



Zakład Farmacji Stosowanej
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
ul. Mickiewicza 2c, 15-222 Białystok
tel.: 85-748-56-15; fax.: 85-748-56-16
e-mail: katarzyna.winnicka@umb.edu.pl



Białystok, 26 października 2021 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

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

mgr Dominiki Krenczkowskiej

wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. farm. Krystyny Mojsiewicz-Pieńkowskiej
w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik
Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej: prof. dr hab. n. farm. Wiesław Sawicki)

Skóra jest najłatwiej dostępnym i największym organem człowieka – powierzchnia skóry osoby dorosłej wynosi ok. 1,7 – 2 m². Przez wiele lat leki na skórę stosowano jedynie w celu wywołania działania miejscowego. Obecnie coraz większe znaczenie odgrywiają preparaty aplikowane na skórę w celu leczenia stanów zapalnych tkanek głębszych – mięśni i stawów, a nawet preparaty podawane w celu wywołania działania ogólnego. Działanie leku nieograniczone tylko do warstw skóry możliwe jest dzięki wchłanianiu do głębiej położonych tkanek czy do krwiobiegu. Skóra stanowi łatwo dostępne miejsce aplikacji leków, jest jednak także niezwykle istotną barierą chroniącą organizm przed niekorzystnym wpływem czynników zewnętrznych, co uniemożliwia jej szersze wykorzystanie jako drogi podania leków o działaniu ogólnym. Najważniejszą barierą w przenikaniu substancji chemicznych przez skórę jest warstwa rogowa (*stratum corneum*), która pomimo małej grubości, skutecznie utrudnia dyfuzję. Ścisłe ułożenie zrogowaciałych komórek oraz lipidy obecne w przestrzeniach międzykomórkowych stanowią silną barierę, mającą na celu ochronę organizmu przed wpływem środowiska zewnętrznego oraz utratą substancji endogennych i wody. Przenikanie leku przez skórę zachodzi poprzez proces dyfuzji, jednak na przebieg wchłaniania wpływa wiele czynników. Ich poznanie przyczynia się nie tylko do

opracowywania skutecznych leków, ale również do oceny bezpieczeństwa produktów aplikowanych na skórę.

Obserwowana obecnie coraz większa świadomość zagrożeń związanych z podawaniem substancji chemicznych na skórę niesie ze sobą potrzebę wiarygodnego określenia ryzyka pokonywania przez nie bariery skórnej, a tym samym ocenę bezpieczeństwa ich stosowania. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w aktualny nurt prowadzonych badań w zakresie udoskonalania technik wykorzystywanych w analizie barierowości skóry. Postawione przez Doktorantkę w rozprawie hipotezy badawcze z uzasadnieniem wyboru podjętej tematyki badawczej nie budzą moich zastrzeżeń. Autorka stawia sobie za zadanie odpowiedź na pytanie czy niskocząsteczkowe siloksany o cyklicznej strukturze (tzw. silikony), które są bardzo często stosowane zarówno w produktach leczniczych na skórę, jak i w preparatach kosmetycznych pokonują barierę skórną oraz jaki jest prawdopodobny mechanizm ich penetracji. Jasno sprecyzowane cele naukowe obejmowały: 1) ocenę barierowości skóry ludzkiej *ex vivo* wobec trzech siloksanów (oktametylocyklotetrasiloksan – D4, dekametylocyklopentasiloksan – D5, dodekametylocykloheksasiloksan – D6) poprzez zbadanie zdolności penetracji warstwy rogowej naskórka oraz głębokości przenikania tych związków do naskórka żywego i skóry właściwej; 2) analizę dawek skumulowanych we frakcjonowanych warstwach skóry i płynie akceptorowym; 3) wstępną ocenę interakcji siloksanów z lipidami i białkami. Warto podkreślić, że badania poszerzono o ocenę różnic w barierowości skóry pomiędzy skórą mrożoną a niemrożoną, co miało na celu określenia wiarygodności wyników uzyskiwanych z wykorzystaniem materiału biologicznego *ex vivo*.

Struktura rozprawy

Rozprawa doktorska mgr farm. Dominiki Krenczkowskiej wykonana pod kierunkiem dr hab. n. farm. Krystyny Mojsiewicz-Pieńkowskiej stanowi opracowanie liczące 109 stron, do którego dołączono cykl pięciu publikacji (3 eksperymentalnych i 2 poglądowych) oraz 1 manuskrypt w recenzji. Obejmuje streszczenie, streszczenie w języku angielskim oraz 6 rozdziałów: część teoretyczną, cel pracy i hipotezę badawczą, część doświadczalną: materiały i metody badawcze oraz uzyskane osiągnięcia i wyniki badań (z odniesieniem do poszczególnych publikacji), podsumowanie i wnioski, bibliografię, oraz załączniki – artykuły naukowe i oświadczenia współautorów.

W obszernej części teoretycznej Autorka szczegółowo przedstawiła zagadnienia wprowadzające czytelnika w tematykę prac nad barierowością skóry ludzkiej – scharakteryzowała budowę skóry oraz mechanizmy/drogi wnikania substancji przez i do

skóry. Opisane zagadnienia stanowią cenne źródło informacji, prawidłowo udokumentowane aktualnymi danymi z piśmiennictwa. W podrozdziale 1.3. „*Uzasadnienie podjęcia badań*” Autorka stwierdza, iż analiza dostępnej literatury pozwala stwierdzić, że prowadzone dotychczas badania nad przenikaniem siloksanów do organizmu człowieka są niekompletne i nie stanowią podstawy do traktowania tych związków jako substancji o znikomym przenikaniu do organizmu człowieka. W rozdziale II „*Cel pracy i hipoteza badawcza*” Doktorantka w sposób klarowny sprecyzowała zadania badawcze i sformułowała hipotezę badawczą, na podstawie której założyła, że analizowane siloksany są w stanie pokonać barierę skóry ludzkiej, a jako dodatkową prawdopodobną drogę wchłaniania przez skórę można rozważyć penetrację przez międzyklastrowy region, tzw. kaniony otaczające skupiska korneocytów w postaci klastrów.

Praca doktorska Pani mgr Dominiki Krenczkowskiej stanowi przemyślane rozwiązanie szeregu problemów naukowych opartych o prawidłowo postawione hipotezy i cele badawcze. Wszystkie zadania zostały właściwie zaplanowane i zrealizowane, począwszy od przygotowania próbek skóry do badań, przeprowadzenia badania dyfuzji ksenobiotyków przez skórę w oparciu o aktualne wytyczne OECD i WHO poprzez ocenę dyfuzji transdermalnej z wertykalnymi komorami dyfuzyjnymi Franza, zgodnymi z wymaganiami FDA i Farmakopei Amerykańskiej. Podkreślić należy, że zaplanowane badania wymagały indywidualnego opracowania procedur analitycznych uwzględniających specyficzną wobec analitów oraz niską granicę oznaczalności. Do identyfikacji siloksanów wykorzystano spektroskopię osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR) oraz chromatografię gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID), do oceny dróg wnikania siloksanów do skóry zastosowano mikroskopię fluorescencyjną, mikroskopię holograficzną, a do wstępnego określenia interakcji ze składnikami strukturalnymi *stratum corneum*, siloksan-lipidy oraz siloksan-białka – spektroskopię osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR), mikroskopię fluorescencyjną oraz mikroskopię holograficzną. Podkreślić należy, że warsztat laboratoryjny Pani mgr D. Krenczkowskiej stanowią nowoczesne i trudne techniki analityczne. Większość badań Doktorantka przeprowadziła samodzielnie, a część we współpracy (z dr hab. Bartoszem Wielgomasem z Katedry i Zakładu Toksykologii i z prof. Krzysztofem Calem z Katedry i Zakładu Farmacji Stosowanej macierzystego Wydziału, czy z Panią prof. dr hab. Ewą Stachowską z Zakładu Metrologii i Systemów Pomiarowych Instytutu Technologii Mechanicznej Centrum Mechatroniki, Biomechaniki i Nanoinżynierii Politechniki Poznańskiej w ramach wyjazdów naukowych z Panią promotorem dr hab. Krystyną Pieńkowską).

W podrozdziale 3.2. „*Uzyskane osiągnięcie i wyniki badań*”, Autorka opisuje stan wiedzy dotyczący siloksanów oraz efekty przeprowadzonych doświadczeń w odniesieniu do pięciu artykułów i manuskryptu jeszcze nieopublikowanego. W publikacji 1 (przeglądowej) podejmuje dyskusję na temat bezpieczeństwa lub ryzyka stosowania siloksanów na skórę. Stwierdza, że niskocząsteczkowe siloksany o budowie cyklicznej (D4, D5, D6) stanowią potencjalnie największe zagrożenie dla człowieka, ponieważ charakteryzują się większą zdolnością pokonywania barier komórkowych oraz zdolnością do kumulacji w organizmie. W drugiej publikacji przeglądowej opisano możliwości wykorzystywania siloksanów w przemyśle oraz ewolucję świadomości narażenia na te związki - od stwierdzenia ich obojętności fizjologicznej i środowiskowej, do uznania konieczności stałego monitorowania stężeń tych związków w odniesieniu do różnych próbek (biologicznych, środowiskowych), ale także w produktach leczniczych, wyrobach medycznych i kosmetykach. Wskazano ponadto na konieczność prowadzenia badań mających na celu zidentyfikowanie skutków oddziaływań siloksanów na organizm człowieka.

W publikacji 3 (praca doświadczalna *Chemosphere* 2019, 231, 607-623) przedstawiono zdolność wybranych siloksanów o budowie cyklicznej (D4, D5, D6) do pokonywania bariery skórnej oraz analizę dawek skumulowanych w poszczególnych warstwach skóry i płynie akceptorowym. Określono także drogi transportu do skóry, zidentyfikowano potencjalne interakcje z lipidami i białkami obecnymi w warstwie rogowej naskórka. Warto wspomnieć, że w Tabeli 3 (str. 65) zaprezentowano materiał dodatkowy – wyniki niezawarte we wspomnianej publikacji, dotyczące bardzo trudnego procesu optymalizacji rejestracji widm ATR-FTIR próbek skóry z wykorzystaniem trzech technik.

Publikacja 4 (*Pharmaceutics* 2020, 12, 586) dotyczy walidacji procedury analitycznej oznaczania siloksanów D4, D5 i D6 z wykorzystaniem chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym GC-FID, zgodnie z wytycznymi dla metod bioanalitycznych opublikowanymi przez *International Conference on Harmonization* (ICH), FDA i EMA. W pracy tej wykazano, że opracowana metoda oznaczania siloksanów jest szybka, specyficzna i jest użytecznym narzędziem do oceny zdolności pokonywania przez nie bariery skórnej. Rozwiązano problem praktyczny związany z zapewnieniem specyficzności metody, poprzez oddzielenie pików matrycy od pików wzorca wewnętrznego i analitów. Metoda ta może być również przydatna do analizy innych związków liofilowych w matrycach frakcjonowanych warstw ludzkiej skóry. We wspomnianej publikacji przedstawiono także dyskusję na temat mechanizmu wnikania badanych siloksanów do skóry.

Kolejna praca doświadczalna (publikacja 5, *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6375) dotyczy oceny przydatności wykorzystania nowoczesnej techniki mikroskopii – cyfrowej transmisyjnej mikroskopii holograficznej w badaniach skóry. Powstała ona we współpracy z prof. dr hab. Ewą Stachowską z Zakładu Metrologii i Systemów Pomiarowych Politechniki Poznańskiej. W pracy przedstawiono wpływ badanych siloksanów na strukturę *stratum corneum*, a przeprowadzone badania przyczyniły się do pogłębienia stanu wiedzy na temat klastrów i kanionów. Dzięki przeprowadzonym badaniom zaproponowano innowacyjną koncepcję opisu barierowości skórnej jako 3-poziomowej organizacji struktury *stratum corneum*.

Manuskrypt stanowiący integralną część badań poświęcony jest ocenie wpływu mrożenia skóry *ex vivo* na dyfuzję substancji do skóry. Wykazano, że przechowywanie skóry w temp. – 20 st. C przez 14 dni nie wpłynęło na jakość uzyskiwanych wyników oraz nie zmieniło mechanizmu dyfuzji do skóry i przenikania przez poszczególne warstwy skóry.

W odniesieniu do zaprezentowanych w publikacjach (nr 3-5) badań nasuwają się następujące pytania:

1. Czym kierowano się przy wyborze do badania przenikania komór Franza o pojemności 4 ml?
2. Czy były prowadzone badania dotyczące optymalizacji składu płynu akceptorowego? (płyn w badaniach stanowił roztwór chlorku sodu z dodatkiem 2% igepalu jako surfaktanta i azydku sodu jako środka konserwującego). Dlaczego zastosowano igepal - czy podejmowane były próby z innymi związkami powierzchniowo czynnymi? Jaka była rozpuszczalność poszczególnych siloksanów?
3. Czy integralność skóry była oceniana również po przeprowadzeniu badania przenikania?
4. Czy nie warto byłoby w przyszłości w celu dokonania pełnej oceny cytotoksyczności zastosować, poza testem MTT, dodatkowe metody, np. z wykorzystaniem cytometru przepływowego?

Wysoko oceniam rangę i znaczenie bez wątpienia wielokierunkowych badań podjętych w zespole badawczym Pani dr hab. Krystyny Mojsiewicz-Pieńkowskiej przedstawionych przez mgr Dominikę Krenczkowską. Lektura rozprawy uprawnia mnie do stwierdzenia, że Doktorantka wykazała się zdolnością w opanowaniu nowatorskich technik badawczych. Moją uwagę skupiły również starannie wykonane ryciny, co jednocześnie bardzo uwierzytelnia wysoki wkład pracy włożony w uzyskanie tak obszernych wyników badań.

Drobne nieścisłości (np. ICH – „Międzynarodowa Konferencja Harmonizacyjna”, str. 70; brak wyjaśnienia skrótu DNB, używanego np. na str. 70, 73 w „Wykazie użytych skrótów”), czy nieliczne błędy stylistyczne i literowe oraz przedstawione w recenzji pytania nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Dominiki Krenczkowskiej.

Chciałabym również zwrócić uwagę na bogaty dorobek naukowy mgr Dominiki Krenczkowskiej obejmujący pięć publikacji (wszystkie z Q1) o łącznym współczynniku $IF = 27,530$ (pkt. MNiSW = 415), 11 doniesień zjazdowych, w tym dwie prelekcje ustne (jedną w języku angielskim, jedną – w języku polskim) oraz patent europejski (Sączewski J. Pieńkowska K., Krenczkowska D., Cal K., Fedorowicz J.: *Dye for fluorescent staining of stratum corneum, manner of its synthesis and application in microscopy, including identification of routes of substances penetration to the skin and assessment of structural disorders of this layer*; nr EP 3 578 559 A1 z dn. 08/07/2021). Badania realizowane w ramach rozprawy doktorskiej finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki (dwa granty OPUS – kierownik dr hab. Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska), z projektu KNOW dla Młodych Naukowców (kierownik projektu – mgr Dominika Krenczkowska) oraz przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju z projektu „Studia Doktoranckie ukierunkowane na umiędzynarodowienie i wielośrodkową współpracę badawczą”.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Dominiki Krenczkowskiej stanowi oryginalne i wartościowe - zarówno z naukowego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia - opracowanie naukowe. Praca spełnia wymogi formalne i warunki 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.*) i na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Dominiki Krenczkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie składam wnioszek o wyróżnienie recenzowanej rozprawy, wysoko oceniając znaczenie podjętej tematyki oraz zastosowaną metodykę wpływającą na jakość przeprowadzonych badań.

Pierwszy, 26. X. 2024 r.

KIEROWNIK
Zakładu Farmacji Stosowanej
Katarzyna Winnicka
Prof. dr hab. n. farm. Katarzyna Winnicka

Pieczętka jednostki organizacyjnej recenzenta

Katarzyna Winnicka
Imię i nazwisko recenzenta

prof. dr hab. n. farm.
Tytuł/stożień naukowy/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:

Przedstawiana do oceny rozprawa doktorska mgr Dominiki Krenczkowskiej stanowi oryginalne i wartościowe – zarówno z naukowego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia – opracowanie naukowe. Wyśledzo oceniam znaczenie podjętej tematyki oraz zastosowaną metodykę wpływającą na jakość przeprowadzonych badań. Rozprawa doktorska stanowi cykl pięciu publikacji oraz jeden manuskrypt w recenzji. Istotną wartość uspołeczniczą oddziaływanie (tzw. „impact factor” (IF) opublikowanych prac wynosi 27, 130 / 4,15 pkt. H.Ni.SiU). W drodze publikacji jest pierwszym uspołecznieniem.

KIEROWNIK
Zakładu Farmacji Stosowanej
Katarzyna Winnicka
Prof. dr hab. n. farm. Katarzyna Winnicka

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.