

Uzasadnienie wniosku o przyznanie nagrody Prezesa Rady Ministrów za wyróżniającą się rozprawę doktorską dla Pani dr Dominiki Krenczkowskiej

Wniosek o przyznanie nagrody Prezesa Rady Ministrów za wyróżniającą się rozprawę doktorską, określoną w Rozporządzeniu Prezesa Rady Ministrów z dnia 21 maja 2019 r. w sprawie kryteriów i trybu przyznawania nagród Prezesa Rady Ministrów oraz wzoru wniosku o ich przyznanie (Dz. U. z 2019 r. poz. 976 z późn. zm.) zwanego dalej: „Rozporządzeniem”, dotyczy rozprawy doktorskiej dr n. farm. Dominiki Krenczkowskiej zd. Glamowska pt. „**Ocena barierowości skóry ludzkiej ex vivo wobec niskocząsteczkowych siloksanów o strukturze cyklicznej**”. Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem promotor dr hab. n. farm. Krystyny Pieńkowskiej, w ramach studiów doktoranckich. Publiczna obrona odbyła się w dniu 18 stycznia 2022 roku, podczas której, Uchwałą Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, nadano mgr. farm. Dominice Krenczkowskiej stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplina nauki farmaceutyczne. Rozprawa doktorska została obroniona z wyróżnieniem.

Wybrany temat rozprawy doktorskiej mieści się w szeroko rozumianej problematyce barierowości skóry ludzkiej, ukierunkowanej zarówno na bezpieczeństwo stosowania produktów na skórę, skuteczności działania substancji aktywnych, w tym leczniczych, które stosowane są do sporządzania formułacji dermalnych jak i transdermalnych, jak również badania mechanizmów dyfuzji.

Skóra stanowi nie tylko istotną drogę podawania substancji leczniczych, ale jest także ważną barierą powierzchniową, chroniącą organizm przed szkodliwym działaniem czynników zewnętrznych. Stąd, od wielu lat jest obiektem zainteresowania zespołów naukowych. Szczególnym przyczynkiem podejmowania badań przez naukowców z różnych ośrodków o renomie światowej jest weryfikacja ryzyka pokonywania bariery skórnej przez substancje toksyczne, silnie działające, mające zdolność do kumulowania się w organizmie lub, gdy są popularnym składnikiem produktów na skórę, dla których konieczna jest ocena bezpieczeństwa ich stosowania. Do tego nurtu należy bezpośrednio prezentowana rozprawa doktorska.

Głównym celem badawczym, dotąd nie podejmowanym przez inne zespoły badawcze, była ocena barierowości skóry ludzkiej ex vivo wobec trzech niskocząsteczkowych siloksanów o strukturze cyklicznej: oktametylocyklotetrasiloksanu – D4, dekametylocyklopentasiloksanu – D5 oraz dodekametylocykloheksasiloksanu – D6, które powszechnie stosowane są w produktach na skórę: leczniczych, do pielęgnacji ciała, czy kosmetykach. Ocena barierowości obejmowała badanie zdolności penetracji warstwy rogowej naskórka (*stratum corneum*) oraz głębokości przenikania tych związków do naskórka żywego (*epidermis*) i skóry właściwej (*dermis*) z określeniem prawdopodobnej drogi dyfuzji. Ponadto celem badawczym była analiza dawek skumulowanych D4, D5 i D6 w jednostkach [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/24\text{h}$] we frakcjonowanych warstwach skóry oraz płynie akceptorowym, jak również wstępna ocena interakcji z lipidami i białkami, które są składnikami strukturalnymi *stratum corneum*, odpowiedzialnego w największym stopniu za funkcje barierowe. Badania poszerzono także w kierunku oceny różnic w barierowości skóry pomiędzy skórą ex vivo mrożoną a niemrożoną, w celu potwierdzenia wiarygodności uzyskanych wyników, jak również zasadności wytycznych OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) i WHO (World Health Organisation) w tym zakresie.

Wyżej wymieniona rozprawa doktorska spełnia wszelkie kryteria do przyznawania nagrody Prezesa Rady Ministrów, o których mowa w Rozporządzeniu, ponieważ:

- a) **zgodnie z § 3 ust. 1 lit. a Rozporządzenia** – w ramach rozprawy zaproponowano rozwiązanie istotnego problemu naukowego jakim była ocena barierowości skóry ludzkiej w stosunku do siloksanów, które są powszechnym składnikiem formułacji na skórę. Pokonanie bariery skórnej jest niebezpieczne zwłaszcza w przypadku

substancji toksycznych, silnie działających lub takich, które mają zdolność do kumulowania się w organizmie, co udowodniono w przypadku badanych związków. Siloksany o strukturze cyklicznej były ważnym obiektem badań, ponieważ związki te obecnie są jednym z bardziej dyskusyjnych zagadnień związanych z zagrożeniem ekosystemu i zdrowia człowieka. Wybór tych związków podyktowany był kilkoma aspektami, między innymi tym, że są powszechnym składnikiem produktów leczniczych i wyrobów medycznych na skórę, jak również kosmetyków i produktów do pielęgnacji ciała, nie tylko dla osób dorosłych, ale także niemowląt. Co więcej badania środowiskowe wskazują, że siloksany są źródłem znacznego zanieczyszczenia ekosystemu (z powodu ogromnych ilości syntez - liczone w dziesiątkach tysięcy ton rocznie), wykazują zdolność do kumulowania się, są toksyczne dla człowieka, np. zwiększają aktywność enzymów wątrobowych, zaburzają funkcjonowanie układu hormonalnego, oddziałują z białkami. Ponadto cykliczny siloksan D4 został zakwalifikowany do kategorii 3 w ocenie wpływu na układ rozrodczy człowieka, co oznacza, że istnieje ryzyko zaburzeń płodności. Jednak zasadniczym powodem podjęcia badań były konkluzje z opublikowanych raportów rządowych i prac naukowych, z których wynika, że człowiek narażony jest na te związki różnymi drogami, poprzez: układ oddechowy, pokarmowy oraz skórę. O ile narażenie przez układ oddechowy i pokarmowy jest już od kilku lat opisywane dość licznie w piśmiennictwie, to niewiele danych odnotowano na temat narażania człowieka przez skórę.

W ramach prac badawczych dr Dominika Krenczkowska zrealizowała wszystkie cele badawcze i potwierdziła sformułowaną na wstępie hipotezę. Udowodniła, że siloksany o strukturze cyklicznej są w stanie pokonać barierę skórną, na skutek penetracji warstwy rogowej naskórka, i w konsekwencji przeniknąć do głębszych warstw skóry: warstwy żywego naskórka i skóry właściwej (gdzie obecne są naczynia krwionośne i limfatyczne) oraz do płynu akceptorowego, co stanowi przesłankę o ryzyku absorpcji do organizmu. Dostarczyła danych o bioakumulacji związków w każdej frakcjonowanej warstwie skóry, przy czym jest ona zróżnicowana w zależności od właściwości fizykochemicznych związków. Wstępnie oceniła interakcje między siloksanami, a składnikami strukturalnymi warstwy rogowej naskórka, tzn. lipidami (głównie ceramidami) oraz białkami (przede wszystkim keratyną obecną w korneocytach). Udowodniła, że skutkiem interakcji siloksanów z lipidami jest możliwość wystąpienia przejść fazowych lipidów z konformacji ortorombowej do heksagonalnej, a nawet ciekłokrystalicznej (fluidalnej), jak również nieodwracalnej ekstrakcji lipidów. W efekcie zaobserwowała dezorganizację struktury stratum corneum i powstawanie wolnych przestrzeni (tzw. luk), co uznano jako istotny efekt utraty barierowości skóry. Ustaliła, że siloksany o strukturze cyklicznej pokonują barierę skórną poprzez drogę międzykomórkową tzn. przez macierz lipidową, która otacza korneocyty oraz przez przestrzeń między klastrami korneocytów, tzw. kaniony. Należy dodać, że w przypadku kanionów ta droga rozpoznana jest w piśmiennictwie naukowym w niewielkim stopniu. Doktorantka postulowała, że kaniony można postrzegać jako kluczową drogę niekontrolowanego przenikania ksenobiotyków do skóry, nawet z pominięciem warstwy rogowej naskórka, odpowiedzialnej za barierowość skóry. Droga ta może okazać się bardzo istotną z uwagi na fakt, że kaniony wchodzą w głąb naskórka żywego, a wpuklając się, są w stanie dotykać połączenia skóro-naskórkowego (ang. dermal-epidermal junction, DEJ), który łączy warstwę żywego naskórka (epidermis) ze skórą właściwą (dermis), gdzie bezpośrednio znajdują się naczynia krwionośne i limfatyczne. Tym samym wykazała, że zwiększa się prawdopodobieństwo łatwiejszej absorpcji (wchłaniania) różnych związków do organizmu. Ten etap badań można zakwalifikować jako szczególnie ważne osiągnięcie pracy. Zaproponowała prawdopodobny mechanizm przenikania testowanych siloksanów przez skórę, jak i przeprowadziła dyskusję wyjaśniającą występowanie różnic pomiędzy podziałem skumulowanych dawek w poszczególnych matrycach,

zwracając uwagę na ewentualny problem dyfuzji do tkanek w procesie długoterminowym, co jak dotąd nie było w piśmiennictwie naukowym dyskutowane. W rezultacie wytypowała także związek (D6), który w najmniejszym stopniu przenika przez skórę, co z punktu widzenia bezpieczeństwa stosowania produktów (leczniczych, pielęgnacyjnych oraz kosmetyków) jest bardzo istotnym osiągnięciem. Jest ono szczególnie przydatne w opracowywaniu nowoczesnych i bezpiecznych dla zdrowia formułacji w przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym. Natomiast udowodniła, że największe ryzyko absorpcji do układu krążenia wiąże się ze stosowaniem siloksanów D4 i D5, stąd takie rekomendacje zostały już opublikowane.

Ważnym osiągnięciem pracy było także wprowadzenie do praktyki badawczej skóry ludzkiej nowej techniki mikroskopowej, którą była cyfrowa mikroskopia holograficzna (DHM). Dotychczas, mikroskop DHM był wykorzystany w nielicznych badaniach biologicznych, głównie ludzkich tkanek, komórek krwi i patofizjologii żywych komórek, w tym komórek nerwowych, stąd interpretacja obrazów warstwy rogowej skóry wymagała interdyscyplinarnego podejścia podczas współpracy z zespołem fizyków z Politechniki Poznańskiej. Ponadto, uzyskane wyniki pozwoliły na wprowadzenie do literatury nowej koncepcji postrzegania barierowości skóry jako 3-poziomowej organizacji. Dotychczasowy model opisany w piśmiennictwie naukowym jest bardzo uproszczony.

Należy podkreślić, że opublikowany cykl prac przyczynia się do rozwoju wiedzy w tematyce barierowości skóry, a dobór warsztatu analitycznego może być z powodzeniem wdrożony do standardowej oceny bezpieczeństwa stosowania różnych ksenobiotyków. Rozprawa doktorska obejmuje nowatorskie rozwiązanie problemu badawczego, dotąd nie publikowane, oraz ma charakter poznawczy. Aspekt naukowy pracy obejmuje wprowadzenie zarówno nowych koncepcji i wiedzy, jak i pogłębienia dotychczasowej. Aspekt praktyczny/aplikacyjny związany jest z rekomendacjami dla przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego celem opracowywania nowoczesnych i bezpiecznych dla zdrowia formułacji na skórę.

- b) **zgodnie z § 3 ust. 2 Rozporządzenia** – rozwiązanie, będące przedmiotem rozprawy, ma wybitnie innowacyjny charakter z uwagi na brak danych o możliwościach dyfuzji przez skórę ludzką różnych siloksanów będących składnikiem powszechnie stosowanych produktów leczniczych i wyrobów medycznych na skórę, jak również kosmetyków i produktów do pielęgnacji ciała, przeznaczonych nie tylko dla osób dorosłych, ale także niemowląt. Ponadto, zaprojektowany schemat badania dyfuzji transdermalnej (procedura) stanowi gotowy sposób postępowania w ocenie barierowości tego narządu, co może być przydatne również w przypadku innych ksenobiotyków, leczniczych lub toksycznych. Dzięki niemu można realizować badania wielokierunkowe, które mogą być pomocne w ocenie potencjalnej skuteczności działania leku (możliwość wnikania do skóry) lub też bezpieczeństwa stosowania różnych produktów na skórę.
- c) **zgodnie z § 3 ust. 3 Rozporządzenia** – dr n. farm. Dominika Krenczkowska zaprezentowała wysoki poziom wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauk farmaceutycznych, a jej umiejętności w zakresie samodzielnego prowadzenia pracy naukowej charakteryzuje wyróżniający poziom. Z uwagi na to, że dotychczas takich badań nie prowadzono, wymagało od doktorantki łączenia wiedzy interdyscyplinarnej zakresu farmacji, biologii, fizyki i zaawansowanych technik analitycznych (m.in. spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera, mikroskopii fluorescencyjnej, chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo jonizacyjnym, jak również zastosowania po raz pierwszy w świecie w badaniach skóry mikroskopii holograficznej). Wysoki poziom przygotowania merytorycznego oraz wyróżniający poziom w zakresie prowadzenia pracy naukowej zostały podkreślone przez obu Recenzentów w trakcie oceny rozprawy doktorskiej.

- d) **zgodnie z § 3 ust. 4 Rozporządzenia** – rozprawa została wysoko oceniona i wyróżniona przez podmiot, który przeprowadził postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora. Recenzenci prezentowanej rozprawy doktorskiej zwrócili uwagę na wysoką wartość merytoryczną prowadzonych badań, oryginalne opracowanie naukowe oraz istotny wkład doktorantki w rozwój dyscypliny naukowej. Przykładowo, Recenzentka prof. dr hab. Bożena Karolewicz podkreślała, że zastosowane w pracy, niespotykane dotąd nowe podejście, do obliczania stosunków dawek skumulowanych oznaczonych dla sąsiadujących warstw skóry, 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. Natomiast Recenzentka prof. dr hab. Katarzyna Winnicka wskazała między innymi, że dzięki badaniom zaproponowano innowacyjną koncepcję opisu barierowości skórnej jako 3-poziomowej organizacji struktury *stratum corneum*, pogłębiono stan wiedzy na temat klastrów i kanionów, a opisane zagadnienia stanowią cenne źródło.

Mając na uwadze powyższe należy uznać, że rozprawa doktorska dr n. farm. Dominiki Krenczkowskiej charakteryzuje się wysoką wartością merytoryczną i poznawczą, proponuje oryginalne i innowacyjne rozwiązanie problemu badawczego o wysokim potencjale naukowym, poznawczym oraz praktycznym/aplikacyjnym.

WYKAZ CYKLU PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ:

- 1) Mojsiewicz-Pieńkowska K., Jamrógiewicz M., Szymkowska K., **Krenczkowska D.** Direct human contact with siloxanes (silicones): safety or risk part 1: characteristics of siloxanes (silicones), *Frontiers in Pharmacology*, 2016, 7, 132, 1-8.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00132>
IF₂₀₁₆ – 4,400
Punktacja wg MEiN - 40
- 2) Mojsiewicz-Pieńkowska K., **Krenczkowska D.** Evolution of consciousness of exposure to siloxanes: review of publications, *Chemosphere*, 2018, 191, 204-217.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.045>
IF₂₀₁₈ – 5,101
Punktacja wg MEiN - 35
- 3) **Krenczkowska D.**, Mojsiewicz-Pieńkowska K., Wielgomas B., Cal K., Bartoszewski R., Bartoszevska S., Jankowski Z. The consequences of overcoming the human skin barrier by siloxanes (silicones): Part 1. Penetration and permeation depth study of cyclic methyl siloxanes. *Chemosphere*, 2019, 231, 607-623.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.154>
IF₂₀₁₉ – 5,778
Punktacja wg MEiN - 100
- 4) **Krenczkowska D.**, Mojsiewicz-Pieńkowska K., Wielgomas B., Bazar D., Jankowski Z. Ex vivo human skin is not a barrier for cyclic siloxanes (cyclic silicones): evidence of diffusion, bioaccumulation, and risk of dermal absorption using a new validated GC-FID procedure. *Pharmaceutics*, 2020, 6, 1-23.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060586>
IF₂₀₂₀ – 6,321
Punktacja wg MEiN - 100

- 5) Mojsiewicz-Pieńkowska K., Stachowska E., **Krenczkowska D.**, Bazar D., Meijer F. Evidence of Skin Barrier Damage by Cyclic Siloxanes (Silicones) – Using Digital Holographic Microscopy. *International Journal of Molecular Science*, 2020, 21, 17, 6375.
<https://doi.org/10.3390/ijms21176375>
IF₂₀₂₀ – 5,923
Punktacja wg MEiN – 140

Łączna wartość współczynnika IF zgodnie z rokiem opublikowania: 27,530

Łączna punktacja ministerialna (MEiN) prezentowanych pracy: 415

Kategoria czasopism: wszystkie z Q1

MANUSKRYPT STANOWIĄCY INTEGRALNĄ CZĘŚĆ BADAŃ – OPUBLIKOWANY PO OBRONIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- 6) Mojsiewicz-Pieńkowska K., Krenczkowska D., Bazar D., Wielgomas B., Cal K., Kaliszan M. Comparative study of the percutaneous permeation and bioaccumulation of a cyclic siloxane using frozen-thawed and nonfrozen ex vivo human skin. *Toxicol. Vitro*, 2022, vol. 82, s. 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105379>
IF₂₀₂₂ – 3,685
Punktacja wg MEiN – 100

Podsumowanie dorobku z zakresu rozprawy doktorskiej:

Łączna wartość współczynnika IF zgodnie z rokiem opublikowania: 31,216

Łączna punktacja ministerialna (MEiN) prezentowanych pracy: 515

Kategoria czasopism: wszystkie z Q1