



Politechnika Łódzka

Katedra Fizyki Molekularnej

Łódź, 10.04.2025

dr hab. inż. Lidia Okrasa

e-mail: lidia.okrasa@p.lodz.pl

tel. +48 42 6313286

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Daniela Kramarczyka
zatytułowanej: „*Mechanizmy odpowiadające za poprawę fizycznej stabilności
amorficznych farmaceutyków po zastosowaniu krzemionkowych materiałów
nanoporowatych*”

Rozprawa doktorska mgr. inż. Daniela Kramarczyka została zrealizowana w Instytucie Fizyki Wydziału Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem dr hab. inż. Justyny Knapik-Kowalczyk, która zajmuje się badaniem leków amorficznych, a w szczególności poprawą parametrów farmaceutyków słabo rozpuszczalnych w wodzie poprzez zmianę ich formy z krystalicznej na amorficzną. Tytuł rozprawy w pełni odpowiada prezentowanej w pracy treści. Jak wspomniał we wstępie do swojej rozprawy doktorskiej Daniel Kramarczyk, poprawa rozpuszczalności w wodzie leków krystalicznych jest kluczowa dla ich skuteczności terapeutycznej. Ponieważ generalnie amorficzne formy są lepiej rozpuszczalne w wodzie dlatego poszukuje się metod stabilizacji form amorficznych i zapobiegania rekrytalizacji, co znacząco poprawia biodostępność i efektywność farmaceutyków. Daniel Kramarczyk w swojej rozprawie doktorskiej opisał wpływ dodatku dwóch mezoporowatych materiałów krzemionki, o różnej wielkości ziarna, na stabilizację fazy amorficznej trzech farmaceutyków: symwastatyny, celekoksylu i aripiprazolu. W swoich badaniach Doktorant stosował głównie dwie komplementarne techniki: różnicową kalorymetrie skaningową (DSC) oraz szerokopasmową spektroskopię dielektryczną (BDS).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma formę zbioru trzech spójnych tematycznie, wieloautorskich, oryginalnych prac, opublikowanych w latach 2020-2024 w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu światowym. Publikacje składające się na rozprawę doktorską Daniela Kramarczyka to:



adres do korespondencji:
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116, budynek A27
tel. 42 631 32 05, fax 42 631 32 18,
www.kfm.p.lodz.pl, www.p.lodz.pl



AnyScanner

- A1. *Importance of Mesoporous Silica Particle Size in the Stabilization of Amorphous Pharmaceuticals - The Case of Simvastatin*. J. Knapik-Kowalczyk, D. Kramarczyk, K. Chmiel, J. Romanova, K. Kawakami, M. Paluch, 2020 *Pharmaceutics*, 12, 384;
- A2. *Inhibition of celecoxib crystallization by mesoporous silica - Molecular dynamics studies leading to the discovery of the stabilization origin*. D. Kramarczyk, J. Knapik-Kowalczyk, W. Smolka, M. Ferreira Monteiro, L. Tajber, M. Paluch, 2022 *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 171, 106132;
- A3. *Tuning the Physical State of Aripiprazole by Mesoporous Silica*. D. Kramarczyk, J. Knapik-Kowalczyk, J. Klimontko, M. Kurek, R. Jachowicz, M. Paluch, 2024 *Mol. Pharmaceutics* 21, 5, 2315–2326.

Taką prezentację pracy doktorskiej dopuszcza ustawa z dnia 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, gdzie możemy przeczytać, że „(...) *Rozprawa doktorska może mieć formę (...) spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych (...)*”. Manuskrypty stanowiące podstawę tej rozprawy doktorskiej są opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania IF z listy JCR (IF = $4,3 \div 5,6$). Są one także wysoko punktowane przez Ministerstwo Edukacji i Nauki (dwie publikacje mają po 100 punktów a jedna ma 140 punktów wg. listy MEiN). W dwóch z tych publikacji Daniel Kramarczyk jest pierwszym autorem, co wskazuje na jego duże zaangażowanie w prowadzenie badań, analizę i interpretację uzyskanych wyników oraz ich opis. Znaczący udział Doktoranta potwierdzają także zebrane deklaracje współautorów tych publikacji. Z deklaracji wynika, że wkład Daniela Kramarczyka w te publikacje polega na wykonaniu pomiarów kalorymetrycznych oraz dielektrycznych, analizie wszystkich wyników oraz przygotowaniu pierwszych wersji manuskryptów. Pragnę również nadmienić, że oprócz trzech artykułów zawartych w tej rozprawie Daniel Kramarczyk jest współautorem 10 innych publikacji oraz trzech prezentacji na międzynarodowych konferencjach naukowych. Świadczy to jednoznacznie o dużym zaangażowaniu Doktoranta w pracę naukową.

Rozprawa Daniela Kramarczyka liczy 85 stron. Praca zawiera 5 rozdziałów. Na początku w krótkim, niespełna czterostronicowym, wstępie Doktorant opisał motywację do podjętych badań. W kolejnym rozdziale omówił na 9 stronach artykuły stanowiące podstawę jego rozprawy doktorskiej. Trzeci rozdział zawiera przedruk tych artykułów wraz z oświadczeniami współautorów. Rozprawę doktorską kończy podsumowanie oraz spis literatury składający się z 41 pozycji.

Pierwszy z artykułów (*Pharmaceutics*, 12 (2020) 384) opisuje rolę wielkości cząstek nanoporowatej krzemionki w stabilizacji amorficznej postaci symwastatyny (SVT). Jest to obszerna praca mająca aż 21 stron i 80 odnośników literaturowych. Autorzy do stabilizacji

adres do korespondencji:
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116, budynek A27
tel. 42 631 32 05, fax 42 631 32 18,
www.kfm.p.lodz.pl, www.p.lodz.pl



fazy amorficznej SVT uzyskanej metodą witrifikacji, użyli dwóch krzemionek o zbliżonej średnicy (~20 nm) i objętości (~1,65 mL/g) porów oraz powierzchni (~300 m²/g) ziaren, ale różniących się ich wielkością. Użycie krzemionki o większych rozmiarach (59 µm) powoduje znaczne spowolnienie procesu rekrytalizacji, natomiast obecność zaledwie 9% nanoporowatej krzemionki o mniejszych rozmiarach cząstek (2,5-3,7 µm) zapobiega całkowicie rekrytalizacji SVT. Autorzy próbowali odkryć mechanizm stabilizacji fazy amorficznej sprawdzając po kolei najczęściej opisywane w literaturze hipotezy. W tym celu przeprowadzili szereg badań zarówno DSC, jak i BDS układów o różnej zawartości krzemionki. Szczegółowa analiza pozwoliła im obalić kilka koncepcji znanych z literatury dla innych układów. Odkryli, że stabilizacja amorficznej SVT nie wynikała w tym przypadku z zamknięcia cząsteczek SVT w porach krzemionki (występuje jeden nie zmieniony proces zeszklenia) ani z interakcji molekularnych między grupami funkcyjnymi SVT a powierzchnią krzemionki. Użycie dodatku krzemionki, niezależnie od jej rodzaju, nie wpłynęło także na dynamikę molekularną SVT. Badania dielektryczne pokazują obecność trzech procesów relaksacyjnych, które praktycznie są takie same we wszystkich materiałach. Jedyną przyczyną stabilizacji amorficznej SVT jest więc według autorów zawada steryczna, jaką powoduje dodatek krzemionki i która blokuje propagację wzrostu kryształu symwastatyny. W przypadku mniejszych cząstek dodanej krzemionki ta zawada steryczna jest większa (mniejsze obszary pomiędzy ziarnami krzemionki) i dzięki temu amorficzna SVT nie może wrócić do wyjściowej, krystalicznej formy.

Drugi artykuł (*European Journal of Pharmaceutical Sciences* 171 (2022) 106132) poświęcony jest badaniom celekoksylu, leku przeciwbólowego i przeciwzapalnego. W pracy tej autorzy ograniczyli się do zbadania wpływu na stabilizację amorficznego farmaceutyku tylko nanoporowatej krzemionki o mniejszych rozmiarach, jako tej bardziej efektywnej. Także w tym przypadku obecność krzemionki nie wpłynęła w sposób znaczący na temperaturę zeszklenia oraz dynamikę molekularną stabilizowanego celekoksylu. Ponieważ jednak ma on znacznie większą zdolność do rekrytalizacji niż opisana w poprzedniej publikacji symwastatyna to użycie 9% krzemionki nie zahamowało efektywnie rekrytalizacji celekoksylu. Dlatego autorzy użyli większej ilości (do 45%) dodatku i udowodnili, że im większy udział krzemionki tym rekrytalizacja jest wolniejsza. Ponadto odkryli, że ze wzrostem udziału krzemionki zwiększa się ilość fazy amorficznej, która w ogóle nie ulega rekrytalizacji. Jest to faza bezpośrednio oddziałująca z powierzchnią krzemionki. Badania DSC umożliwiły autorom wyznaczenie przez ekstrapolację stężenia celekoksylu potrzebnej do utworzenia jednomolekularnej warstwy na powierzchni krzemionki (13,5 %). Na podstawie analizy wyników badań dielektrycznych autorzy wykazali też, że obecność krzemionki inhibituje krystalizację tylko celekoksylu oddziałującego z jej powierzchnią i dlatego żeby uzyskać całkowite zatrzymanie

adres do korespondencji:

90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116, budynek A27

tel. 42 631 32 05, fax 42 631 32 18,

www.kfm.p.lodz.pl, www.p.lodz.pl



rekrytalizacji należałoby użyć bardzo dużej ilości krzemionki (co najmniej 85,3 % wagowych) co w przybliżeniu odpowiada jednomolekularnej warstwie celekoksybu na krzemionce. Jak wspomniałam wcześniej, badania BDS wykazały, że pik pochodzący od strukturalnej relaksacji α nie zmienia swojego położenia, staje się jednak szerszy i asymetryczny wraz ze wzrostem dodatku krzemionki, co jest związane ze wzrostem heterogeniczności układu. Dodatkowo dla materiałów o mniejszej zawartości krzemionki (<27 wt. %) obok strukturalnej relaksacji α można zaobserwować zimną krystalizację, a dla materiałów po rekrytalizacji proces Maxwell'a-Wagner'a-Sillars'a.

Manuskrypt A3 (*Molecular Pharmaceutics* 21(5) (2024) 2315–2326) poświęcony jest trzeciemu farmaceutykowi – aripiprazolowi. Także w tej pracy autorzy użyli do stabilizacji fazy amorficznej aripiprazolu tylko krzemionki o małej wielkości ziaren. Ponieważ aripiprazol ma tendencję do polimorfizmu wpływ dodatku krzemionki na stabilizację jego fazy amorficznej nie jest jednoznaczny. Stopień kontroli stanu fizycznego aripiprazolu zależy od jej stężenia w systemie. Stwierdzono, że różny stopień ograniczeń sterycznych wpływa na tworzenie zarodków krystalizacji różnych form polimorficznych leku, a co z tego wynika inaczej wpływa na stopień jego rekrytalizacji. Przy niskiej zawartości krzemionka wręcz aktywuje rekrytalizację aripiprazolu i wspiera tworzenie jego III polimorficznej formy. Co w efekcie przyspiesza proces rekrytalizacji i wpływa negatywnie na stabilizację układu. Jednak już przy średniej zawartości (między 30 a 65% wagowych) krzemionka działa jako inhibitor rekrytalizacji aripiprazolu, umożliwiając uzyskanie jego IV lub X polimorficznej formy. Natomiast przy wysokiej zawartości krzemionki (>65% wagowych), można uzyskać amorficzną formę aripiprazolu o wysokiej stabilności fizycznej. Autorzy jednoznacznie udowodnili, że i w tym przypadku stabilizacja fazy amorficznej leku wynika z jednej strony z zawady sterycznej, a z drugiej z jego oddziaływania z powierzchnią krzemionki. Określenia faz krystalicznych dokonano przy pomocy dyfrakcji rentgenowskiej. Podobnie jak w przypadku materiałów opisanych w poprzednich publikacjach i tutaj wykazano, że dodatek krzemionki nie ma istotnego wpływu na dynamikę molekularną aripiprazolu.

Podsumowując wszystkie trzy publikacje koncentrują się na stabilizacji amorficznych farmaceutyków za pomocą mezoporowatej krzemionki. Poniżej przedstawię najważniejsze, moim zdaniem, wnioski płynące z tej pracy doktorskiej:

- Zastosowanie mezoporowatych materiałów może prowadzić do poprawy biodostępności i skuteczności terapeutycznej farmaceutyków poprzez stabilizację amorficznej fazy leków, zapobiegając ich rekrytalizacji.
- Stabilizacja amorficznych farmaceutyków, opisanych w tych pracach, nie wynika z zamknięcia ich cząsteczek w porach krzemionki, ale jest związana z długością



adres do korespondencji:
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116, budynek A27
tel. 42 631 32 05, fax 42 631 32 18,
www.kfm.p.lodz.pl, www.p.lodz.pl

dyfuzji cząsteczek leku w materiałach, która zależy od wielkości i ilości cząstek krzemionki.

- W przypadku symwastatyny ograniczenie jej rekrytalizacji nie wynika z interakcji molekularnych między grupami funkcyjnymi symwastatyny a powierzchnią krzemionki. Jednak dla celekoksylu i aripiprazolu takie oddziaływania molekularne mają miejsce i to głównie one hamują całkowicie rekrytalizację.
- Obecność nanoporowatych materiałów krzemionkowych nie wpływa w istotny sposób na dynamikę molekularną badanych farmaceutyków.
- W przypadku aripiprazolu, który ma tendencje do polimorfizmu, ilość dodanej krzemionki ma wpływ na jego formy morfologiczne co sprawia, że wpływ obecności nanoporowatej krzemionki na stabilizację jego fazy amorficznej jest różny przy różnym udziale krzemionki.

Reasumując, chcę podkreślić, że moim zdaniem wszystkie trzy artykuły są bardzo dobrze przygotowane, zawierają oryginalne wyniki i wnoszą wiele do aktualnej nauki. Jednak już przewodnik po tych publikacjach, przygotowany przez Doktoranta, pozostawia uczucie niedosytu. W mojej opinii brakuje tam opisu zjawisk i pojęć, na który brakło miejsca w publikacjach, a który ułatwiłby zrozumienie tematu. Z pewnością to dlatego nasuwa się mi kilka pytań, które przedstawię poniżej w kolejności pojawiania się w trakcie czytania rozprawy:

- Na samym początku swojej dysertacji Daniel Kramarczyk przedstawia rozpuszczalność leków doustnych. Skoro ten zestaw, jak podał Doktorant, został przygotowany na bazie 200 najczęściej sprzedawanych leków w UE i USA, to skąd wzięły się ułamkowe procenty odpowiadające różnym klasom rozpuszczalności? Np. 5,3 % leków o bardzo trudnej rozpuszczalności odpowiada liczbie leków równej 10,6. Jak to rozumieć?
- Na kolejnej stronie Doktorant opisał wpływ dynamiki molekularnej na rekrytalizację farmaceutyków oraz sposoby modyfikacji tej dynamiki przez różne dodatki. W swoich pracach podejmuje on temat wpływu dodatku nanoporowatej krzemionki na dynamikę molekularną badanych leków. Jednak nie ma możliwości, żeby mechanizm opisany we wstępie mógł mieć zastosowanie w jego materiałach. Na jakiej więc podstawie założył, że dynamika ta ulegnie modyfikacji w jego układach?
- Kolejną wątpliwość budzi we mnie wyjaśnienie motywacji użycia do stabilizacji nanoporowatej krzemionki. Mechanizm zastosowania jej jako nośnika leku jest kompletnie inny niż ten obserwowany przy stabilizacji fazy amorficznej. Jednocześnie mezoporowate krzemionki były stosowane jako inhibitory rekrytalizacji już wcześniej. W publikacji A1 autorzy powołują się chociażby na pracę grupy J. Andersson'a z roku 2004, oraz na pracę powstałą w roku 2018 w



adres do korespondencji:
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116, budynek A27
tel. 42 631 32 05, fax 42 631 32 18,
www.kfm.p.lodz.pl, www.p.lodz.pl

zespołe, w którym Doktorant realizował tę pracę. Czy to nie była wystarczająca motywacja?

- Kolejne pytanie pojawiło się przy lekturze strony 8 przy spisie konferencji naukowych, na których prezentowane były wyniki badań Doktoranta. Szkoda, że nie ma tu podanych tytułów, współautorów i form wystąpień. Czy te prezentacje konferencyjne były związane bezpośrednio z badaniami opisanymi w dysertacji doktorskiej, czy ogólnie z działalnością badawczą Doktoranta?
- W podrozdziale 2.3. na stronie 15 Doktorant podał, że badał materiały o zawartości krzemionki równej 9, 18 i 27 %, jednak z pracy A2 wynika, że było badanych więcej składów (aż do 45 %). Dlaczego pozostałe składy zostały pominięte w opisie?
- W podrozdziale 3.1 na stronie 18 podany jest udział w pracy A1 „pierwszego autora”, ale Doktorant, nie jest w tej pracy pierwszym autorem. Założyłam, że to prosty błąd językowy i chodzi jednak o udział w pracy Doktoranta, zwłaszcza, że oświadczenia pozostałych współautorów znajdują się dalej, ale niestety wkład tu opisany nie zgadza się z kontrybucją autorów umieszczoną w manuskrypcie, gdzie Danielowi Kramarczykowi przypisane są wyłącznie pomiary. Jaki faktycznie jest wkład Doktoranta do pracy A1.
- We wszystkich pracach zastosowane zostało równanie Vogel'a-Fulcher'a-Tammann'a (VFT), gdzie T_0 jest definiowane jako temperatura Vogel'a, która odpowiada stanowi o nieskończonym czasie relaksacji. Jakie jest fizyczne znaczenie tego parametru?

Mimo przedstawionych powyżej pytań uważam, że przedstawiona do recenzji praca Daniela Kramarczyka ma niewątpliwie bardzo dużą wartość poznawczą i ma znaczący wkład w rozwój dyscypliny. Podsumowując, pracę oceniam pozytywnie i stwierdzam, że złożona rozprawa Daniela Kramarczyka spełnia wymagania określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. 2003 nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Dlatego też, moim zdaniem, Daniel Kramarczyk może zostać dopuszczony do dalszych procedur niezbędnych do uzyskania stopnia doktora.

Elżbieta Oliva



adres do korespondencji:
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116, budynek A27
tel. 42 631 32 05, fax 42 631 32 18,
www.kfm.p.lodz.pl, www.p.lodz.pl