RDY-BF4100.4.2025
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
RDY/163823/25 BIURO
RADY DYSCYPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE
Podpis 04.09.2025

**Opinia w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

**Pani mgr Agnieszce Kostrzębskiej**

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii Postaci Leku i Biofarmacji

Pani mgr Agnieszka Kostrzębska jest zatrudniona na stanowisku asystentki w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej i Biofizyki Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (UMW). Doktorantka wystąpiła do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UMW z wnioskiem o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Podstawą awansu jest rozprawa doktorska pt. *Trwałość fizykochemiczna i aktywność przeciwdrobnoustrojowa wybranych antybiotyków w układach aktywnie oddziałujących na modelowy łój skórny.* Promotorem rozprawy jest Pan prof. dr hab. Witold Musiał.

Opiniowaną rozprawę doktorską, stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie trzech współautorskich, anglojęzycznych artykułów oryginalnych (P1-P3).

P1. Kostrzębska, A.; Złocińska, A.; Musiał, W. *Evaluation of the Influence of a Hydrogel Containing AMPD on the Stability of Tetracycline Hydrochloride*. Pharmaceutics 2021, 13, 1381.

P2. Kostrzębska, A.; Junka, A.; Brożyna, M.; Musiał, W. *The Assessment of Physicochemical and Antimicrobial Properties of Hydrophilic Gels Containing Tetracycline Hydrochloride and Various Concentrations of Ethanol*. Pharmaceutics 2024, 16, 830.

P3. Kostrzębska, A.; Junka, A.; Musiał, W. *Synergy of Tetracyclines and Potassium Azeloyl Diglycinate (Azeloglycine) in Hydrogels: Evaluation of Stability, Antimicrobial Activity, and Physicochemical Properties*. Int. J. Mol. Sci. 2025, 26, 5239.

Wszystkie prace zostały wydane w latach 2021-2025 w dobrych, międzynarodowych czasopismach naukowych z listy ministerialnej, przypisanych do dyscypliny nauki farmaceutyczne z liczbą punktów 100 lub 140. Poza kopiami prac, stanowiących cykl tematyczny, Doktorantka przedłożyła do oceny skrócony opis najważniejszych osiągnięć wraz wnioskami, streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, oświadczenia współautorów oraz wykaz publikacji wg Biblioteki Głównej UMW z krótkim opisem dorobku naukowego.

Należy podkreślić, że we wszystkich ocenianych publikacjach Pani mgr Agnieszka Kostrzębska jest pierwszym autorem. Dołączone oświadczenia współautorów, potwierdzają wiodący wkład Doktorantki w ich opracowanie, co jest zgodne z deklaracjami opublikowanymi w sekcji *Author Contributions* ocenianych prac.

Przedmiotem niniejszej oceny jest stwierdzenie, czy ww. rozprawa doktorska odpowiada wymaganiom określonym w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 t.j.).

ul. Medyczna 9
PL 30-688 Kraków
tel. +48(12) 62 05 600
fax: +48(12) 62 05 619
tpl@farmacja.cm-uj.krakow.pl

I. Ocena merytoryczna

a) *trafność podjętej tematyki i jej oryginalność wraz oceną uzyskanych rezultatów i ich znaczeniem dla nauki i praktyki*

Poszukiwanie nośników dla skutecznego dostarczania substancji przeciwdrobnoustrojowych do miejsca działania, zapobiegających tworzeniu biofilmu i jednocześnie wywierających efekt synergii, uzupełniający lub nasilający ich aktywność, jest przedmiotem zainteresowania licznych grup badawczych. Ocena skuteczności przeciwdrobnoustrojowej dotyczy najczęściej biofilmu, występującego na powierzchniach różnego rodzaju implantów, sztucznych stawów, czy cewników. W opiniowanej rozprawie, Doktorantka zaproponowała nowatorską koncepcję, tj. opracowanie oryginalnych hydrożeli z chlorowodorkiem tetracykliny, ukierunkowane na eradykację biofilmu z powierzchni łoju skórnego pod kątem miejscowej terapii trądziku. Optymalizacja składu takich preparatów w celu zagwarantowania trwałości antybiotyku, aktywności względem biofilmu, działania pielęgnacyjnego oraz właściwej reologii, która zapewni pacjentom wygodę stosowania, jest bez wątpienia ambitnym kierunkiem badań.

Mimo wielu produktów leczniczych przeznaczonych do terapii trądziku, skuteczne leczenie tej jednostki chorobowej jest nadal wyzwaniem, z uwagi na narastającą lekooporność. Dotyczy to zarówno terapii miejscowej zmian łagodnych, jak i podania doustnego antybiotyków szerokozakresowych w przypadku ciężkich zakażeń. Ponadto działania niepożądane związane z terapią doustną, skłaniają do rozwoju nowych, skuteczniejszych preparatów do podania na skórę. W terapii trądziku korzystne jest, aby nowoopracowany produkt leczniczy miał lekką konsystencję, która nie powoduje zatykania porów, a sprzyja oczyszczeniu powierzchni skóry i mieszków włosowych z nadmiaru sebum, wykazując przy tym działanie przeciwbakteryjne. Dobrą charakterystykę w zakresie działania pielęgnacyjnego cery tłustej i trądzikowej mają półstałe podłoża hydrofilowe, takie jak hydrożele. Ich wzbogacenie o składniki, które mogą tworzyć mydła z kwasami tłuszczowymi zawartymi w łoju skórnym, np. alkoholaminy, może mieć działanie oczyszczające, zapobiegać powstawaniu nowych zmian trądzikowych i tym samym wspomagać proces leczenia. Jednak wprowadzenie do hydrożelu składników alkalizujących powoduje zwiększenie pH układu, co z kolei może niekorzystnie wpływać na trwałość antybiotyku i konsystencję produktu.

Tetracykliny są stosowane przede wszystkim w postaci stałych form doustnych przeznaczonych do terapii ogólnej trądziku. Zarejestrowane są również maści do podania na skórę, które zawierają odpowiednio 3 % chlorowodorku tetracykliny lub 3 % chlorowodorku chlorotetracykliny i są produkowane na wazelinie białej. Nie ma natomiast zarejestrowanego produktu leczniczego na podłożu hydrofilowym, który miałby jednocześnie działanie lecznicze i pielęgnacyjne. Niewątpliwą trudnością technologiczną podczas opracowania takiego preparatu jest ograniczona trwałość antybiotyku w środowisku wodnym. Dane z piśmiennictwa wskazują, że produkty rozkładu chlorowodorku tetracykliny są pozbawione działania przeciwbakteryjnego i dodatkowo mogą wykazywać fototoksyczność. Z tego powodu, Pani mgr Agnieszka Kostrzębska rozpoczęła swoje badania od analizy wpływu pH oraz warunków przechowywania na trwałość hydrożeli i roztworów wodnych z 0,2 % chlorowodorkiem tetracykliny (P1). Przygotowała



Ale

hydrożele na bazie 1 % kwasu poliakrylowego (Carbopol 980 NF). Do zobojętnienia kwasu i wytworzenia hydrożelu zastosowała 1 % alkoholoaminy (AMPD, 2-amino-2-metylo-1,3-propanediolu). Wartość pH hydrożelu wynosiła 6,65. Sporządzone dla porównania roztwory wodne antybiotyku, bez dodatku kwasu poliakrylowego i alkoholoaminy, miały pH ponad dwukrotnie niższe. Doktorantka oceniła wpływ warunków przechowywania, tj. światła i temperatury (5 °C i 23 °C) na trwałość antybiotyku. Obserwacje były prowadzone przez 63 dni, a wnioski końcowe zostały sformułowane w oparciu o wyniki analiz chromatograficznych (HPLC-DAD), mikroskopowych (SEM), dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) oraz ocenę barwy próbek. Kandydatka wykazała, że po dwóch miesiącach przechowywania, stężenie antybiotyku było znacznie większe w hydrożelach niż w roztworach wodnych, przy czym najkorzystniejsze okazało się przechowywanie hydrożeli w chłodzie (5 °C) i ograniczonej ekspozycji na światło. Mimo takich warunków przechowywania na chromatogramach widoczny był dodatkowy pik, wskazujący na powstawanie zanieczyszczenia.

W drugiej publikacji (P2), Pani mgr Agnieszka Kostrzębska analizowała wpływ dodatku etanolu na właściwości reologiczne oraz aktywność przeciwbakteryjną hydrożeli, jak również trwałość chlorowodorku tetracykliny. Stwierdziła, że wszystkie hydrożele miały charakterystykę cieczy nienewtonowskiej rozrzedzanej ścinaniem. Zmniejszenie lepkości hydrożelu następowało, gdy dodatek etanolu wynosił 50 %. Towarzyszyła mu epimeryzacja antybiotyku. Z kolei hydrożele, które zawierały 5 lub 25 % etanolu charakteryzowały się większą lepkością, a reakcja epimeryzacji zachodziła w mniejszym stopniu. Na podstawie obrazów biofilmu *Cutibacterium acnes*, zarejestrowanych w mikroskopie fluorescencyjnym, Pani mgr Agnieszka Kostrzębska oceniła działanie przeciwbakteryjne opracowanych formulacji. Udowodniła, że zastosowanie tetracykliny w połączeniu z etanolem miało silniejsze działanie przeciwbakteryjne niż użycie formulacji bez dodatku antybiotyku.

W publikacji trzeciej (P3), Kandydatka opisała wyniki badań nad opracowaniem preparatów złożonych, w których aktywność przeciwdrobnoustrojową 0,2 % chlorowodorku tetracykliny lub chlorotetracykliny połączono z synergistycznym, przeciwzapalnym i pielęgnacyjnym działaniem 2 % azeloglicyny. Posługując się modelowym biofilmem, wytworzonym *in vitro* przez szczep *Staphylococcus aureus,* wyhodowany na modelowym sztucznym łoju skórnym; Doktorantka potwierdziła aktywność przeciwbakteryjną przygotowanego hydrożelu. W porównaniu do tradycyjnej oceny lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krążkową, zaproponowana metoda umożliwiła wykazanie różnic między hydrożelami z azeloglicyną i bez jej dodatku. Kandydatka wykazała również brak cytotoksyczności formulacji w warunkach *in vivo* przy użyciu modelu biologicznego larw *Galleria mellonella.*

Stwierdziła, że hydrożele z chlorotetracykliną były mniej stabilne niż te z tetracykliną, ale azeloglicyna nie miała negatywnego wpływu na trwałość antybiotyków, a pH hydrożelu zależało od ilości alkoholaminy (AMPD) w nim zawartej. Najbardziej stabilne były hydrożele o lekko kwaśnym pH, które zawierały najmniejsze stężenie AMPD (0.7 %). Z kolei, dodatek azeloglicyny powodował dwukrotne zmniejszenie lepkości hydrożelu w porównaniu z formulacjami, które jej nie zawierały. Model sztucznego łoju skórnego posłużył również do wykazania, że AMPD może wnikać w strukturę sebum i przez tworzenie mydeł, np. stearynowych, sprzyjać oczyszczeniu mieszków włosowych z zalegającego łoju. Z tego powodu,

Doktorantka nie zaobserwowała działania oczyszczającego, gdy badała hydrożele o kwaśnym pH. Reakcja zmydlania zachodziła tylko podczas analizy hydrożeli o odczynie obojętnym lub zasadowym.

Wyniki uzyskane przez Panią mgr Agnieszkę Kostrzębską jednoznacznie pokazują, że opracowanie hydrożelu z tetracyklinami do podania na skórę, który dodatkowo jest wzbogacony o składniki o działaniu pielęgnacyjnym jest zadaniem bardzo ciekawym, lecz zarazem trudnym. Niezbędna jest bowiem taka optymalizacja składu hydrożelu, aby znaleźć kompromis między trwałością antybiotyku w środowisku, które warunkuje zachodzenie reakcji chemicznych, decydujących o działaniu pielęgnacyjnym; a właściwościami reologicznymi półstałego nośnika, decydującymi o walorach aplikacyjnych gotowego produktu.

Po przeczytaniu publikacji P1-P3 wraz z polską wersją omówienia wyników, nasunęło mi się kilka pytań, które zamieszczam poniżej. Wynikają one z ciekawości badawczej recenzenta, a ich postawienie nie umniejsza wartości rozprawy, lecz ma na celu zmotywowanie Doktorantki do kontynuowania podjętego kierunku badań i ukierunkowanie dyskusji podczas obrony rozprawy.

1) Czym było podyktowane wprowadzenie chlorowodorku tetracykliny do hydrożeli w stężeniu 0,2 %?
2) Na str. 40 omówienia wyników, Pani mgr Agnieszka Kostrzębska pisze *„W oparciu o analizy HPLC tetracyklin przedstawione w literaturze, można przypuszczać, że zidentyfikowany pik odpowiada 4-epitetracyklinie – produktowi powstającemu w wyniku odwracalnej epimeryzacji TC."* W jaki sposób, w warunkach laboratoryjnych, posługując się metodami analitycznymi, którymi Doktorantka dysponuje można zidentyfikować to zanieczyszczanie?
3) W recepturze aptecznej do przygotowania kropli do oczu z chlorowodorkiem tetracykliny zalecane są bufory boranowe. Jak Doktorantka ocenia możliwość stabilizacji chlorowodorku tetracykliny w hydrożelach przy zastosowaniu buforów?
4) Czy możliwe byłoby zastosowanie testów przyśpieszonego starzenia do oceny trwałości tetracyklin w opracowanych formulacjach?

*b) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna*

Artykuły oryginalne, stanowiące cykl tematyczny oraz polska wersja ich skróconego omówienia, zostały opracowane bardzo starannie. Tekst jest napisany bardzo przystępnym językiem. Wyniki są przedstawione w czytelny sposób. Szata graficzna opiniowanego opracowania jest bardzo ładna.

Pierwsza drobna uwaga językowa dotyczy polskiej wersji omówienia wyników, gdzie Doktorantka posługuje się sformułowaniem „rozpad związku" do opisu zjawiska rozkładu chemicznego tetracyklin (zmiany struktury chemicznej, *ang. degradation*). W dyscyplinie nauk farmaceutycznych, zgodnie z nomenklaturą farmakopealną, słowa „rozpad" (*ang. disintegration*) używa się raczej w odniesieniu do stałych postaci leku dla określenia zjawiska fizycznego, które polega na utracie pierwotnego kształtu stałej

postaci leku w środowisku wodnym. Oczywiście jeśli postać leku jest złożona z substancji, podatnych np. na hydrolizę, rozpadowi postaci leku może towarzyszyć rozkład chemiczny danego składnika. Niemniej jednak taki przypadek odbiega od kontekstu opiniowanej rozprawy.

Druga drobna uwaga dotyczy jednostki lepkości. Moim zdaniem, w odniesieniu do opracowanych hydrożeli lepiej byłoby wyrazić ją w Pa·s, zamiast w mPa·s.

## II. Ocena metodologiczna

Podstawą awansu są trzy anglojęzyczne artykuły oryginale opublikowane w międzynarodowych czasopismach wraz z omówieniem najważniejszych osiągnieć w języku polskim. Układ i obszerność artykułów wynika z wymagań Wydawnictwa. Podobnie polska wersja omówienia wyników, opisanych w artykułach ma układ typowy dla takich opracowań i rozpoczyna się streszczeniami odpowiednio w języku polskim i angielskim, dalej następuje wprowadzenie teoretyczne, spójny opis założeń i celu pracy, wyszczególnione są metody badawcze. Najbardziej obszerną część stanowi skrócony opis opublikowanych wyników wraz z wynikami prac wstępnych, które nie zostały uwzględnione w cyklu tematycznym, ale tłumaczą zasadność podjętego kierunku badań. Część badawczą przewodnika zamyka sześć spójnych wniosków oraz wykaz piśmiennictwa, liczący 120 pozycji, poprawnie cytowanych w tekście.

Na uwagę zasługuje umiejętność zastosowania przez Doktorantkę nowatorskich metod badawczych do weryfikacji postawionych tez. Przede wszystkim jest to model sztucznego sebum w sztucznym mieszku włosowym, opracowany w UMW we wcześniejszych latach. Pani mgr Agnieszka Kostrzębska wykazała, nie tylko jego przydatność do analizy opracowanych hydrożeli, ale również wskazała na istotne zalety tej metody pod kątem oceny zdolności składników hydrożeli do eradykacji biofilmu, wytworzonego na powierzchni sebum. Kandydatka wykazała wyższość tego modelu nad klasycznym, dyfuzyjnym testem mikrobiologicznym. Interesującą i nową metodą oceny cytotoksyczności w warunkach *in vivo* jest także model biologiczny larw *Galleria mellonella*. Warsztat badawczy Doktorantki uzupełniają zaawansowane techniki analityczne np. wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC-DAD), analizy reologiczne, spektroskopowe (ATR/FT-IR), rentgenograficzne, czy mikroskopowe (SEM, mikroskop fluorescencyjny).

## III. Wniosek końcowy

W opiniowanej rozprawie doktorskiej, Pani mgr Agnieszka Kostrzębska udowodniła, że posiada wiedzę teoretyczną w zakresie nauk farmaceutycznych predysponującą do nadania Jej stopnia doktora. Kandydatka wykazała, że potrafi samodzielnie zaplanować i wykonać eksperyment naukowy, sprawnie posługując się oryginalnymi metodami badawczymi. Wyniki opisane w rozprawie pokazują nowy kierunek rozwoju produktów leczniczych z antybiotykami z grupy tetracyklin, poszerzając m.in. wiedzę nt. ich trwałości. W dalszej perspektywie może to przyśpieszyć opracowanie półstałych preparatów do terapii trądziku.



Ale

W mojej ocenie rozprawa doktorska, autorstwa mgr Agnieszki Kostrzębskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 t.j.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Agnieszki Kostrzębskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie doceniając pionierski charakter rozprawy, aktualność podjętej tematyki i wysoki poziom naukowy badań, jak również aplikacyjny charakter uzyskanych wyników, wnoszę o wyróżnienie opiniowanej dysertacji.

Katedra Technologii Postaci Leku i Biofarmacji UJCM
dr hab. Anna Klupa
Adiunkt

28.08.2025