, który został opracowany specjalnie dla roztworów stałych. Ze względu na swój dwufunkcyjny charakter, jest w stanie działać jako polimer matrycowy dla roztworów stałych z jednej strony, a z drugiej strony jest w stanie rozpuszczać słabo rozpuszczalne leki w środowisku wodnym. Ponadto pozwala na zwiększanie biodostępności słabo rozpuszczalnych substancji. Zaproponowano odpowiedni stosunek wagowy PTR-SOL, który określono na podstawie wyników analizy termicznej oraz modeli matematycznych. Praca wsparta jest analizami XRPD, DCS, SEM oraz spektroskopią FT-IR oraz obliczeniami DFT. Na podstawie zaproponowanych badań wskazano, że amorfizacja pozytywnie wpływa na właściwości fizykochemiczne i biologiczne PTR. Przeprowadzone

badania niewątpliwie stanowią kamień milowy w rozwijaniu bardziej skutecznych terapii opartych na PTR. Pojawia się pytanie, na ile w procesach termicznych zachowanie się związku jest odwracalne (analiza DSC) i jakie jest realny najodpowiedniejszy stosunek wagowy, zachowujący zarówno najlepsze parametry rozpuszczalności, biodostępności i właściwości strukturalne?

Praca nr 2 poświęcona jest zwiększaniu właściwości przeciwutleniających i neuroprotektoryjnych pterostilbenu w amorficznych dyspersjach stałych. W tej pracy zastosowano polimer PVP (K30 - Polivinyłpirolidon K30 i VA64 - Polivinyłpirolidon/winylooctan). W badanym przypadku zaobserwowano amorfizację PTR, która prowadziła do wzrostu pozornej rozpuszczalności w stosunku do związku niemodyfikowanego około 103-krotnej i 96-krotnej wzrostu, odpowiednio dla dyspersji z PVP K30 i PVP VA64. Zaobserwowano również poprawę przepuszczalności przez sztuczne błony biologiczne. Zwiększona rozpuszczalność w wodzie przełożyła się także na lepsze właściwości biologiczne w badaniach *in vitro*. Praca ta pokazuje, w jaki sposób amorfizacja związku wpływa na jego właściwości fizykochemiczne i biologiczne. Podobnie jak w poprzedniej pracy, do ustalenia tych wniosków doktorantka posłużyła się technikami XRPD, TG, DSC oraz FT-IR-ATR.

Praca nr 3 poświęcona jest badaniu amorficznych dyspersji kemferolu z wykorzystaniem spektroskopii FT-IR. To typowa praca o charakterze spektroskopowym z wykorzystaniem metod chemometrycznych. W tym wypadku dołożenie analizy chemometrycznej z wykorzystaniem techniki FT-IR pomaga na bardzo dokładną analizę widm absorpcji w podczerwieni a co za tym idzie optymalizację procesów chemicznych. Wyniki przeprowadzonych badań dostarczyły dowodów na to, że analiza FT-IR połączona z PCA może służyć jako skuteczne narzędzie do weryfikacji stanu amorficznego KMP. Pojawia się tu pytanie, na ile inne metody chemometryczne, jak choćby chemometria z wykorzystaniem mikroskopii ramanowskiej, czy też spektroskopia mas, czy metody fluorescencyjne są konkurencyjne i bardziej dokładne? Czy metodyka FT-IR jest w tym przypadku metodą najdokładniejszą i co najważniejsze weryfikowalną innymi metodami (choćby z danych literaturowych)?

Praca nr 4 odnosi się do mechanochemicznego otrzymywania multikomponentowej fisetyny (FIS) podobnie jak poprzednio w systemach poprawiających jej rozpuszczalność i aktywność biologiczną. Celem prowadzonych badań, zawartych w manuskrypcie, było otrzymanie metodą mechanochemiczną (mielenie na sucho w młynku kulowym) dwu- i trójskładnikowych amorficznych dyspersji fisetyny (FIS), charakteryzujących się lepszymi właściwościami fizykochemicznymi, a także poprawioną aktywnością biologiczną w testach *in vitro*. Do analizy badanych związków doktorantka użyła metody XRPD oraz FT-IR w celu potwierdzenia stanu amorficznego, natomiast techniki DSC dla potwierdzenia odpowiedniej



mieszalności badanych amorficznych dyspersji. Zaplanowane i przeprowadzone tu badania są celowe i dobrze przemyślane, a zastosowane eksperymentalne techniki dobrze potwierdzają, że zaproponowana w tym przypadku metoda amorfizacji jest poprawna i daje oczekiwane rezultaty, eliminując przy tym ograniczenia związane z niską rozpuszczalnością FIS.

Ostatnia praca z cyklu publikacji, praca nr 5, poświęcona jest szerokiej analizie mirycetynie (MYR). Praca przedstawia, że włączenie MYR do matrycy polimerowej może być kluczem do rozwiązania problemu jej niskiej rozpuszczalności i biodostępności. Z tego względu przedstawione badania dotyczą opracowania ASD MYR z PVP K30 z zastosowaniem metod łączonych (odparowanie rozpuszczalnika i liofilizacja). W tym przypadku mamy do czynienia z zastosowanym już polimerem PVP (K30) jednakże otrzymaniem końcowego produktu w postaci liofilizatu. Analiza z wykorzystaniem techniki XRPD potwierdziła, że połączenie techniki odparowania rozpuszczalnika i liofilizacji pozwala otrzymać ASD MYR w stosunku wagowym 1:8 i 1:9. Przy tak otrzymanych produktach wykazano, z wykorzystaniem technik kalorymetrycznych, że MYR rozproszona w matrycy PVP posiada oczekiwaną formę amorficzną oraz dostarczyły dowodów na pełną mieszalność składników w otrzymanych ASD. Do analizy oddziaływań pomiędzy mirycetyną a PVP posłużono się spektroskopią FT-IR oraz obliczeniami kwantowo-mechanicznymi. Zastosowanie obu technik, które dają jednoznacznie spójne i porównywalne rezultaty jest doskonałym potwierdzeniem wyników eksperymentalnych a tym samym zaproponowanych w wyniku tego oddziaływań oraz potwierdzenia stabilności, rozpuszczalności, szybkości samego rozpuszczania oraz właściwości biologiczne ASD. Wyniki badań teoretycznych i eksperymentalnych dostarczyły cennych informacji i mogą przyczynić się do opracowania nowych, skutecznych preparatów opartych na amorficznych dyspersjach MYR.

Wniosek końcowy

W mojej opinii Autorka rozprawy doktorskiej, poprzez bardzo dobrze zaplanowane i zaprojektowane kompleksowe badania i zaproponowane rozwiązania w pełni realizuje postawione cele badawcze, kompleksowo wyjaśnia stawiane tezy.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi spójną i dobrze przygotowaną pracę w formie cyklu publikacji naukowych, zawierająca wszystkie elementy stawiane tego typu opracowaniom i charakteryzuje się bardzo wysokim poziomem naukowym. Doktorantka wykazała, że potrafi zaproponować rozwiązania konkretnego problemu naukowego, stawiając jasne cele i je w pełni realizując, stosując odpowiednie techniki badawcze i wyciągać z wykonanych badań

właściwe wnioski. Wykonane i opublikowane przez doktorantkę badania dostarczają cennych informacji, niezbędnych w procesie opracowania nowych preparatów opartych na ASD polifenoli.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Natalii Rosiak pt. „Amorficzne dyspersje polifenoli” spełnia wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i zgodnie z przepisami określonymi w Prawie o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, z 20 lipca 2018, art. 187 (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.) wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony.

Dodatkowo, ze względu na wysoki warsztat naukowy, interesujące wyniki badawcze, całokształt pracy doktorskiej wykonanej na bardzo wysokim poziomie naukowym oraz nieprzeciętny dorobek naukowy wnoszę o wyróżnienie wyżej wymienionej rozprawy.

