

dr hab. inż. Janusz Fabia, prof. nadzw. UBB
Katedra Inżynierii Materiałowej
Wydział Inżynierii Materiałów, Budownictwa i Środowiska
Uniwersytet Bielsko-Bialski

Bielsko-Biała, 24.04.AD2024

Recenzja
Pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Owczarek
„Terapeutyczne tekstylia wykorzystujące transdermalne systemy
dostarczania substancji aktywnych”

Praca została wykonana w Instytucie Włókiennictwa
na Wydziale Technologii Materiałowych i Wzornictwa Tekstyliów Politechniki Łódzkiej
Promotor pracy Pan prof. dr hab. inż. Dawid Stawski
Promotor pomocniczy: Pani dr inż. Lucyna Herczyńska

Podstawa opracowania oceny

Recenzję przedstawionej rozprawy doktorskiej opracowano na podstawie Uchwały Rady do spraw Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej w dyscyplinach inżynieria mechaniczna, inżynieria materiałowa z dnia 9 lutego 2024 r.

Cel i zakres badań objętych rozprawą

Celem badań objętych rozprawą było opracowanie i scharakteryzowanie komponentów oraz produktu końcowego – funkcjonalnych tekstyliów wykorzystujących transdermalne systemy dostarczania substancji aktywnych.

Doktorantka w swej pracy podjęła bardzo szerokie spektrum zagadnień i zaplanowała adekwatny zakres badań, które objęły:

- wybór substancji aktywnej – ekstraktu z miłorzębu japońskiego *Ginkgo biloba* – (GBE), jako środka leczniczego w wybranych dolegliwościach (stopa cukrzycowa, nowotwór),
- wytypowanie polimerów będących matrycą osadzania substancji bioaktywnych w nanocząstkach (sól chitozanu) oraz w mikrokapsułkach (alginian i etyloceluloza),
- opracowanie metody otrzymywania i charakterystykę fizykochemiczną nanocząstek z zamkniętym GBE – Ch(GB)NP,
- wytworzenie i charakterystykę mikrokapsuł zawierających GBE lub nanocząstki,
- spektrofotometryczne badania uwalniania ekstraktu z nanocząstek oraz z mikrokapsuł z GBE lub nanocząstkami w wybranych mediach,
- opracowanie sposobu nanoszenia mikrokapsuł z substancją aktywną na nośnik włókienniczy,
- badania biologiczne na liniach komórkowych prawidłowych i nowotworowych,

- badania przenikania nanocząstek z ekstraktem, zawartych w mikrokapsułkach przymocowanych do nośnika włókienniczego, przez membranę o wielkości porów zbliżonej do porów w skórze.

Charakterystyka i uwagi dotyczące poszczególnych części recenzowanej pracy

Układ rozprawy jest klasyczny, obejmujący: wprowadzenie, studium literaturowe, przedstawienie hipotezy i celów badawczych pracy oraz omówienie części doświadczalnej. Zawartość rozprawy (opracowania) obejmuje łącznie 160 stron maszynopisu, w tym: zestawienie stosowanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz cytowanej literatury (427 pozycji !) oraz zestawienia zamieszczonych w tekście rozprawy rysunków (47) i tabel (6).

Część teoretyczna

Studium literaturowe recenzowanej rozprawy składa się z 11 rozdziałów. Rozpoczyna je krótki, poprawnie ujęty rozdział *Wprowadzenia*, informujący czytelnika o tematyce podjętej w pracy, związanej z badaniami w obszarze tekstyliów biomedycznych, a w szczególności dotyczących transdermalnych systemów terapeutycznych. Doktorantka wskazuje kontekst – dynamiczny rozwój rynku tekstyliów medycznych w ostatnich latach spowodowany m.in. wzrostem świadomości, oczekiwań i potrzeb starzejących się społeczeństw, w sposób przekonujący uzasadniając celowość podjęcia przedmiotowych badań.

Zakres zagadnień, które porusza Autorka w części teoretycznej rozprawy jest bardzo szeroki.

Rozdział drugi poświęcony jest biotekstyliom i tekstyliom medycznym. Znajdujemy w nim informacje dotyczące m.in. systematyki w obrębie tej zróżnicowanej grupy wyrobów, z uwagi na określone kryteria (przeznaczenie, rodzaje struktur tekstylnych, rodzaje i wymiary włókien użytych do wytworzenia wyrobów).

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawia zagadnienia dotyczące budowy i funkcji skóry, ze szczególnym uwzględnieniem dyfuzyjnego transportu substancji aktywnych.

Rozdział czwarty zawiera informacje dotyczące polimerowych nośników substancji aktywnych, spośród których indywidualnie potraktowano materiały pochodzenia naturalnego: chitozan, alginiany oraz etylocelulozę.

W kolejnym rozdziale poświęconym miłorzębowi japońskiemu *Ginkgo biloba*, Autorka na wstępie prezentuje informacje ogólne dotyczące tej rośliny, a następnie wylicza zalety terapeutyczne ekstraktów pozyskiwanych z jej liści tej rośliny.

W rozdziale szóstym Pani mgr Owczarek charakteryzuje nanocząstki: nieorganiczne, lipidowe i polimerowe. Szczególnie wiele uwagi poświęca nanocząstkom chitozanowym ChNP, których metody otrzymywania opisuje w następnym rozdziale.

Rozdział ósmy Autorka poświęciła metodom badań nanocząstek, takim jak: charakterystyka właściwości fizykochemicznych, mikroskopowe badania morfologiczne,

charakterystyka elektryczna – wyznaczenie potencjału ζ , spektrofotometryczne oznaczenie wydajności enkapsulacji oraz badanie uwalniania *in vitro*.

W rozdziale dziewiątym Doktorantka opisała metody otrzymywania mikrokapsuł i mikrosfer, w tym najczęściej używane metody emulsyjne oraz kolejno: suszenie rozpyłowe, powlekanie w warstwie fluidalnej i w bębnie drażerskim, koacercwację, formowanie mikrosferowych form hydrożelowych poprzez kontrolowany proces tworzenia kompleksów polielektrolitowych, polimeryzację *in situ* i międzyfazową oraz metody ekstruzji i topliwej dyspersji.

Kolejny rozdział przeglądu literaturowego został poświęcony omówieniu technik modelowych: ilościowych, jakościowych i półilościowych, stosowanych w badaniach przenikania substancji aktywnych przez materiał imitujący skórę.

Część teoretyczną rozprawy zamyka rozdział, w którym Autorka zaprezentowała metodę oceny cytotoksyczności wobec linii komórkowych przy użyciu tzw. testu MTT.

W mojej ocenie, studium literaturowe sporządzone jest poprawnie, choć zdecydowanie nazbyt wyczerpująco (obszernie). Część teoretyczna stanowi objętościowo aż 58% całości rozprawy (nie wliczając streszczeń, bibliografii, wykazów rysunków i tabel). Redakcja tej części rozprawy jest spójna i logiczna.

W ramach uwag szczegółowych dotyczących studium literaturowego chciałbym odnieść się do trzech wyszczególnionych niżej kwestii:

1. W rozdziale poświęconym miłorzębowi dwudzielnemu *Ginkgo biloba*, jak wskazałem już wyżej, Doktorantka przedstawiła dość obszerną listę zalet terapeutycznych ekstraktów z liści tej rośliny, co skądinąd, zwłaszcza w kontekście części doświadczalnej rozprawy, wydaje się recenzentowi jak najbardziej słuszne. Natomiast brak jakichkolwiek doniesień o przeciwwskazaniach do jego stosowania...
2. W podrozdziale 6.3.3 *Nanocząstki polimerowe*, w podpisie pod rys. 13 (str. 49), dla nanosfery został przyporządkowany układ zbiornikowy, a dla nanokapsuły – matrycowy, czy jednak rysunek nie wskazuje, że jest odwrotnie?
3. Zważywszy obszerność części teoretycznej, szkoda – zdaniem recenzenta, że Autorka nie pokusiła się o zamieszczenie jakiegoś krótkiego podsumowania dokonanego przeglądu literatury. Co prawda, rzeczona konstatacja pojawia się, ale dopiero w pierwszym akapicie pierwszego rozdziału części doświadczalnej rozprawy, który jest poświęcony całkiem innej kwestii – określeniu celu i zakresu podjętej pracy badawczej.

Część doświadczalna

Elementem formalnie wydzielonym w postaci pierwszego rozdziału części doświadczalnej, jednocześnie spinającym część literaturową i eksperymentalną rozprawy w jedną całość, jest fragment tekstu, w którym Doktorantka przedstawiła, wspomniany już na wstępie niniejszej recenzji, cel swojej pracy doktorskiej, którym było wytworzenie funkcjonalnych tekstyliów wykorzystujących transdermalne systemy dostarczania substancji aktywnych oraz charakterystyka komponentów i produktu końcowego.

W dalszej części rozdziału Pani mgr Owczarek prezentuje hipotezę swojej pracy doktorskiej, której werbalizacja jest następująca: „możliwe jest wytworzenie materiałów włókienniczych zawierających mikrokapsuły z nanocząstkami z substancją aktywną jako terapeutyczne tekstylia do dostarczania substancji leczniczej drogą transdermalną”.

W tym miejscu chciałem zauważyć, że hipoteza postawiona w taki (bardzo ogólny) sposób, zwłaszcza w świetle przedstawionego przeglądu literatury, wydaje się wręcz oczywista. Być może należałoby zasugerować możliwość takiego sformułowania tezy, by potwierdzenie jej prawdziwości mocniej wiązać z wynikami diskutowanych w pracy badań. Z drugiej jednak strony, trudno zarzucić niepoprawność metodologiczną dla tak postawionej tezy. Pozostawiam więc powyższą kwestię do namysłu Doktorantki.

Ponadto, w diskutowanym rozdziale Autorka określiła precyzyjnie zakres prowadzonych w ramach pracy badań, do czego odniosłem się już na wstępie recenzji.

W kolejnym (2) rozdziale części doświadczalnej rozprawy, a właściwie pierwszym, który *stricto* do tej części się odnosi, Pani mgr Owczarek, z niezwykłą starannością, przedstawiła informacje dotyczące użytych w badaniach materiałów oraz zastosowanych metod. Ponadto, zostały podane niezbędne dane dotyczące wykorzystanej aparatury oraz wartości parametrów i szczegółowe opisy procedur przeprowadzonych eksperymentów łącznie. W wybranych przypadkach, opisy metod badawczych Doktorantka wzbogaciła bardzo starannie wykonanymi, najprawdopodobniej według własnej koncepcji, czytelnymi i jednocześnie sugestywnymi schematami ideowymi (Rys. 22–26).

Trzeci rozdział części doświadczalnej poświęcony jest prezentacji uzyskanych wyników. Należy podkreślić, że sposób przedstawienia wybranych rezultatów badań: mikrofotografie SEM, rozkłady wielkości nanocząstek, krzywe szybkości uwalniania *Ginkgo biloba* z mikrokapsuł alginianowych oraz etylocelulozowych w różnej konfiguracji (zarówno pozbawionych, jak i posiadających nanocząstki chitozanowe), wreszcie widm odbiciowych FTIR-ATR, cechuje wysoki poziom staranności i profesjonalizmu Doktorantki. Powyższe stwierdzenie dotyczy również strony formalnej prezentacji wyników: badań wydajności procesu enkapsulacji ekstraktu GBE w nanocząstkach Ch(GB)NP (wyznaczenie parametrów funkcji korelacji na krzywej wzorcowej), oceny cytotoksyczności Ch(GB)NP. (zamieszczenie znacznika niepewności pomiarowej na diagramach). Najmniej czytelna, ale poprawna, wydała się recenzentowi konwencja przedstawienia wyników badań mikrobiologicznych określających minimalne stężenie hamujące wzrost wybranych szczepów bakterii i grzybów (Rys. 41).

Kolejny, w moim odczuciu kluczowy, fragment rozprawy (rozdział 4) stanowi dyskusja uzyskanych wyników badań. W opinii recenzenta, Autorka prowadzi ją bardzo inteligentnie, co wydaje się niezwykle istotne przy tak dużej ilości wariantów, metod i danych pomiarowych. Komentowane wyniki badań dobierane są selektywnie, a zarazem sensownie (nie „jak leci” np. w porządku wykonywania pomiarów, co – niestety – dość często można spotkać w opracowaniach wyników). Według tego zamysłu Doktorantka grupuje wnioskowanie w czterech tematycznie spójnych podrozdziałach. Taka narracja, podbudowana

nader częstym odwoływaniem się do odpowiednich pozycji literaturowych, uzyskuje dużą siłę przekonywania.

Z uwagi na wielość podejmowanych w dyskusji kwestii, zdecydowałem się bezpośrednio komentować tylko te rezultaty i wnioski, które wydały mi się szczególnie cenne lub też wzbudziły moje wątpliwości.

Podrozdział 4.1 poświęcony jest charakterystyce wytworzonych nanocząstek chitozanowych zawierających ekstrakt GBE. Na podstawie analizy rozkładu ich wielkości Autorka uzyskuje potwierdzenie, że odpowiadają one tym nanocząsteczkom, które mogą skutecznie służyć do podawania substancji aktywnych przez skórę. Z kolei wykorzystując widmo odbiciowe FTIR-ATR i przeprowadzając dekonwolucję pików przy liczbie falowej 1024 cm^{-1} i 1064 cm^{-1} , uzyskuje potwierdzenie skutecznego zamknięcia naturalnego ekstraktu *Ginkgo biloba* w nanocząstkach chitozanu. W dalszej części dyskutowanego podrozdziału Doktorantka rozważa jeszcze kinetykę uwalniania ekstraktu GBE z nanocząstek chitozanowych w wodzie i w soli fizjologicznej oraz w oparciu o dane eksperymentalne dopasowuje adekwatne modele matematyczne tych procesów.

W kolejnym, dość obszernym, podrozdziale (4.2) Pani mgr Owczarek przeanalizowała wyniki badań mikrobiologicznych oraz podjęła kwestię cytotoksyczności nanocząstek Ch(GB)NP.

Doktorantka wykazała, że otrzymane w pracy nanocząstki chitozanowe zawierające ekstrakt z liści *Ginkgo biloba* przejawiały aktywność mikrobiologiczną wobec wszystkich użytych w testach szczepów bakterii i grzybów oprócz *Candida albicans* (Rys. 41). W stosunku do minimalnych stężeń hamujących oznaczonych dla czystego ekstraktu GBE oraz nanocząstek chitozanu z ekstraktem, wytworzony układ Ch(GB)NP wykazał efekt wzmocnienia działania przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego.

W części dyskutowanego podrozdziału poświęconego wynikom ocenie cytotoksyczności Autorka starała się dowieść, że zastosowanie nanocząstek chitozanowych z ekstraktem wykazuje efekt cytotoksyczny wobec linii komórek nowotworowych (PEA1 oraz HeLa) w badanym zakresie stężeń (25–5000 $\mu\text{g/ml}$), przy jego braku wobec komórek o budowie prawidłowej (HGF-1). Stwierdziła również wystąpienie wyraźnego efektu synergicznego działania cytotoksycznego Ch(GB)NP wobec linii komórkowych nowotworowych, w odniesieniu do użycia obu komponentów osobno.

Wyniki wspomnianych wyżej badań wydały mi się na tyle obiecujące, a argumentacja Doktorantki – przekonująca, że postanowiłem skonsultować problem w gronie lekarzy praktyków, stykających się na co dzień z pacjentami onkologicznymi.

Nie chcąc, z pozycji recenzenta rozprawy, wchodzić w zasadniczą dyskusję (czy też polemikę) dotyczącą skuteczności *Ginkgo biloba* i analogicznych specyfików pochodzenia naturalnego, jako hipotetycznego leku onkologicznego, pragnę w tym miejscu istotną, w moim mniemaniu, kwestię wynikającą ze wspomnianych konsultacji przywołać.

Przenikanie substancji, w tym terapeutycznych, przez skórę, jak zaznacza sama Doktorantka na str. 31, zależy od bardzo wielu czynników, w związku z czym projektowanie farmakoterapii przeciwnowotworowej poprzez zastosowanie systemu transdermalnego

dozowania będzie zagadnieniem bardzo skomplikowanym. Należy mieć na uwadze, że tolerancja różnicy wielkości dawki leku jest w tym przypadku znacznie mniejsza niż w przypadku stosowania leków przeciwbólowych, czy przeciwzapalnych. Upraszczając: wielkość realnie dostarczonej do organizmu dawki, nad którą będzie bardzo trudno „zapanować”, która dla jednego pacjenta będzie właściwa, dla innego może okazać się zupełnie nieskuteczna lub – z drugiej strony – toksyczna. W konsekwencji (sugestia recenzenta) – czy nie lepiej zrezygnować z propozycji potencjalnego zastosowania aplikowanego transdermalnie ekstraktu z miłorzębu w onkologii na rzecz – jak się wydaje – bardziej zachowawczej, ale przewidywalnej w skutkach, propozycji wykorzystania tegoż ekstraktu w terapii przeciwbólowej i przeciwzapalnej, oczywiście z wykorzystaniem systemu uwalniania, który zaproponowała i przebadła w swojej pracy Pani mgr Owczarek, której pod rozwagę powyższą kwestię przedstawiam.

Dwa kolejne podrozdziały dedykowane są omówieniu badań dotyczących charakterystyki wytworzonych w pracy mikrokapsulek alginianowych oraz etylocelulozowych, z zamkniętym ekstraktem z *Ginkgo biloba*, zawierających, bądź nie, nanocząstki chitozanowe, odpowiednio: Al(GB) i Al(Ch(GB)NP) oraz Et(GB) i Et(Ch(GB)NP). Autorka przeanalizowała krzywe uwalniania ekstraktu ze wszystkich rodzajów mikrokapsułów. Badania potwierdziły względnie szybkie uwalnianie ekstraktu zarówno z samych mikrokapsułów alginianowych, jak i z mikrokapsułów alginianowych zawierających nanocząstki chitozanowe. Wobec faktu, że podczas potencjalnych aplikacji skórnych zbyt szybkie uwolnienie dużej ilości ekstraktu mogłoby wywołać efekt podrażnienia Doktorantka uznała za wskazane zastosowanie mikrokapsułów z otoczką z etylocelulozy, warunkującej wolniejsze i bardziej równomierne uwalnianie ekstraktu.

Ostatni podrozdział (4.5) poświęcony dyskusji wyników badań, odnosi się do wytworzonej w pracy funkcjonalnej dzianiny bawełnianej, zawierającej mikrokapsuły z nanocząstkami z ekstraktem *Ginkgo biloba*, immobilizowane na jej powierzchni za pomocą kleju chitozanowego. Pani mgr Owczarek wykazała, że zastosowana w tym przypadku podwójna bariera polimerowa, w postaci otoczki etylocelulozowej mikrokapsulek oraz otoczki chitozanowej nanocząstek, stanowi doskonałą ochronę przed utratą substancji aktywnej. W trakcie użytkowania mikrokapsuły ulegają zniszczeniu pod wpływem działania czynników mechanicznych powodując uwalnianie nanocząstek. Badania potwierdziły penetrację nanocząstek przez błonę dializacyjną o wielkości porów zbliżonej do wielkości porów w skórze, w środowisku soli fizjologicznej. Stanowi to jednocześnie potwierdzenie przywołanej już wcześniej tezy rozprawy, że: „możliwe jest wytworzenie materiałów włókienniczych zawierających mikrokapsuły z nanocząstkami z substancją aktywną jako terapeutyczne tekstylia do dostarczania substancji leczniczej drogą transdermalną”.

Część doświadczalną zamyka podsumowanie, w którym Doktorantka przywołuje ponownie, wybrane przez siebie i jednocześnie uznane za najistotniejsze, omówione wcześniej szerzej w trakcie prowadzonej dyskusji, wyniki badań.

Uwagi ogólne

1. Język rozprawy jest poprawny i komunikatywny, choć Autorka nie ustrzegła się sporej ilości błędów interpunkcyjnych i drobnych zaniedbań edytorskich, których – ze zrozumiałych względów – postanowiłem tutaj enumeratywnie nie wymieniać. Stosowne zestawienie zostanie przekazane Doktorantce w postaci oddzielnego dokumentu.
2. Autorka niekiedy buduje bardzo długie zdania, w których, zwłaszcza przy niedoskonałej interpunkcji, czytelnikowi trudno odkryć zamierzony tok myślenia. Przykładowo (str. 56, 4l. od góry): „Metoda kompleksów polielektrolitowych (PEC) jest również nieskomplikowaną metodą, w której oddziaływania (o charakterze elektrostatycznym, hydrofobowym lub związanym z wiązaniami wodorowymi i/lub siłami van der Waalsa) między polikationem (chitozan), a cząsteczką polianionową tworzą kompleksy polielektrolitu jednocześnie neutralizując ładunek pomiędzy obiema cząsteczkami i prowadząc do spadku hydrofilowości [225,232,233].” Inny przykład tego typu zdania (str. 61, 2l. od góry): „Wybór jednej z technologii ich uzyskiwania nie jest prostym zadaniem, ponieważ techniki mikroenkapsulacji są dobrymi przykładami multidyscyplinarnego wykorzystania wiedzy teoretycznej i praktycznej z zakresu nauk takich jak: chemia materiałów (polimerów naturalnych lub syntetycznych), chemia leków, biochemia związków aktywnych (spożywczych i/lub biologicznych), a także inżynieria procesów oraz specjalistyczne metody analizy jakości wykorzystanych surowców i otrzymanych produktów w tym procesie.”
3. Ostatnia uwaga odnosi się do zaproponowanej, zdaniem recenzenta – zbyt skomplikowanej, choć logicznej, kodyfikacji opisywanych i badanych w pracy materiałów, przykładowo: Al(Ch(GB)NP), Et(Ch(GB)NP), niekiedy w znacznej mierze utrudniających lekturę rozprawy.

Ocena pracy

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca doktorska jest na bardzo dobrym poziomie i oceniam ją wysoko. Wskazane wyżej drobne uwagi, czy raczej sugestie, mają charakter drugoplanowy i absolutnie nie obniżają wartości merytorycznej pracy. Zaprezentowane w rozprawie wnioski są spójne i logiczne. Doktorantka w sposób konsekwentny zrealizowała zaplanowane rozległe przedsięwzięcie badawcze.

W tym kontekście, godnym podkreślenia wydaje się zwłaszcza poziom opanowania przez Nią warsztatu różnorodnych badań eksperymentalnych. Sądzę, że zdobyte w trakcie realizacji pracy doświadczenie badawcze będzie stanowić źródło inspiracji do dalszej aktywności naukowej i publikacyjnej Autorki.

Wniosek końcowy

Na podstawie przeprowadzonej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Owczarek pt. „Terapeutyczne tekstylia wykorzystujące transdermalne systemy dostarczania substancji aktywnych” pragnę jednoznacznie stwierdzić, iż spełnia ona wymogi określone w art. 13 ust.1

obowiązującej, w dniu wszczęcia postępowania o nadanie stopnia doktora, Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O Stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony.

Z wyrazami szacunku –

dr hab. inż. Janusz Fabia, prof. UBB