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, 10 grudnia 2022 r.

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr farm. Pani Mgr Anny Górskiej pt. „Opatrunki hydrożelowe jako potencjalne nośniki przeznaczone do miejscowego podawania substancji czynnych" wykonanej w Katedrze i Zakładzie Technologii Postaci leku i Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego CMUJ pod kierunkiem naukowym promotora prof. dr hab. Renaty Jachowicz i promotora pomocniczego dr hab. Anny Krupy

Leczenie ran przewlekłych jest uważane za jedną z najczęstszych przyczyn obniżenia jakości życia pacjentów, stanowiąc poważne wyzwanie dla systemu opieki zdrowotnej na świecie. Pod tym względem normalizacja procesu gojenia ran przewlekłych jest niezwykle istotnym zadaniem i wymaga zastosowania nowoczesnych opatrunków umożliwiających odpowiednie opatrzenie rany, zapewniając zdolność wchłaniania wysięku, utrzymanie wilgotnego środowiska rany, wymiany gazowej, izolację cieplną, zdolność uśmierzania bólu, łatwość usuwania z powierzchni rany, odpowiednie właściwości lepkosprężyste oraz możliwość inkorporacji i uwalniania w miejscu rany substancji czynnych. Hydrożele są obiecującym rodzajem materiałów opatrunkowych w terapii ran ze względu na swoją porowatą strukturę, biodegradowalność, czy możliwość wprowadzania substancji czynnej. W tym kontekście podejmowany w recenzowanej rozprawie doktorskiej temat opracowania składu, technologii otrzymywania i zaawansowanej metodologii oceny nowych opatrunków hydrożelowych z substancją czynną, wpisuje się w szeroką platformę rozwoju tzw. wielofunkcyjnych opatrunków do stosowania w terapii trudno gojących się ran przewlekłych, ważnego kierunku integrującego technologię postaci leku i inżynierię materiałową.

W zaprezentowanym w rozprawie cyklu 4 spójnych tematycznie publikacji (3 oryginalnych i 1 przeglądowej) Doktorantka jako zasadniczy cel badań wskazuje opracowanie i ocenę właściwości membran hydrożelowych, sporządzonych trzema metodami, jako potencjalnych materiałów opatrunkowych do zastosowania w terapii ran, docelowo wybór optymalnej membrany jako nośnika wybranej trudno rozpuszczalnej substancji czynnej o

aktywności przeciwzapalnej.

Cel pracy realizowany był w oparciu o cele cząstkowe obejmujące:

- ocenę przydatności trzech metod, tj. liofilizacji, cyklicznego zamrażania-odmrażania oraz druku 3D do sporządzania hydrożelowych membran,
- ocenę wpływu parametrów procesów na właściwości hydrożelowych membran,
- określenie właściwości fizykochemicznych hydrożelowych membran i zastosowanie nowych metod ich badania dla szczegółowej charakterystyki oraz oceny ich użyteczności jako potencjalnych opatrunków;
- opracowanie technologii wytwarzania hydrożelowych membran z trans-resweratrolem oraz ich charakterystykę,

oraz założenia uzyskania membran polimerowych o trwałej strukturze w kontakcie z potencjalnym wysiękiem, jednocześnie w miejscu ruchomym umożliwiających swobodę ruchu i wytrzymałych na rozciąganie.

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

W publikacji 1. z cyklu mgr Anna Górska oceniła membrany hydrożelowe *placebo* sporządzone metodą liofilizacji z użyciem czterech rodzajów roztworów polimerów, tj. alginianu sodu, hydroksyetylocelulozy, hydroksypropylometylocelulozy oraz alkoholu poliwinylowego (PVA) z dodatkiem 10% glikolu propylenowego. Po ocenie właściwości mechanicznych membran tj. testu przebijania, oceny czasu hydratacji, obrazowania za pomocą mikrotomografii rentgenowskiej, tomografii oraz obrazowania magnetyczno-rezonansowego z zastosowaniem sekwencji pomiarowej UTE, za optymalny skład membrany uzyskanej w metodzie liofilizacji uznano formację otrzymaną na bazie 15% (m/m) roztworu PVA, charakteryzującą się chłonnością, przy zachowaniu integralności struktury w kontakcie z cieczą, odpornością na przypadkowe zerwanie, lekko kwasowym pH oraz asymetryczną strukturą. Za szczególnie istotne w pracy uważam, obrazowanie struktury i opis budowy warstwowej membrany uznanej za optymalną wraz z interpretacją potencjalnych korzyści odnośnie wpływu budowy na sposób postępowania przed nałożeniem i zachowanie opatrunku docelowo w miejscu aplikacji tj. na chłonięcie wysięku, czy uwadnianie.

W kolejnej 2 publikacji doświadczalnej Doktorantka kontynuowała badania dotyczące oceny membrany hydrożelowej na bazie wyselekcjonowanego polimeru PVA otrzymanej metodą cyklicznego zamrażania-odmrażania, gdzie poprzez wielokrotne powtarzanie cyklu dochodzi do otrzymania żeli fizycznych o porowatej strukturze. W optymalizacji technologii mgr

Anna Górska zastosowała jako optymalny sześciokrotny proces zamrażania-odmrażania formulacji otrzymanych z 10% lub 15% roztworów PVA z dodatkiem glikolu propylenowego 10%. Wstępnie do otrzymania membran zastosowano cztery rodzaje polimeru o różnej masie cząsteczkowej (67 000 – 195 000 Da) oraz stopniu hydrolizy (86,7-98,8 %), po czym po ocenie integralności struktury w kontakcie z cieczą, zdolności chłonięcia wody, wartości siły adhezji uzyskanych opatrunków do dalszej optymalizacji składu wybrano formulacje na bazie PVA o masie cząsteczkowej ~195 000 Da. Sporządzono 22 membrany o 5-10% stężeniu polimeru oraz 5-10% stężeniu glikolu propylenowego i oceniano ich właściwości oraz wpływ temperatury zamrażania, odpowiednio -25°C oraz -80°C na jakość uzyskiwanych membran. Oceniano maksymalną zdolność chłonięcia, siłę adhezji, naprężenie nominalne, maksymalną siłę potrzebną do zerwania próbki, moduł Young'a, względne wydłużenie próbki, strukturę matrycy wraz z oceną frakcji wody w membranie. Biorąc pod uwagę wszystkie ww. parametry uznano, że membranami o najkorzystniejszych właściwościach do aplikacji w łożysku rany są formulacje zawierające 8% PVA i 10% glikolu propylenowego, przy warunkach prowadzenia procesu obejmujących zamrażanie w temp. -80°C . W pracy na uwagę zasługuje gruntowna interpretacja analizy termogramów formulacji membran, która informuje o sposobie rozmieszczenia i ilości wody w sieci membrany, szybkości jej odparowania zależnej od technologii sporządzania, w tym przebiegu procesu fizycznego sieciowania PVA, co w połączeniu z oceną SEM i NMR pozwala na ocenę struktury wewnętrznej uzyskiwanych formulacji hydrożelowych. W celu opracowania składu formulacji do sporządzenia membran z trans-rosweratrolem, substancją trudno rozpuszczalną, dokonano selekcji użytych rozpuszczalników, których zastosowanie miało na celu zapobieganie precypitacji substancji w etapie wprowadzania do roztworu polimeru. Finalnie Doktorantka sporządziła trzy serie formulacji z trans-resweratrolem zawierające w składzie 0,4% substancji czynnej, 10% glikolu propylenowego oraz odpowiednio: 5%, 8% lub 10% PVA oraz 2,1% Labrasolu®. Analiza porównawcza właściwości mechanicznych opatrunków *placebo* oraz z dodatkiem substancji czynnej wykazała, że obecność substancji korzystnie wpływała na wytrzymałość materiału na zerwanie, przy zachowaniu zdolności dużego odkształcenia pod stosunkowo niewielkim obciążeniem i słabych właściwości adhezyjnych, co zapewnia łatwe ich usuwanie z łożyska rany. Przeprowadzone w komorach dyfuzyjnych Franza badania uwalniania wykazały przedłużone uwalnianie substancji oraz wpływ stężenia polimeru na ilość uwolnionego trans-resweratrolu, wskazując na możliwość kontroli uwalniania poprzez zastosowanie różnych stężeń polimeru.

W kolejnej publikacji 3. opisano zastosowanie do oceny membran w miejscu kontaktu z raną, innowacyjny model *in vitro* wykorzystujący obrazowanie magnetyczno-rezonansowe

(MRI) przy użyciu tomografu badawczego. Pomiary prowadzono dla składu membrany wyselekcjonowanej w publikacji 2 (8% PVA, 10% glikolu propylenowego i 82% wody) oraz dla formulacji zawierającej dodatkowo 2,1 % Labrasolu®. W badaniach zmian wartości czasów relaksacji i amplitud dla próbek membran zarejestrowano różnice w szybkości wnikania cieczy do ich struktury w zależności od zastosowanego medium tj. rozcieńczonej surowicy bydlęcej czy glikolu propylenowego. Opisywany dwukierunkowy transport płynów jest korzystny, wskazując na potencjał opracowanych materiałów zarówno do nawilżania rany jak i chłonięcia nadmiaru wysięku.

Na uwagę w prowadzonych badaniach zasługuje szerokie wykorzystanie przez Doktorantkę technik sporządzania formulacji membran tj. liofilizacji, cyklicznego zamrażania-odmrażania, formowania przyrostowego i zastosowanie zaawansowanych metodologii badań analitycznych. W pracy do oceny materiałów wykorzystano nowoczesne techniki analityczne, w tym: metodę dyfrakcji laserowej do oceny rozkładu wielkości cząstek substancji czynnej, analizę tekstury do oceny właściwości adhezyjnych i mechanicznych membran, różnicową kalorymetrię skaningową do określenia wpływu technologii i składu na parametry fizykochemiczne membran, skaningową mikroskopię elektronową do obrazowania powierzchni opatrunku, mikrotomografię rentgenowską, tomografię i relaksometrię magnetycznego rezonansu jądrowego do określenia cech i struktury opatrunków, w tym rodzaju warstw, stopnia usieciowana, obserwacji pęcznienia czy transportu płynów w opatrunku.

Doktorantka przedstawiła 6 wniosków końcowych, które wyczerpują wskazane założenia i cel rozprawy. Przedstawione przez Doktorantkę wnioski podsumowują wyniki badań wskazując na:

- korzyść zastosowania alkoholu poliwinylowego o stopniu hydrolizy powyżej 97% i stężeniu powyżej 5% jako membrany opatrunków hydrożelowych o integralnej strukturze i dobrych parametrach mechanicznych,
- optymalną technologię sporządzania opatrunków hydrożelowych,
- wybór składu fromulacji opatrunku z trans-resweratrolem o optymalnych właściwościach mechanicznych i farmaceutycznych,
- uzasadnienie użycia do oceny opatrunków opracowanych metod obrazowania magnetyczno-rezonansowego oraz modelu *in vitro*.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań zostały przedstawione w 3 publikacjach oryginalnych z zakresu nauk farmaceutycznych oraz 1 pracy przeglądowej o sumarycznym współczynniku wpływu *Impact Factor* z cyklu równym 9,543 (punktacja MNiSW 340 pkt.). W przed-

stawionych do cyklu 3 pracach mgr Anna Górska jest pierwszym autorem, a w 2 pracach autorem korespondencyjnym, co potwierdzają załączone oświadczenia współautorów o udziale Doktorantki w powstawaniu tych publikacji, wskazując na Jej znaczący wkład w planowanie, wykonanie badań, w tym opracowanie i walidację metod analitycznych, opis i interpretację otrzymanych danych doświadczalnych oraz redagowanie manuskryptu. Oceniany wkład pracy mgr Anny Górskiej w 3 pracach wynosił od 50-60%, w 1 pracy 35% co stanowi istotne osiągnięcie w publikacjach wieloautorskich.

Chciałabym podkreślić, iż do najważniejszych walorów recenzowanej rozprawy zaliczam:

- istotność i aktualność wybranej tematyki, w tym pogłębienie dotychczasowej wiedzy nt. kompleksowego podejścia do opracowania formulacji opatrunków hydrożelowych do miejscowego podania substancji czynnych,
- sposób charakterystyki membran hydrożelowych, w tym wykorzystanie zaawansowanych metod magnetycznego rezonansu jądrowego, metod oznaczania procesu transportu płynów w opatrunku w kontakcie z cieczą, przekładających się na ocenę właściwości opatrunków,
- porównanie technologii sporządzania opatrunków i wskazanie metody cyklicznego zamrażania-odmrażania jako optymalnej dla opracowanych składów,
- opracowanie składu formulacji membran hydrożelowych z *trans*-resweratrolem o korzystnych właściwościach, wskazujących na możliwość ich potencjalnego zastosowania w zaopatrywaniu ran z niewielkim wysiękiem,
- ocenę uwalniania *trans*-resereratrolu z formulacji, wskazującą na przedłużone uwalnianie substancji, co jest istotne dla projektowania i rozwoju postaci opatrunków hydrożelowych w formie płata pozostających na ranie przez dłuży okres czasu.

Biorąc pod uwagę wysoką jakość merytoryczną i kompleksowe podejście do planowania eksperymentu chciałabym z ciekawości badacza zapytać Doktorantkę o kwestię:

• czy zgodnie z Pani wiedzą, metoda formowania przyrostowego była stosowana do otrzymywania opatrunków typu hydrożeli? Jeśli tak, to jaki polimer był korzystnie stosowany?

• czy w wybranej technologii cyklicznego zamrażania-odmrażania istnieją ograniczenia w zapewnieniu sterylności finalnych formulacji opatrunków?

• czy przewiduje Pani ocenę dalszą ocenę uzyskanych hydrożeli o optymalnym składzie w badaniach np. *in vitro z* wykorzystaniem linii komórkowych, czy docelowo w modelu zwierzęcym?

Podsumowując zaprezentowany w dysertacji problem naukowy, warsztat badawczy i

analiza wyników stanowią o wysokiej wartości poznawczej i porządkującej dostępną wiedzę z obszaru opracowania składu, technologii sporządzania i zaawansowanej oceny opatrunków hydrożelowych również jako potencjalnych nośników substancji czynnych w zaopatrywaniu trudno gojących się ran. W mojej opinii praca wychodzi naprzeciw stawianym oczekiwaniom, iż prowadzone prace naukowe pozwolą docelowo na rozwój kierunku opracowywania opatrunków hydrożelowych z substancjami czynnymi i dalsze projektowanie nośników terapii o korzystnych właściwościach farmaceutycznych i zwiększonej funkcjonalności w zaopatrywaniu ran.

Podsumowując oceniana rozprawa doktorska mgr Anny Górskiej stanowi oryginalne opracowanie naukowe, poruszające zagadnienia hydrożelowych materiałów opatrunkowych jako potencjalnych nośników dla substancji czynnych, wnosząc wiedzę do postepowania przy wyborze i optymalizacji ich składu, doboru technologii ich sporządzania i kompleksowej oceny w kontekście specyfiki miejsca aplikacji. 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 Nauki farmaceutyczne Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Anny Górskiej do dalszych etapów postępowania w celu nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Jednocześnie korzystając z przysługującemu recenzentowi prawa wnioskuję do Rady Wydziału Farmaceutycznego CMUJ o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
TECHNOLOGII POSTACI LEKU
dr hab. Bożena Karolewicz, prof. uczelni