

dr hab. Beata Grobelna, prof. UG

Gdańsk, 20.11.2018 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Zielińskiej

z tytułu:

„Synteza i charakterystyka stałych nanocząstek oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych przeznaczonych do celów kosmetycznych i farmaceutycznych”

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Aleksandry Zielińskiej została wykonana w Pracowni Chemii Stosowanej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Izabeli Nowak, która jest znaną specjalistką z zakresu chemii kosmetycznej i od wielu lat prowadzi badania w tym obszarze. Zakres pracy obejmuje badania, które dotyczą poszukiwania nowych nośników substancji aktywnych mogących znaleźć zastosowanie zarówno w przemyśle kosmetycznym jak i farmacji. Stałe nanocząstki lipidowe (SLN) oraz nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLC) z uwagi na szerokie możliwości ich wykorzystania stanowią nową grupę nośników, które przede wszystkim są biogodne oraz kompatybilne ze składnikami błon biologicznych. Wprowadzone do produktów kosmetycznych ułatwiają dyfuzję składników aktywnych przez barierę przeskórną oraz ograniczają transepidermalną utratę wody (TEWL), dzięki czemu skóra jest odpowiednio nawilżona. Otrzymanie idealnego nośnika, który będzie optymalnie obciążony substancją aktywną, mający niską toksyczność oraz posiadający przedłużony czas uwalniania substancji aktywnej jest wyzwaniem dla współczesnego przemysłu kosmetycznego, co w pełni uzasadnia podjęcie tego tematu przez Autorkę dysertacji. Z uwagi na panujący trend zastępowania syntetycznych i półsyntetycznych surowców ich naturalnymi odpowiednikami, wykorzystanie oleju roślinnego (Meadofoam) do syntezy NLC zwiększa atrakcyjność podjętego tematu badawczego. Należy pamiętać, że jest to duże wyzwanie dla

Doktorantki z uwagi na procesy jęlczenia zachodzące w olejach roślinnych, mających wysokie stężenie nienasyconych kwasów tłuszczowych. Z drugiej strony nowoczesne techniki pomiarowe stwarzają możliwość pełnej charakterystyki otrzymanych nośników, co w pełni zostało wykorzystane przez Doktorantkę w trakcie Jej badań.

Praca doktorska mgr Aleksandry Zielińskiej została napisana w języku polskim, w klasycznym układzie, powszechnie przyjętym dla prac eksperymentalnych. Tytuł pracy jest zgodny z przedstawionymi w pracy wynikami. Praca została napisana bardzo starannie oraz jest bogato ilustrowana. Język użyty w rozprawie doktorskiej wskazuje na wiedzę z zakresu prowadzonych badań. Nieliczne uchybienia edytorskie nie umniejszają wartości merytorycznej pracy.

Rozprawa doktorska stanowi obszerną 287 stronicową monografię, która została zilustrowana 96 rysunkami oraz zawiera 74 tabele. Podzielona jest na następujące rozdziały i zawiera wszystkie wymagane elementy:

- wstęp (1 strona);
- część teoretyczną (53 strony);
- cel pracy (2 strony);
- metodykę pracy (33 strony);
- wyniki badań i dyskusję (115 stron);
- podsumowanie i wnioski (11 stron).

Całość pracy zakończona jest spisem literatury, który obejmuje 356 pozycji literaturowych, które trafnie zostały wybrane, a większość pochodzi z ostatnich kilku lat, co świadczy o aktualności prowadzonych przez Doktorantkę badań. Integralną część rozprawy doktorskiej stanowią następujące rozdziały szczegółowy opis dorobku naukowego i osiągnięć uzyskanych podczas realizacji pracy doktorskiej, streszczenia w języku polskim i angielskim, lista skrótów oraz załączniki w postaci tabel i wykresów przedstawiające wyniki testu statystycznego ANOWA.

Część teoretyczną poprzedza krótki wstęp, który już na samym początku kieruje uwagę czytelnika ku nośnikom substancji aktywnych stosowanym we współczesnej farmacji oraz przemyśle kosmetycznym. Czytając ten krótki fragment zauważyłam, że moje myśli zostały skierowane na liposomy, którym poświęcono według mnie zbyt dużo uwagi, a nie są tematem rozprawy doktorskiej.

Część teoretyczna została podzielona przez Doktorantkę na osiem podrozdziałów, które są ściśle związane z tematyką dysertacji i przedstawiają aktualny stan wiedzy wszystkich ważnych aspektów poruszanych w części doświadczalnej. W tej części rozprawy doktorskiej znaleźć można informacje na

temat przenikania substancji aktywnych przez skórę, co jest ważną kwestią w aspekcie projektowania nowych formułacji kosmetycznych, tak aby substancja aktywna mogła dotrzeć do głębszych warstw skóry. Obszerny element części teoretycznej Doktorantka poświęciła szczegółowemu omówieniu stałych nanocząstek lipidowych oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych, poczynawszy od ich budowy poprzez metody ich otrzymywania z uwzględnieniem najpopularniejszej czyli homogenizacji wysokociśnieniowej aż po metody statystyczne i fizykochemiczne stosowane w celu optymalizacji i charakterystyki nanocząstek lipidowych. W mojej opinii uważam, że Doktorantka przedstawiła dość przekonująco tę część rozprawy, tematy zostały trafnie dobrane i dobrze wprowadzają czytelnika w tematykę realizowanych przez Autorkę dysertacji prac badawczych. Większych zastrzeżeń do tej części pracy nie mam, ale czytając bardzo szczegółowo pracę nasunęły mi się następujące drobne uwagi.

1. W rozdziale 2.1.2 str. 11 – Autorka bardzo dokładnie omawia wpływ lipidów w tym również kwasów tłuszczowych na absorpcję przezskórną, według mnie można było bardziej wyodrębnić wątek wpływu innych kwasów tłuszczowych aplikowanych w formie preparatów kosmetycznych na stan skóry, a nie ograniczać się tylko do kwasu linolowego.
2. Jako Kosmetolog mam również pytanie związane z rodzajem cery, czy Autorka może wytłumaczyć co oznacza cera starsza? Czy może Autorka miała na myśli cerę starczą albo zniszczoną? (str.11).
3. Rozdział 2.2.3.3. pt. „Ocena działania olejów roślinnych na skórę z wykorzystaniem testów *in vivo*” zawiera ogólny opis badań aparaturowych, może powinien zostać zatytułowany po prostu „Testy *in vivo*” i umieszczony po rozdziale 2.7.
4. Czy było konieczne utworzenie podrozdziału 2.6.8, zawierającego tylko jedno zdanie oraz jeden rysunek? W mojej opinii można to było przenieść do metodologii.

W rozdziale trzecim dysertacji zatytułowanym „Cel pracy” Doktorantka sformułowała cel badań, którym było opracowanie metodyki otrzymywania SLN oraz NLC inkorporowanych składnikami aktywnymi. W tym celu Doktorantka zaplanowała szereg zadań, które realizowała w kilku etapach poczynawszy od doboru odpowiedniego lipidu do enkapsulacji substancji aktywnych, poprzez analizę statystyczną do optymalizacji syntezy SLN i syntezę zarówno SLN jak i NLC inkorporowanych wybranymi składnikami, aż po analizę właściwości fizykochemicznych oraz ocenę szybkości uwalniania składników aktywnych. Uważam, że cel pracy jest w pełni uzasadniony a metody badawcze zostały odpowiednio dobrane. Czytając ten krótki rozdział, uważam, że Doktorantka trochę zapętlila się w opisie, który jest za długi i w rzeczywistości nie wiadomo z niego co jest celem pracy a co tylko zadaniem badawczym.

Na kolejnych stronach rozprawy doktorskiej, w rozdziale pt. „Metodyka pracy” Autorka dysertacji przedstawiła bardzo dokładnie wszystkie procedury otrzymania SLN i NLC oraz zastosowane metody

pomiarowe z dokładnymi opisami oraz zdjęciami wykorzystywanej aparatury i warunków pomiarów. W mojej opinii przedstawione opisy są rzetelne i bardzo staranne. Do tej części mam kilka drobnych uwag:

1. Uważam, że umieszczenie nazwy firmy przy pierwszym opisie aparatu jest wystarczające i nie ma konieczności jej ciągłego powtarzania, ponieważ utrudnia to czytanie pracy.
2. Rysunki 42 i 43 różnią się jedynie przedstawioną sondą, może warto było umieścić w pracy jeden, ale większy rysunek do obu podrozdziałów, a obie sondy bardziej wyeksponować.

Przechodząc do najobszerniejszej części rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Wyniki badań i dyskusja” jestem pod wrażeniem różnorodności materiału doświadczalnego, który dla uzyskania przejrzystości, Doktorantka podzieliła na dwie części dotyczące stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych monoterpenami oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych inkorporowanych Retinolem 50 C, koenzymem Q₁₀ oraz α -tokoferolem. Na początku chciałabym podkreślić, że przedstawione w tej części pracy wyniki są bardzo dokładnie i wnikliwie opisane, a rzetelna dyskusja uzyskanych wyników została przeprowadzona w odniesieniu do prawidłowo dobranych pozycji literaturowych. Autorka w pierwszym etapie badań dokonała odpowiedniej selekcji lipidu dla monoterpenów, tak aby był jak najbardziej kompatybilny dla wszystkich rozpatrywanych w badaniu monoterpenów. Następnie Doktorantka z sukcesem wykorzystowała zaawansowaną analizę statystyczną (analizę wariancji ANOVA, diagram Pareto, wykres powierzchniowy dopasowanej odpowiedzi 3D i 2D), aby wybrać najbardziej optymalny skład do syntezy SLN. Kolejnym zadaniem badawczym jakie postawiła przed sobą Doktorantka była synteza SLN z wykorzystaniem techniki homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco oraz wykonanie pomiarów: rozkładu wielkości cząstek, wartości potencjału zeta i współczynnika polidispersyjności. I tu nasuwa się pytanie, dlaczego dla próbki geraniol-SLN po przechowywaniu jej w temperaturze 4°C następuje dość drastyczny wzrost wielkości cząstek, czego nie obserwujemy dla innych próbek przechowywanych w niskich temperaturach?

Ważną częścią dysertacji w kontekście potencjalnego zastosowania otrzymanych SLN inkorporowanych monoterpenami w celach terapeutycznych, były badania zjawiska niestabilności na podstawie profili transmisyjnych oraz uwalniania monoterpenów z nanocząstek lipidowych. Analizując profile transmisyjne wszystkich próbek przechowywanych w różnych temperaturach Doktorantka dowiodła ograniczoną stabilność monoterpenów inkorporowanych w SLN, którą jednak można zwiększyć dzięki dodatkowi kosurfaktantu czy też modyfikacji SLN polimerami. Natomiast analizując wyniki uwalniania monoterpenów z nanocząstek lipidowych Doktorantka zaobserwowała, że największe ilości zostały

uwolnione z próbki α -pinenu-SLN, a najmniejsze z próbki limonenu-SLN. Ponadto obliczając efektywność enkapsulacji dla wszystkich monoterpenu i porównując te wyniki z szybkością uwalniania Doktorantka zauważyła, że im mniejsza szybkość uwalniania tym wyższa efektywność enkapsulacji. Wykazanie tej zależności jest bardzo istotne przy wyborze substancji aktywnej do określonego celu terapeutycznego.

Następnie różnorodne techniki badawcze takie jak: dyfrakcja promieni rentgenowskich (XRD), skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC), skaningowa mikroskopia elektronowa pozwoliły Doktorantce wszechstronnie scharakteryzować otrzymane nanocząstki lipidowe oraz określić przemiany polimorficzne zachodzące pod wpływem zmian temperatury.

Na szczególne zainteresowanie zasługują przeprowadzone badania *in vitro* próbek cytralu i geraniolu enkapsulowanych w nanocząstkach lipidowych. Próbka cytralu inkorporowanego w SLN wykazała silne działanie przeciwnowotworowe.

W drugiej części rozdziału Doktorantka skupiła swoją uwagę na nanostrukturalnych nośnikach lipidowych inkorporowanych trzema substancjami aktywnymi: Retinolem 50 C, koenzymem Q₁₀ oraz α -tokoferolem. Podobnie jak w pierwszej części swoją pracę badawczą rozpoczęła od wyboru odpowiedniego lipidu dla ww. substancji aktywnych oraz analizie właściwości nanostrukturalnych nośników lipidowych za pomocą tych samych metod, które używała do charakterystyki nanocząstek lipidowych. Opracowana przez Doktorantkę procedura syntezy pozwoliła na otrzymanie stabilnych zarówno pod względem fizycznym jak i chemicznym NLC oraz substancji aktywnych, które zostały w nich zainkorporowane. Ponadto uzyskane przez nią rezultaty dla próbek NLC inkorporowanych ww. substancjami aktywnymi wskazują, że zastosowanie naturalnego oleju z nasion Meadowfoam prowadzi do poprawy stabilności substancji aktywnych zawartych w NLC. Ostatnim zadaniem badawczym jakie wyznaczyła sobie Doktorantka były badania *in vivo*, które wymagają dużej wiedzy przede wszystkim z kosmetologii. Pewnie z uwagi na obszerność materiału uzyskanego w ramach pracy doktorskiej zostały one potraktowane trochę pobieżnie. Z uwagi na to pozwolę sobie zadać następujące pytania:

1. Czy analizowano wyniki badań aparaturowych ze względu na wiek lub rodzaj skóry probantów?
2. W kontekście potencjalnego zastosowania badanych kremów w przemyśle, interesującym byłoby przeprowadzenie badań ankietowych wśród probantów, które zawierałyby pytania dotyczące własnych odczuć probantów.
3. Nie jest jasny dla mnie opis rysunków 95 i 96. W mojej opinii zabrakło wartości TEWL oraz stopnia nawilżenia przed aplikacją kremów tzn. w tygodniu 0. Co prawda Doktorantka pisze, że to właśnie I

tydzień obejmował pomiary przed aplikacją, ale dlaczego są to wyniki dla dwóch kremów, jeśli nie zostały one jeszcze zaaplikowane na skórę.

Rozprawę doktorską zamyka dość obszerny jak na podsumowanie najważniejszych osiągnięć pracy rozdział zatytułowany „Podsumowanie i wnioski” liczący aż 11 stron. W mojej opinii zabrakło zwięzłego i syntetycznego zestawienia największych osiągnięć, uzyskanych podczas realizacji dysertacji. Z uwagi na to pozwoliłam sobie wybrać według mnie najważniejsze osiągnięcia.

I tak, w mojej ocenie do najważniejszych osiągnięć przedstawionej do recenzji dysertacji należy:

- Optymalizacja metod syntezy nanocząstek lipidowych;
- Określenie typu oraz stopnia uwalniania wybranych monoterpenu z nanocząstek lipidowych;
- Określenie aktywności przeciwzapalnej oraz cytotoksycznej wybranych monoterpenu inkorporowanych w SLN;
- Opracowanie powtarzalnej metody enkapsulacji Retinolu 50 C, koenzymu Q₁₀ oraz α -tokoferolu;
- Ocena stabilności chemicznej zarówno Retinolu 50 C jak i koenzymu Q₁₀ enkapsulowanych w NLC,
- Badania aplikacyjne otrzymanych preparatów kosmetycznych zawierających MSO jako matrycę lipidową w syntetyzowanych NLC.

Miarą naukową wartości przedstawionej mi do recenzji dysertacji jest to, że zawarte w niej wyniki zostały już częściowo opublikowane. Pani mgr Aleksandra Zielińska jest współautorką 19 opublikowanych prac oraz 3 wysłanych, z których trzy znajdują się w czasopismach z tzw. listy ministerialnej części A, sześć w czasopismach z listy ministerialnej części B. Ponadto Doktorantka jest współautorką trzech rozdziałów w monografiach, siedmiu w czasopismach spoza listy ministerialnej. Swoje osiągnięcia prezentowała na konferencjach zarówno w formie wystąpienia ustnego (3) jak i posteru (34).

Wymienione w trakcie recenzji drobne uwagi oraz zapytania nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej i nie mają wpływu na moją bardzo dobrą ocenę dysertacji, a nieliczne uwagi świadczą jedynie o dokładnym zapoznaniu się recenzenta z treścią rozprawy doktorskiej. W mojej opinii rozprawa doktorska mgr Aleksandry Zielińskiej posiada dużą wartość z aplikacyjnego punktu widzenia i mam nadzieję, że zostanie to w przyszłości wykorzystane przy współpracy z przemysłem kosmetycznym. Ponadto, przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej badania z wykorzystaniem nietoksycznych i biodegradowalnych nanocząstek lipidowych są zgodne z założeniami tzw. „zielonej chemii” co świadczy o nowoczesnym i ekologicznym podejściu do postawionego problemu badawczego.

Przedłożona mi do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane przez Ustawę o Tytule i Stopniach Naukowych z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595) oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 26 września 2016, a także zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Pozwala mi to wystąpić z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Zielińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

B. Grobelna