



dr hab. Bożena Karolewicz, prof. uczelni
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. Borowska 211a; 50-556 Wrocław
tel. (71) 784 03 24, faks (71) 784 03 17
bozena.karolewicz@umw.edu.pl

Wrocław, 28 października 2021 r.

OCENA
rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Krenczkowskiej

pt. „Ocena barierowości skóry ludzkiej *ex vivo* wobec niskocząsteczkowych siloksanów o strukturze cyklicznej”.

**wykonanej pod kierunkiem naukowym promotora dr hab. n. farm. Krystyny
Mojsiewicz-Pieńkowskiej – w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

Wykorzystanie polisiloksanów jako substancji aktywnej czy pomocniczej w zastosowaniach farmaceutycznych, medycznych, kosmetycznych wiąże się z długą historią ich stosowania i jednocześnie wysoką stabilnością chemiczną oraz podkreślaną znikomą reaktywnością. W produktach przeznaczonych do użytku zewnętrznego silikony pełnią rolę nośników substancji aktywnych, będąc bardzo popularnym składnikiem m.in.: kremów, żeli, płynów stosowanych na skórę, produktów kosmetycznych i do pielęgnacji ciała. Z uwagi na szerokie stosowanie tej grupy związków w aplikacji na skórę, istotna jest weryfikacja bezpieczeństwa ich stosowania poprzez wymagającą ocenę ryzyka pokonywania bariery skórnej, drogi i stopnia penetracji substancji do kolejnych warstw skóry, czy ich możliwa kumulacja. W tym kontekście przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska prezentuje wielokierunkowe podejście do oceny bezpieczeństwa stosowania siloksanów o budowie cyklicznej jako popularnych składowych produktów do stosowania na skórę, co niewątpliwie posłuży dalszemu rozwojowi wiedzy na temat bezpieczeństwa, przewidywania narażenia i potencjalnej ich absorpcji przy miejscowym stosowaniu. Biorąc pod uwagę podkreślane w piśmiennictwie szerokie zastosowanie aplikacyjne siloksanów i podnoszoną niekompletność publikowanych danych odnośnie ich przenikania, podjęta przez Doktorantkę próba scharakteryzowania mechanizmu pokonywania bariery skórnej przez siloksany D4, D5, D6, odpowiednio oktametylocykloheksasiloksan, dekametylocyklopentasiloksan, dodekametylocykloheksasiloksan, stanowi ważny głos w dyskusji o narażeniu

na te popularne związki, jednocześnie przyczyniając się do wskazania pochodnej o największym stopniu bezpieczeństwa i uzupełnienia danych dotyczących barierowości *stratum corneum*.

W zaprezentowanym w rozprawie 5 cyklu spójnych tematycznie publikacji (2 przeglądowych i 3 oryginalnych) Doktorantka, jako cel główny wskazuje ocenę barierowości skóry ludzkiej *ex vivo* wobec 3 niskocząsteczkowych siloksanów o strukturze cyklicznej, poprzez:

- ocenę zdolności ich penetracji do warstwy rogowej naskórka (*stratum corneum*),
- ocenę głębokości ich przenikania do naskórka żywego (*epidermidis*) i skóry właściwej (*dermis*),
- wskazanie prawdopodobnej drogi wnikania związków,
- analizę ich dawek skumulowanych we frakcjonowanych warstwach skóry oraz płynie akceptorowym,
- ocenę ich interakcji ze składnikami *stratum corneum*.

Biorąc pod uwagę założone cele, jakie postawiła sobie Doktorantka, należy uznać, iż w przedstawionej do oceny rozprawie, zostały one zrealizowane w pełni.

W pierwszych dwóch pracach przeglądowych z cyklu przedstawionego do oceny mgr Dominika Krenczkowska przeanalizowała dane z piśmiennictwa odnośnie charakterystyki, bezpieczeństwa i ewolucji kierunku rozwoju oraz świadomości narażenia na siloksany. Takie podejście pozwoliło na sformułowanie wniosków odnośnie wpływu budowy cząsteczki siloksanu na przenikanie błon biologicznych i bariery skórnej, ich charakteru amfifilowego, kwestii metod syntezy korzystniejszych dla profilu zanieczyszczeń związków, czy bezpieczeństwa w kontakcie ze skórą. Wskazywana w podsumowaniu publikacji 2. z cyklu ewolucja świadomości narażenia na siloksany potwierdza aktualność podjętej tematyki, konieczność stałego monitoringu narażenia, prowadzenia badań i zbierania danych odnośnie identyfikacji skutków oddziaływania tych związków.

W kolejnej 3 publikacji doświadczalnej Doktorantka posługując się zaawansowanymi technikami analitycznymi (ATR-FTIR, mikroskopii fulorescencyjnej, GC-FID) oceniała proces dyfuzji, próbując wyjaśnić mechanizm penetracji i przenikania cyklicznych siloksanów przez skórę, wskazując na ilościowe różnice w absorpcji do krwioobiegu siloksanów D4 i D5 w stosunku do D6, który ze względu na najniższe ryzyko absorpcji stanowi najmniejsze zagrożenie dla aplikacji na skórę. Istotny w pracy jest wniosek odnośnie wpływu synergizmu działania czynników tj. m.in.: właściwości fizykochemiczne, budowa strukturalna skóry, gradient stężeń, na proces dyfuzji związków i skutki oddziaływań z lipidami i białkami.

W kolejnej publikacji 4. wykorzystując i walidując zaawansowane narzędzie analizy - technikę GC-FID zaprezentowano pogłębioną dyskusję na temat mechanizmu wnikania cyklicznych siloksanów do skóry. Przeprowadzona walidacja metody dowiodła jej przydatności w ocenie pokonywania bariery skórnej i spełnienia kryteriów akceptacji techniki do badań bioanalitycznych, dodatkowo duża, wybrana liczebność próbek potwierdziła istotną wartość pracy w badaniach prowadzonych na skórze jako ocenianym materiale. Zastosowane w pracy, nie spotkane dotąd w ocenie nowe podejście, do obliczenia stosunków dawek skumulowanych oznaczonych dla sąsiadujących warstw skór, w mojej ocenie jest cenne dla dalszej oceny mechanizmu wnikania siloksanów do warstw skóry o zróżnicowanych właściwościach i zbliża nas do wypracowania rekomendacji odnośnie metodyki i oceny prowadzenia tego typu badań.

W publikacji 5. z cyklu z wykorzystaniem do wizualnego obrazowania transmisyjnego mikroskopu holograficznego przedstawiono wpływ siloksanów na strukturę *stratum corneum*, oceniając zarówno jakościowe zaburzenie jej struktury pod wpływem działania związków, jak również na podstawie analizy statystycznej wpływ ilościowy po aplikacji siloksanów na zmiany strukturalne skóry tj. wielkość korneocetów oraz luk, różnic fazowych odzwierciedlających zmianę topografii skóry. Zastosowane w pracy nowatorskie podejście niewątpliwie poszerza wiedzę odnośnie mało rozpoznanej i opisanej struktury klasterów i kanionów, a zaproponowanie koncepcji opisu bariery skórnej z 3-poziomą organizacją struktury warstwy rogowej stanowi o wysokiej jakości i innowacyjności pracy przedstawionej.

Na uwagę w prowadzonych badaniach zasługuje wykorzystanie przez Doktorantkę zaawansowanej metodologii badań analitycznych. W pracy zoptymalizowano i wykorzystano nowoczesne techniki analityczne: spektroskopię osłabionego całkowitego odbicia w zakresie podczerwieni (ATR-FTIR) dla określenia wzajemnych interakcji pomiędzy substancjami i składnikami skóry oraz próby wyjaśnienia mechanizmu ich wnikania, wysoko specyficzną metodę chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID) do weryfikacji zdolności substancji do pokonywania skóry i oceny ilościowej zjawiska oraz 2 metody mikroskopowe: mikroskopię fluorescencyjną i po raz pierwszy zastosowaną do obrazowania skóry cyfrową transmisyjną mikroskopię holograficzną (DEM).

Przedstawione na zakończenie dysertacji obszernie podsumowanie, w sposób przejrzysty uzasadnia zaprojektowany schemat badań i dobór metod analitycznych w ocenie barierowości skóry. W tej części Doktorantka przedstawiła 5 wniosków końcowych, które wyczerpują wskazane cele i założenia rozprawy. O dojrzałości naukowej Doktorantki świadczy zamieszczona w tej części odpowiedź na sformułowane hipotezy badawcze i istotne podkreślenie aspektu praktycznego pracy. Dodatkowo załączona w dysertacji lista 267. pozycji aktualnego

piśmiennictwa, świadczy o znajomości i gruntownej analizie podjętej tematyki w świetle najnowszych doniesień literaturowych.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań zostały przedstawione w 3 publikacjach oryginalnych z zakresu nauk farmaceutycznych oraz 2 pracach przeglądowych, wszystkich znajdujących się w kwartyle Q1, o sumarycznym współczynniku wpływu cyklu *Impact Factor* równym 27,530 (punktacja MNiSW 415 pkt.). W przedstawionych do cyklu 2 pracach oryginalnych mgr Dominika Krenczkowska jest pierwszym autorem, a załączone oświadczenia współautorów o udziale Doktorantki w postawianiu tych publikacji, potwierdzają jej znaczący wkład w planowanie, wykonanie badań oraz opis i interpretację otrzymanych danych doświadczalnych. W 2 pracach przeglądowych wskazano na udział Doktorantki w gromadzeniu i analizie piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptów i krytycznej ocenie dokonanego przeglądu, a w 5. pracy oryginalnej w cyklu na Jej rolę w opracowaniu metodologii, walidacji, prowadzeniu eksperymentów, analizie danych i pisaniu manuskryptu.

Do najważniejszych walorów recenzowanej rozprawy zaliczam:

- istotność i aktualność wybranej tematyki, w tym pogłębienie dotychczasowej wiedzy nt. budowy strukturalnej skóry i procesów pokonywania tej bariery przez ksenobiotyki,
- potwierdzenie przenikania silkoksanów do głębszych warstw skóry, w tym ocenę ich biokumulacji i interakcji ze składnikami strukturalnymi *stratum corneum* oraz białkami,
- opracowanie nowych zaawansowanych technik badania skóry tj. cyfrowa mikroskopia holograficzna, czy walidacja techniki GC-FID do zastosowania w badaniach bioanalitycznych,
- analizę dawek skumulowanych siloksanów w warstwach skóry i płynie akceptorowym,
- opartą na analizie piśmiennictwie i uzyskanych wynikach interpretację mechanizmu wnikania siloksanów do skóry,
- po przeprowadzonej ocenie zdolności do biokumulacji wskazanie najbardziej bezpiecznej pochodnej dla produkcji preparatów na skórę.

Na zakończenie chciałabym podkreślić, iż zaprezentowany w dysertacji problem naukowy, interdyscyplinarny warsztat badawczy i analiza wyników stanowią o wysokiej wartości poznawczej i porządkującej dostępną wiedzę zarówno w obszarze opisu budowy bariery, zaawansowanych metod badań skóry, jak i stosowania substancji czynnych tj. np. siloksany, nie

pozostającej bez wpływu na aspekt praktyczny poruszanej problematyki bezpieczeństwa stosowania tych związków w produktach leczniczych, wyrobach medycznych, kosmetykach i innych produktach do stosowania na skórę. W mojej opinii praca wychodzi naprzeciw stawianym oczekiwaniom, iż prowadzone prace naukowe pozwolą na większe zrozumienie mechanizmów wnikania substancji do warstw skóry i tym samym przełożą się na wybór jako składowych formuacji produktów substancji o najbardziej optymalnych właściwościach i najważniejsze profilu bezpieczeństwa obejmującym wymagającą ocenę biokumulacji, czy stopnia absorpcji substancji do układu krążenia.

Podsumowując oceniana rozprawa doktorska mgr Dominiki Krenczkowskiej pt. „Ocena barierowości skóry ludzkiej *ex vivo* wobec niskocząsteczkowych siloksanów o strukturze cyklicznej” stanowi oryginalne opracowanie naukowe, poruszające zaawansowane zagadnienia bezpieczeństwa stosowania wspomnianych siloksanów, wnosząc nową wiedzę do metod oceny bezpieczeństwa substancji w aplikacji miejscowej i przyjętej koncepcji barierowości *stratum corneum*. Rozwiązywane problemy badawcze są innowacyjne i aktualne. Przedstawiona rozprawa spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Dominiki Krenczkowskiej do dalszych etapów postępowania w celu nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Jednocześnie korzystając z przysługującego recenzentowi prawa wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Dariusz Krawczyk', is written in a cursive style.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
TECHNOLOGII POSTACI LEKU
ul. Borowska 211 A, 50-556 Wrocław
tel. 71/ 784-03-15, faks. 71/ 784-03-17

Pieczętka jednostki organizacyjnej recenzenta

Borena Kancelaria

Imię i nazwisko recenzenta

Dr hab. i prof. uczeni

Tytuł/stożenie naukowe/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko doktoranta: **mgr farm. Dominika Krenczkowska**

Tytuł pracy doktorskiej: **Ocena barierowości skóry ludzkiej ex vivo wobec niskocząsteczkowych siloksanów o strukturze cyklicznej**

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszy zwracam się z wnioskiem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie:

Oceniłem rozprawę doktorską mgr Dominiki Krenczkowskiej. Stanowi oryginalne opracowanie naukowe, promujące zaawansowane zagadnienie bezpieczeństwa stosowania siloksanów cyklicznych w aplikacji miejscowej na skórę, stosując nowe metody do metod oceny bezpieczeństwa tych substancji i przysiężając dotychczasowej koncepcji barierowości skłonu corneum. Rozstrzygnie trudne problemy teoretyczne i aktualne. Nie podlegałoby zastępowanie znaczących wyników badań albo oceny penetrowania siloksanów do głębszych warstw skłonu, ich bioakumulacji i interakcji ze składnikami strukturalnymi skłonu corneum. Wysoce oceniam opracowanie nowych koncepcyjnych technik badania skóry tj. cyfrowe mikroskopie koleprofiowa i zastosowanie oraz walidacja metody GC-FID w badaniach bioanalitycznych. Wyniki prowadzonej analizy pisemnej i prac dyscyplinarnych zostały opublikowane w 5 publikacjach naukowych, z czego najszersze w J. Kmetzka 0/1, o sumarycznym IF dla cyklu wynoszącym 25,530 (pkt. MN:SN = 415 pkt.), w których to 2 pracach Doktorantka jest pierwszą autorką.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
TECHNOLOGII POSTACI LEKU
kierownik

Borena Kancelaria

podpis i pieczętka recenzenta

Zasady wyróżniania pracy doktorskiej

uchwalone przez Radę WF z OML w dniu 16.09.2014 r.

Praca doktorska może zostać wyróżniona przez Radę Nauk Farmaceutycznych poprzez podjęcie stosownej uchwały jeżeli spełnione są jednocześnie wszystkie warunki:

1. Wszyscy recenzenci pracy doktorskiej wystąpili w ramach przedłożonych pisemnych opinii z wnioskami wraz z uzasadnieniem o wyróżnienie pracy doktorskiej (załącznik nr 1). Wnioski o wyróżnienie składane w trakcie obrony pracy doktorskiej nie są rozpatrywane.
2. Po publicznej obronie wszyscy recenzenci podtrzymują (w formie ustnej) wniosek o wyróżnienie pracy.
3. Wyniki badań będących przedmiotem pracy zostały, do dnia przyjęcia pracy doktorskiej przez Radę Wydziału, ogłoszone w formie publikacji lub cyklu publikacji w czasopiśmie o łącznym współczynniku oddziaływania (*impact factor, IF*) wynoszącym co najmniej 3,0 (wartość IF wg JCR z roku opublikowania pracy). Doktorant w co najmniej jednej publikacji jest pierwszym współautorem. Artykuły przyjęte do druku uważa się za opublikowane.
4. Średnia wszystkich ocen z egzaminów doktorskich jest nie niższa niż 4,5 przy czym z dyscypliny podstawowej – jest ocena 5.

RNF podejmuje uchwałę o wyróżnieniu pracy doktorskiej w tajnym głosowaniu większością $\frac{2}{3}$ głosów. Wyróżnienie następuje w dniu nadania stopnia doktora. Uzyskanie wyróżnienia uprawnia do ubiegania się o przyznanie nagrody naukowej Rektora GUMed.

Zasady wyróżniania osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym

uchwalone przez Radę WF z OML w dniu 16.09.2014 r.

Osiągnięcie naukowe może zostać wyróżnione przez Radę Nauk Farmaceutycznych poprzez podjęcie stosownej uchwały, na wniosek Komisji Habilitacyjnej powołanej do przeprowadzenia postępowania habilitacyjnego z inicjatywy wszystkich recenzentów, jeżeli wyniki badań, stanowiące osiągnięcie naukowe, będące przedmiotem postępowania habilitacyjnego zostały ogłoszone w formie cyklu publikacji w czasopiśmie o łącznym współczynniku oddziaływania (*impact factor, IF*) wynoszącym co najmniej 15,0 (wartość IF wg JCR z roku opublikowania pracy).

RNF podejmuje uchwałę o wyróżnieniu osiągnięcia naukowego w tajnym głosowaniu, większością $\frac{2}{3}$ głosów. Wyróżnienie następuje w dniu nadania stopnia doktora habilitowanego. Uzyskanie wyróżnienia uprawnia do ubiegania się o przyznanie nagrody naukowej Rektora GUMed.