

Prof. dr hab. inż. Ludomira Granicka
Instytut Biocybernetyki
i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcz PAN, Warszawa
e-mail: lgranicka@ibib.waw.pl

Warszawa, dnia 7 lipca 2022r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr inż. Pauliny Dałek

pt. „Wpływ witaminy C na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej”

1. Forma rozprawy, zakres merytoryczny, tezy i charakter pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Dałek została wykonana na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej w Katedrze Inżynierii Biomedycznej, pod kierownictwem Pana Prof. dr hab. inż. Marka Langnera.

Praca ma typową formę rozprawy doktorskiej. Rozpoczyna się od przedstawienia celu i motywacji prowadzonych badań, wprowadzenia, a następnie opisu części doświadczalnej, w której Autorka, w oparciu o liczne eksperymenty i wyciągane na ich podstawie wnioski, weryfikuje postawione wcześniej tezy badawcze. Rozprawa kończy się podsumowaniem wraz z wnioskami, w którym Doktorantka streszcza otrzymane wyniki, jak również odnosi się do wybranych publikacji (pośród których w jednej jest współautorką) związanych z opracowanymi przez nią zagadnieniami. Praca jest monografią o charakterze interdyscyplinarnym, wpisującą się w obszar tematyczny, związany z naukami fizycznymi i inżynierią biomedyczną.

Tematyka rozprawy dotyczy problemu, jakim jest oddziaływanie występujące pomiędzy cząsteczkami biologicznie czynnymi a błoną lipidową i jego opis. Autorka w swoich badaniach zamierzała wykazać, że pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową występują swoiste oddziaływania, na które wpływ mają skład biwarstwy i warunki środowiskowe. Ponadto oddziaływania witaminy C z dwuwarstwą zmieniają właściwości fizykochemiczne tej ostatniej. Jednocześnie transport tej cząsteczki przez dwuwarstwę lipidową może zostać opisany przez wybrane parametry na podstawie wyników badań

kalorymetrycznych. Praca ma charakter eksperymentalny i zawiera wiele wyników, które wskazują na ich potencjał aplikacyjny.

2. Wprowadzenie – przedstawienie podstawowych pojęć i aktualnego stanu wiedzy

Rozprawa rozpoczyna się od wprowadzenia w zagadnienia, związane z tematyką pracy. W tej części opisane zostały podstawy roli witaminy C w organizmie człowieka i mechanizmów transportu przez błonę komórkową. Poruszony został temat budowy dwuwarstw lipidowych i parametrów opisujących ich właściwości, a także modeli dwuwarstwy. Przedstawiony został przegląd metod pomiarowych wybranych parametrów biwarstwy. Ta część pracy opracowana została na podstawie wybranych pozycji literaturowych, kluczowych dla tego obszaru jak i aktualnych publikacji. Lektura tej części pracy wskazuje, że Autorka posiada odpowiednie przygotowanie merytoryczne i wiedzę, które są niezbędne do realizacji planowanych doświadczeń.

3. Część eksperymentalna – ocena realizowanych zagadnień i metod wykorzystanych do ich weryfikacji – poprawność wyciągniętych wniosków, sposób przedstawiania wyników i formowania wniosków

Weryfikacja tez sformułowanych przez Doktorantkę polegała na odpowiednio zaplanowanych i wykonanych eksperymentach, które realizowała przy pomocy prawidłowo dobranych metod wytwarzania i oceny, stosując narzędzia fizykochemii.

W oparciu o istniejące dane literaturowe Doktorantka uformowała modelową błonę lipidową - liposomy różniące się składem lipidowym. W opisie metod znalazły się niezwykle dokładne opisy zastosowanych technik pomiarowych i zasad ich działania w oparciu o literaturę. Autorka wykorzystwała w badaniach techniki izotermicznej kalorymetrii miareczkującej, dynamicznego rozpraszania światła, polaryzacyjną spektroskopię fluorescencyjną jak również elektroforetyczne rozpraszanie światła.

Część eksperymentalna rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Dałek jest podzielona na trzy części. W pierwszej części Doktorantka zbadła oddziaływania witaminy C z modelową dwuwarstwą lipidową. Oddziaływania między cząsteczkami badano przy użyciu izotermicznej kalorymetrii miareczkującej, stosowanej m.in. do badania oddziaływań między modelową warstwą lipidową a różnymi cząsteczkami, badając zmianę entalpii. Pomiarów wykonano z dużą starannością, z uwzględnieniem czynników, które mogłyby zaburzyć wynik. Autorka wyznaczyła graniczny stosunek jonów askorbinowych do

cząsteczek lipidu, powyżej którego dochodzi do wysokoenergetycznych oddziaływań, ustalając optymalne stężenie jonów do dalszych badań. Doktorantka stwierdziła w zależności od rodzaju lipidów z jakich składa się warstwa lipidowa, istotne różnice w oddziaływaniu z witaminą C. Wykazała również wpływ odczynu pH na te oddziaływania. Ponadto Doktorantka porównała oddziaływanie dwuwarstwy lipidowej z innymi cząsteczkami o podobnych właściwościach do witaminy C, co mogłoby być przyczynkiem do dalszych badań. W kolejnej części, bazując na danych uzyskanych w pierwszej części badań, z pomiarów przy użyciu izotermicznej kalorymetrii miareczkującej, scharakteryzowano przy wykorzystaniu istniejącego modelu, współczynnik podziału błona/woda, a ponadto współczynnik przepuszczalności jako wybrane parametry transportu przez błonę jonów askorbinowych. Uzyskana wartość współczynnika podziału błona/woda wskazująca na większe powinowactwo jonów askorbinowych do dwuwarstwy lipidowej może wskazywać na udział transportu pasywnego na drodze dyfuzji witaminy C przez błonę. W trzeciej części, Autorka określała czy witamina C ma wpływ na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej, stwierdzając zmianę płynności hydrofobowego obszaru błony lipidowej, co znajduje odniesienie do wyników z pierwszej części eksperymentów, wskazujących na powinowactwo witaminy C do dwuwarstwy lipidowej.

Uzyskano szereg wyników wskazujących, że obrana droga może prowadzić do uzyskania wartościowych danych na temat wpływu witaminy C na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej.

Można stwierdzić, że zaplanowane w pracy doświadczenia zostały prawidłowo przeprowadzone, a osiągnięte wyniki i wyciągnięte na ich podstawie wnioski pozwoliły pozytywnie zweryfikować postawione tezy pracy.

4. Oryginalność rozprawy, aktualność tematyki status uzyskanych wyników w odniesieniu do stanu wiedzy

Zakres merytoryczny pracy wpisuje się w niezwykle aktualną obecnie tematykę, jaką są badania struktur i funkcji substancji biologicznie aktywnych oraz mechanizmów molekularnych, które pozwolą na zastosowanie medyczne. Zatem dorobek naukowy Doktorantki należy uznać za odpowiadający aktualnym kierunkom badań. Również jako zawierający przyczynek pogłębiający wiedzę w zakresie badania właściwości fizykochemicznych struktur i oddziaływań molekularnych, w szczególności w odniesieniu do wyników uzyskanych z dobrze zaplanowanych eksperymentów z udziałem testów na

witaminie C i innych cząsteczkach referencyjnych, prowadzonych w różnych warunkach środowiskowych.

Tego rodzaju dane mogą mieć znaczenie dla wielu zastosowań, w tym w projektowaniu układów dozowania leków, a charakteryzowanie oddziaływania pomiędzy materiałem biologicznym a nośnikami leków na bazie liposomów, może pozwolić na weryfikację ich efektywności.

5. Pytania i problemy dyskusyjne dotyczące rozprawy, uwagi merytoryczne i redakcyjne

Jak każde tego rodzaju opracowanie naukowe, rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Dalek zawiera pewne kwestie, które wymagają wyjaśnienia. Niemniej jednak trzeba zaznaczyć, że zawarte uwagi można również traktować jako ewentualne sugestie, które mogą być uwzględnione w kolejnych pracach, związanych z tematyką badania oddziaływań pomiędzy cząsteczkami a błoną lipidową.

- Praca zawiera interesujące, szeroko rozbudowane badania fizykochemiczne, natomiast odnosi się wrażenie, że znacznie mniej uwagi poświęcono charakterystyce strukturalnej materiałów biwarstwy lipidowej, a warto mieć na uwadze, że reakcja komórek na biomateriał jest zarówno wypadkową jego topografii, jak i chemii powierzchni.

- Odnosząc się do uzyskanej przez innych autorów wartości współczynnika przepuszczalności dla witaminy C przez biwarstwę lipidową Autorka, powołuje się na publikację w spisie literaturowym oznaczoną numerem "142" (Christof Hanneschlaeger, Thomas Barta, Hana Pechova and Peter Pohl: The Effect of Buffers on Weak Acid Uptake by Vesicles. *Biomolecules*, 2019), która nie zawierała takiej informacji. Wartości współczynnika przepuszczalności zawarte są w nie cytowanej publikacji: Christof Hanneschlaeger and Peter Pohl: Membrane Permeabilities of Ascorbic Acid and Ascorbate. *Biomolecules*, 2018. Wartość: $1.1 \pm 0.1 \times 10^{-8}$ cm/s do której odniosła się Autorka dotyczyła kwasu askorbinowego, zaś wartość 3×10^{-12} cm/s dotyczyła jonów askorbinowych. Zatem różnica wynosi więcej niż jeden rząd wielkości w stosunku do wyników uzyskanych przez Autorkę. Dobrze byłoby odnieść się do tych rozbieżności. Jednocześnie wyłania się pytanie czy rozważano badanie przepuszczalności w układzie 2- kompartmentowym z wykorzystaniem jako bariery materiału biologicznego -komórek eukariotycznych?

-Należy zwrócić uwagę na stosowanie skrótów myślowych jak stwierdzenie w Podsumowaniu i wnioskach: „...transport na drodze dyfuzji prostej może być brakującym

elementem modelu opisującego utrzymanie lokalnej homeostazy witaminy C jak pokazano w [14]”, co należałoby wyjaśnić.

- Jakie Doktorantka ma przemyślenia/propozycje dotyczące aplikacji witaminy C i zapewnienia odpowiedniej jej efektywności w kontekście wskazania, że uzyskane wyniki stanowiły punkt wyjściowy w modelu opisującym dochodzenie do równowagi wewnątrzkomórkowego stężenia jonów askorbinowych i jego możliwej aplikacji w doustnej podaży witaminy C?

- W podrozdziale 14.2. nie został podany wyznaczony eksperymentalnie promień liposomu (pozostałe wymiary dwuwarstwy, które były zaczerpnięte z literatury zostały podane).

- W ramach uwag redakcyjnych: jakkolwiek Autorka zamieściła informację, że do przedstawienia wyników przyjęła separator dziesiętny w formie kropki, to jednak w języku polskim przyjęta jest forma w postaci przecinka.

Powyższe uwagi nie umniejszają mojej jednoznacznie pozytywnej oceny rozprawy.

6. Wniosek końcowy - wkład rozprawy do nauki

Wyniki uzyskane w recenzowanej pracy doktorskiej, zwłaszcza w zakresie analizy oddziaływania witaminy C z dwuwarstwą lipidową, jak również termodynamicznych i fizykochemicznych właściwości warstwy lipidowej w obecności witaminy C, stanowią istotny przyczynek pogłębiający wiedzę związaną z oddziaływaniem pomiędzy cząsteczkami biologicznie czynnymi a błoną lipidową.

Dane uzyskane w rozprawie można również traktować jako wstępny etap w zakresie badań mających na celu opracowanie liposomalnych nośników leków.

Podsumowując, uważam że przedstawiona praca, zawierająca osiągnięcie naukowe Doktorantki spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Recenzowana praca zawiera dobrze udokumentowane i rzetelnie wykonane wyniki badań eksperymentalnych, dotyczących wpływu witaminy C na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej.

Uważam, że rozprawa spełnia wymogi ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021. poz.478; z późn. zm.).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Biomedyczna Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Pauliny Dałek do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

