



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej i Biofizyki

Kierownik: prof. dr hab. n. farm. Witold Musiał

Wrocław, dn. 22 kwietnia 2020 r.

**Ocena pracy doktorskiej mgr Heleny Barańskiej - asystenta w Katedrze i Zakładzie Farmacji
Stosowanej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

**pt. „Wpływ warunków sporządzania i składu mikrosfer lipidowych na ich penetrację do mieszków
włosowych” przygotowanej pod opieką promotorską dr hab. Krzysztofa Cala**

Wprowadzenie

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska Pani mgr Heleny Barańskiej, jest zwartym dziełem w formie książki, z odpowiednim układem edytorskim, a także właściwą szatą typograficzną. Autorka jest doktorantką na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku. Temat pracy badawczej dobrze koreluje z zainteresowaniami naukowymi Promotora, a jako pracę dotyczącą rozwoju nowych, innowacyjnych preparatów farmaceutycznych, realizowano ją we właściwym środowisku naukowym tj. na Wydziale Farmaceutycznym. Praca o tytule „Wpływ warunków sporządzania i składu mikrosfer lipidowych na ich penetrację do mieszków włosowych” zawiera sformalizowane części – praktyczną i teoretyczną, w tym: wstęp, cel pracy, opis stosowanych materiałów i metod badawczych, wyniki badań, wnioski i dodatki, takie jak spis tabel i rysunków, oraz piśmiennictwo wykorzystane w pracy.

Tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę jest uzasadniona – wprawdzie mieszki włosowe stanowią przydatek, który pokrywa ułamek powierzchni skóry, to jednak ich specyficzne właściwości stanowią o możliwości ich zastosowania w transporcie substancji leczniczej do i przez skórę. Autorka wpisała się w istotny w skali ogólnoswiatowej nurt poszukiwań transdermalnych i intradermalnych nośników substancji leczniczych. Być może wyniki przedstawione w pracy znajdą praktyczne zastosowanie w warunkach przemysłu farmaceutycznego.

Należy podkreślić, że niektóre leki przez mieszki włosowe mogą przenikać lepiej niż przez skórę właściwą, a małe cząstki lipidowe (w skali nano) mogą charakteryzować się szybszym transportem transfolikularnym, w porównaniu z ich ogólnie rozumianym transportem transdermalnym. Nie bez znaczenia jest potencjalne działanie ochronne otoczki lipidowej wobec substancji leczniczej, oraz potencjalny wzrost nawilżenia skóry po podaniu takiego nośnika. Często nanocząstki wytwarzane są z surowców o wysokiej biogodności, a zastosowanie ultrasonifikacji w miejsce homogenizacji szybkoobrotowej skutkuje niską polidispersyjnością ich rozproszeń. Jednak penetracja leku może zachodzić jedynie przez niewielką część mieszków, a struktura formulacji nie zawsze umożliwia wytworzenie zawiesiny o dostatecznie wysokim stężeniu mikronośników lub nanonośników. Możliwość przegrzania zawiesiny w czasie ultrasonifikacji dodatkowo utrudnia uzyskanie właściwych efektów homogenizacji. Kumulacja leku w mieszku może zapewniać korzystnie długotrwałe działanie substancji czynnej, jednak należy liczyć się z przekroczeniem dopuszczalnych stężeń leku miejscowo lub w osoczu krwi. Trzeba także pamiętać o aspekcie tzw. nanotoksyczności.

Ocena pracy badawczej

Wprowadzenie do tematyki badawczej, opisane we wstępie, jest zwarte i w prawidłowy sposób prezentuje najważniejsze założenia badań. Autorka przedstawia argumenty za możliwością podania leku drogą transfolikularną oraz wskazuje na obszary terapeutyczne, w których mechanizm ten mógłby znaleźć zastosowanie. Konsekwentnie, Doktorantka zarysowuje czytelnikowi jakie nowoczesne postaci leku mogą spełniać kryterium nośnika leku podawanego tą drogą.

W kolejnym rozdziale wprowadzającym Autorka w szczegółach prezentuje drogę transfolikularną, uwzględniając strukturę mieszka włosowego i włosa. Opierając się na aktualnej literaturze zaprezentowała problematykę obszaru „infundibulum” słusznie rozpoznając w nim region o istotnym znaczeniu dla penetracji substancji leczniczych do kompartmentu centralnego. Skromnie opisano znaczenie i skład lipofilowych składników łożu skórniego, które to składniki w istotny sposób mogą przyczyniać się do transportu transfolikularnego. Bardzo ciekawy podrozdział nt. budowy i rodzajów włosów ludzkich rzuca światło na możliwe, duże zróżnicowanie kinetyki transportu transfolikularnego wynikające z różnic osobniczych. Bardzo ciekawie prezentuje się skondensowany opis badań nad transportem transfolikularnym, w którym Doktorantka uwydatniła zagadnienia morfologiczne, istotne dla projektowania preparatów typu mikrocząstek lub nanocząstek. Szeroki opis nanocząstek pochodzenia lipidowego tworzy w pracy doktorskiej doskonałe tło międzynarodowych wysiłków na rzecz wykorzystania nanodispersji i mikrodispersji w przezskórnych i przemieszkowym transporcie substancji leczniczych. Autorka nie pomija problemów toksyczności, oraz nie uchyla się przed pytaniami o standaryzację badań tej toksyczności, które jak dotychczas nie zostały jeszcze w sposób satysfakcjonujący rozwiązane, nawet w ogólnodostępnych standardach farmaceutycznych. Podsumowaniem wprowadzenia jest wzmianka o sposobach planowania doświadczeń, szczególnie istotnych w dyscyplinie nauk farmaceutycznych, co wynika wprost z konieczności łączenia metod fizykochemicznych - takich jak badania rozpuszczalności, z przewidywaniami dotyczącymi ustalonych parametrów biologicznych - takich jak wchłanianie leku, w warunkach różnych wariantów kompozycyjnych.

Pani mgr Helena Barańska stawia sobie ciekawy cel, który dotychczas nie został w pełni zrealizowany w badaniach formulacyjnych prowadzonych w licznych ośrodkach naukowych na świecie. Doktorantka wyodrębnia kilka celów cząstkowych. Według mnie najciekawsze wprost są dwa etapy, zawarte w opisie celu rozprawy. Są to: wytwarzanie stałych cząstek lipidowych z zastosowaniem ultradźwięków oraz obrazowanie penetracji mikrosfer o różnych parametrach do mieszków włosowych. Pozostałe etapy porządkują proces badawczy, podczas gdy dwa wcześniej przytoczone

stanowią o dużym potencjale pracy doktorskiej i jej związkach z najważniejszymi zagadnieniami współczesnej farmacji. Tutaj recenzent proponowałby w przyszłości przyłożenie większej uwagi do sformułowań i sprawdzenia ewentualnych błędów edytorskich tak ważnego rozdziału jak cel pracy doktorskiej – strona 32, punkty czwarty i piąty.

Materiały i metody dobrano prawidłowo, oraz zamieszczono informacje o odpowiedniej zgodzie komisji ds. etyki badań naukowych. Na pochwałę zasługuje współpraca z zewnętrzną jednostką badawczą tj. z Centrum Naukowo – Badawczym dr Irena Eris. Badania trwałościowe prowadzono w akceptowalnym zakresie, aczkolwiek szkoda, że Autorka nie odnosi się do konkretnych wytycznych dotyczących np. cząstek lipidowych. Z tekstu rozdziału dotyczącego metodyki nie wynika, czy zaproponowany szereg badań jest rekomendowany przez ICH, czy też jakieś inne czynniki zaważyły na wyborze zastosowanych metod. Ponadto, w przypadku preparatów o strukturze lipidów, warto pamiętać o możliwości ich rozkładu chemicznego, a więc badania trwałości winny odzwierciedlać także ten aspekt. Alternatywnie, odstąpienie od tych badań powinno być uzasadnione, np. dobrze znaną trwałością matrycy w warunkach eksperymentu, co należało opisać. W badaniach potencjału elektrokinetycznego recenzent sugerowałby wyjaśnienie stosowania wody oczyszczonej w miejsce buforu. Oczywiście, konieczność standaryzacji metody, w kontekście badań preparatu lipofilowego, jest wyjaśnieniem akceptowalnym, jednak warto by wspomnieć o pogłębionej analizie odnoszącej się do warunków pH w obszarze folikularnym, co może być ciekawą kontynuacją badań. Kompozycja badanych układów obejmowała zaplanowanie zawartości emulgatora – w mojej opinii już na tym etapie warto by się pokusić o rozpatrzenie i interpretację wpływu równowagi hydrofilowo-lipofilowej samych emulgatorów oraz otrzymanych mieszanin - także ten aspekt może zaowocować ciekawymi wnioskami i nowym podejściem do ww. formulacji. Dużą wartością pracy są badania potencjału drażniącego i tolerancji skórnej, a ukoronowaniem ocena transportu mikrosfer w warunkach *ex vivo*. Ponadto w opisie metod zalecałbym stosowanie nazw międzynarodowych lub chemicznych składników kompozycji, bądź ich odpowiednich skrótów – język nauki winien być obiektywny także w zakresie prezentacji surowców pozyskanych z rynku.

Skondensowane wyniki pracy badawczej zamieszczono na ok. 25 stronach pracy doktorskiej, co jest niezłą relacją objętościową wobec 10 stron rzeczowej dyskusji. Autorka przedstawia w kolejnych podrozdziałach wpływ emulgatora i warunków procesowych na opisane wcześniej badane parametry – wielkość, potencjał elektrokinetyczny i stopień polidispersji. Tutaj recenzent chciałby zapytać, czy Doktorantka ma na myśli średnicę, czy też promień badanych cząstek. Przy tej okazji warto wspomnieć, że badana wielkość w warunkach pomiarów DLS odnosi się do tzw. średnicy hydrodynamicznej. Mimo tych uwag wyniki posiadają duży potencjał informacyjny oraz praktyczny, który pozwolił Autorce na wybór zoptymalizowanego składu, o cechach umożliwiających penetrację leku do jednostki włosowo-łojowej, a jednocześnie znamionujących akceptowalną trwałość preparatu. Należy pochwalić Kandydatkę, za przebadanie wpływu środka konserwującego na właściwości cząstek – aspekt ten, mimo że bardzo istotny, bywa pomijany nawet w szerokich pracach badawczych. Szereg bardzo ciekawych wyników zestawia Doktorantka w zakresie badań potencjału drażniącego oraz tolerancji skórnej. Zamieszczone na stronach 60-68 zdjęcia mikrotomowe skóry, wraz z wykresami intensywności fluorescencji w poszczególnych warstwach skóry, ujawniają znakomicie dobre wyniki pracy badawczej Doktorantki. Zestawienie wyników jest konsekwentne i systematyczne, a dużo wnoszą wykresy na końcu rozdziału dołączone do zdjęć mikrotomowych.

Kandydatka, w dyskusji liczącej ok. 10 stron w usystematyzowany sposób omawia wpływ zastosowanych emulgatorów oraz sposobu prowadzenia procesu sonifikacji na właściwości otrzymanych mikrosfer lipidowych. Wydaje się, że zaproponowane określenie średnicy mikrosfer jako

650 nm jest adekwatne do postawionego przez Autorkę celu. Zawitości optymalnego poziomu potencjału elektrokinetycznego, w opinii recenzenta, łatwiej byłoby dyskutować ograniczając się do pojęcia wartości bezwzględnej tego potencjału. Fakt, że praca ma charakter technologiczny, nie zwalnia Kandydatki z odniesienia się w dyskusji do badań prowadzonych na poziomie molekularnym. W szczególności złożoność zagadnienia układów wytwarzanych z wykorzystaniem zjawisk na granicy dwóch faz: polarnej i niepolarniej, wymaga przywołania badań podstawowych oraz zahaczenia o analizę struktury i wpływu grup hydrofilowych, i lipofilowych, na przebieg ocenianego procesu. Autorka na pewno poczyniła już pewne przygotowania w tym kierunku i recenzent rekomenduje prezentację takich danych w przyszłych publikacjach tworzonych na bazie otrzymanych wyników. Słusznie zauważa Autorka, że moc zastosowana w przebiegu sonifikacji jest jednym z bardzo ważnych czynników, podczas gdy czas procesu, w odpowiednich zakresach, ma zazwyczaj mniejsze znaczenie. Należy podkreślić, że próba łączenia emulgatora typu Tween 80 z emulgatorem typu Tego Care 450 zasadniczo winna być poprzedzona analizą równowagi lipofilowo-hydrofilowej i być może tutaj należy upatrywać niepowodzenia w próbie uzyskania zoptymalizowanej receptury – warto by to rozwinąć jako ciekawy przykład oddziaływań grup o różnych właściwościach. Na pochwałę natomiast zasługuje, jak to już wspomniałem poprzednio, analiza wpływu konserwantów na właściwości otrzymanych struktur lipofilowych. Wpływ konserwantów, jak to zaznacza Kandydatka, jest rzadko badany, i dobrze że udało się wygospodarować rozdział w niniejszej pracy prezentujący te zagadnienia. Bardzo ciekawe wyniki badań działania drażniącego mogą stanowić punkt wyjścia do poszerzenia tej tematyki w przyszłości. Dyskusja ukoronowana jest szczegółowym omówieniem przenikania otrzymanych cząstek do mieszków włosowych z wykorzystaniem metod fluorescencyjnych Autorka wyróżnia formułacje o korzystnych właściwościach penetracyjnych. Z obowiązku recenzent przypomina, że formułacja nie może mieć wielkości np. 190 nm lub 350 nm, a raczej jest to wielkość – tutaj należałoby określić czy średnica czy promień - badanych mikrocząstek.

Wnioski sformułowano prawidłowo, na podstawie wyników przeprowadzonych badań; wykazono ważny dla dalszego rozwoju tematu fakt, że jeden z emulgatorów umożliwia wykonanie mikrocząstek o średnicy ok. 260 nm, a ich potencjał elektrokinetyczny przyjmuje bezwzględną wartość 38 mV, podano także optymalną moc sonifikacji ultradźwiękowej i korzystne stężenie emulgatora. Wskazano, że ww. formułacje z wybranym emulgatorem, z dużym prawdopodobieństwem będą bezpieczne w stosowaniu. Jako wniosek ostatni, ale bardzo ważny, Kandydatka wymienia znaczącą penetrację tych cząstek do jednostki włosowo-łojowej.

Podsumowanie

Podsumowując: zgodnie z szerokim zestawieniem wyników eksperymentów, przeprowadzonych w biegu systematycznych badań na szeregu modelowych układów lipidowych z emulgatorami, w prezentowanej pracy doktorskiej wykazano możliwość uzyskania struktur typu mikrocząstek lipidowych, których główną właściwością jest penetracja do obszaru jednostki włosowo-łojowej. Tym samym Doktorantka zrealizowała w stopniu zadowalającym podstawowy cel badań, jakim była ocena wpływu warunków sporządzania i składu mikrosfer lipidowych na ich penetrację do mieszków włosowych. Autorka ustaliła korzystne parametry procesu i odpowiedni skład surowcowy, a w badaniach powiązanych z głównym tematem wskazała na dodatkowe ważne parametry procesu, takie jak obecność konserwantów. Na podstawie dostarczonej mi dokumentacji stwierdzam, że Kandydatka zaangażowała się w pracę badawczą na wystarczającym poziomie naukowym, właściwie zaplanowała prace badawcze, wykonała szereg czynności eksperymentalnych, dokonała odpowiedniej interpretacji wyników opierając się na dostępnych danych z literatury krajowej i światowej. Wnioski są wystarczające i mogą być wykorzystane przez bliższe i dalsze otoczenia naukowe Kandydatki.

Doktorantka zaprezentowała wyniki swoich badań, które mają wartość poznawczą, zgodnie z obowiązującymi w nauce zasadami. Warto podkreślić sporą wartość praktyczną prowadzonych badań w kontekście rozwoju nowych systemów do terapii intradermalnej i transdermalnej. Dysertacja jest ciekawym rozwiązaniem problemów naukowych postawionych przez Doktorantkę i dlatego przedkładam Panu Dziekanowi i Wysokim Władzom Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Heleny Barańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, zgodnie z zapisami ustawowymi.

Prof. dr hab. Witold Musiał

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
CHEMII FIZYCZNEJ I BIOFIZYKI
kierownik
prof. dr hab. Witold Musiał