

**AGH**AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

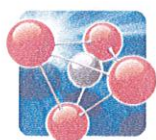
dr hab. inż. Aneta Zima, prof. AGH

Kraków, dn. 14.07.2022r

RECENZJA**Rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Dałek****pt.: „Wpływ witaminy C na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej”****zrealizowanej pod kierunkiem Promotora****prof. dr hab. inż. Marka Langnera**

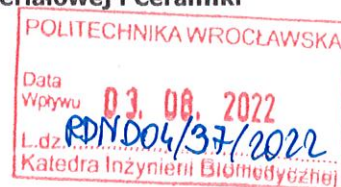
Recenzja została opracowana na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Biomedyczna Politechniki Wrocławskiej z dnia 27 kwietnia 2022r. oraz zlecenia Przewodniczącej Rady Prof. dr. hab. inż. lek. med. Haliny Podbielskiej z dnia 4 maja 2022r.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Dałek pt.: „Wpływ witaminy C na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej” wpisuje się w aktualne nurty badawcze dotyczące poznania roli witaminy C w prawidłowym przebiegu procesów fizjologicznych zachodzących w organizmie człowieka. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań stanowią uzupełnienie wiedzy dotyczącej mechanizmów transportu witaminy C na poziomie komórkowym. Poprzez wykorzystanie modelu dwuwarstwy lipidowej uzyskane rezultaty mogą również znaleźć zastosowanie w terapiach celowanych przy projektowaniu kierowanych nośników leków. Z tego powodu uważam, że podjęta w pracy doktorskiej tematyka jest aktualna i w pełni uzasadniona. Budzi ona duże zainteresowanie w zakresie poznawczym (dotyczącym oddziaływania witaminy C z dwuwarstwą lipidową), aplikacyjnym (dotyczącym projektowania nośników leków), jak również społecznym.



wimic

Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Ceramiki i Materiałów Ogniotrwałych
al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków,
tel. +48 12 617 24 62, fax +48 12 633 46 30
e-mail: agh@agh.edu.pl, www.kcimo.pl



Rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim, liczy 127 stron i składa się z 4 głównych rozdziałów, a mianowicie: **I. Wprowadzenie**, **II. Materiały i metody**, **III. Wyniki**, **IV. Podsumowanie i wnioski**. Na początku pracy znajduje się spis treści, streszczenie w języku angielskim, wykaz ważniejszych symboli i skrótów stosowanych w pracy oraz cel i motywacja prowadzonych badań, które w sposób zwięzły wprowadzają czytelnika w problematykę zbadania. Następnie znajduje się 25 stronicowa część literaturowa. W części praktycznej pracy przedstawiono materiały i metody badań, wyniki uzyskane podczas realizacji pracy, podsumowanie z wnioskami końcowymi oraz bibliografię składającą się z 165 pozycji literaturowych (w tym dwie pozycje w których współautorką jest Pani mgr inż. Paulina Dałek). W końcowej części opracowania Doktorantka zaprezentowała spis rysunków (19 pozycji), spis tabel (10 pozycji), spis wykresów (33 pozycje) oraz swój aktualny dorobek naukowy obejmujący 7 artykułów naukowych (Pani mgr inż. Paulina Dałek jest pierwszym autorem dwóch artykułów, a w pozostałych jest drugim autorem).

Rozprawa doktorska została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Praca jest przejrzysta, tytuł rozprawy jest zgodny z treścią pracy doktorskiej, a cel pracy został precyzyjnie sformułowany. W klasycznym układzie pracy doktorskiej zazwyczaj cel i zakres pracy są umieszczone po części literaturowej. Doktorantka w niniejszej pracy zdecydowała się na postawienie celu na początku rozprawy, wyraźnie wskazując motywację podjętych badań. W mojej opinii dobrze wprowadziło to czytelnika do części literaturowej i uzasadniło konieczność prowadzenia prac eksperymentalnych we wskazanym obszarze. Zaprezentowany przegląd piśmiennictwa, jak na rozprawę doktorską, jest wystarczający. Został przygotowany zarówno w oparciu o starsze piśmiennictwo (najstarsza pozycja pochodzi z 1972 roku), jak również o najnowsze pozycje literaturowe pochodzące z 2021 roku.

W rozdziale 1 części literaturowej Pani mgr inż. Paulina Dałek przedstawiła charakterystykę witaminy C, rolę jaką ona pełni w organizmie człowieka oraz opisała znane mechanizmy transportu witaminy C i jej dystrybucję na przykładzie absorpcji w jelicie cienkim. Z uwagi na fakt, że Doktorantka w części doświadczalnej nie stosowała czystej formy witaminy C w postaci kwasu L-askorbinowego tylko askorbinian sodu, czyli sól sodową kwasu askorbinowego, w mojej ocenie porównanie właściwości tych dwóch form witaminy C byłoby zasadne i powinno znaleźć się w części literaturowej. Stąd do dyskusji na obronę publiczną proszę o przygotowanie wyjaśnienia przez Doktorantkę - ***czym różni się kwas askorbinowy od askorbinianu sodu i jak forma witaminy C może mieć wpływ na uzyskane wyniki badań.***

W rozdziale 2, 3 i 4 części literaturowej Autorka scharakteryzowała dwuwarstwę lipidową pod względem budowy jak i jej właściwości oraz przedstawiła różne

modele dwuwarstwy lipidowej. W ostatnim rozdziale części literaturowej zostały omówione metody pomiarowe jakie stosuje się do wyznaczania wybranych właściwości dwuwarstwy lipidowej, a mianowicie: współczynnika przepuszczalności, temperatury przejścia fazowego, ładunku powierzchniowego czy płynności dwuwarstwy lipidowej.

Wstęp literaturowy jest interesujący i zawiera potrzebne informacje, które są niezbędne do zrozumienia podjętej tematyki badawczej oraz właściwej analizy otrzymanych rezultatów. Niemniej jednak, brakuje rozdziału, w którym pokazane zostałyby również aktualne, często nawet przeciwstawne doniesienia literaturowe dotyczące możliwości wykorzystania witaminy C do leczenia różnych chorób, czy też pokazania możliwości wytwarzania i projektowania odpowiednio sfunkcjonalizowanych liposomów jako nośników leków. Takie informacje byłyby cennym uzupełnieniem części literaturowej, tym bardziej, że na samym początku pracy wskazano również aplikacyjny charakter badań. Ponadto, w mojej opinii zakończenie wstępu literaturowego rozdziałem 5 dotyczącym stosowanych metod pomiarowych do wyznaczania wybranych właściwości dwuwarstwy lipidowej i przejście do drugiej części rozprawy **II. Materiały i metody** wpływa niekorzystnie na czytelność pracy.

Podsumowując, pomimo niewielkich krytycznych uwag dotyczących tej części rozprawy oceniam ją jednoznacznie pozytywnie.

W drugiej części pracy doktorskiej **II. Materiały i metody** Doktorantka przedstawiła materiały oraz metody ich badań. W mojej opinii rozdział 6. *Materiały* jest nieadekwatny do zawartych w nim treści. Cały rozdział mieści się na połowie strony nr 37 rozprawy doktorskiej i jest tylko zestawieniem odczynników chemicznych, które zostały wykorzystane w badaniach. Stąd moje pytanie do Doktorantki: **czy odczynniki chemiczne to materiały?** W opinii Recenzenta korzystniejszym rozwiązaniem byłoby połączenie treści rozdziałów 6 i 7 w jeden rozdział, gdzie można przedstawić zarówno wyjściowe odczynniki chemiczne jak i sposób wytworzenia właściwych liposomów stosowanych w pracy.

W rozdziale 7. *Formowanie liposomów* Pani mgr inż. Paulina Dałek dokładnie opisała proces przygotowania liposomów obrazując to bardzo czytelnym schematem (Rysunek 7.1). Następnie przedstawiła w Tabeli 7.1 zestawienie lipidów, które wykorzystano do wytworzenia liposomów. Niestety brak jest tutaj informacji dlaczego akurat takie lipidy zostały wytypowane. Ta sama uwaga dotyczy dobranej stężenia lipidów. Co prawda krótkie wyjaśnienie pojawia się w części trzeciej rozprawy **III. Wyniki**, ale zdaniem Recenzenta odpowiednim miejscem do przytoczenia tych informacji był właśnie rozdział 7. Ponadto, w rozdziale tym Doktorantka napisała również „...*wytworzone tą techniką liposomy zostały odpowiednio scharakteryzowane poprzez określenie średniego rozkładu struktur, polidispersyjności oraz stężenia lipidów...*” Doktorantka nie wskazała w

którym rozdziale znajdują się wyniki tych badań. W mojej opinii w rozdziale 6 i 7 brakuje charakterystyki wykorzystanego w badaniach askorbinianu sodu (analizy XRD i FTIR) oraz obserwacji SEM lub TEM otrzymanych liposomów. Stąd moje pytanie do Doktorantki: ***czy skład i stężenie lipidów wpływa na morfologię otrzymanych liposomów?***

Dla zrealizowania celu pracy, którym było określenie „*czy pomiędzy wybraną molekułą - witaminą C, a modelową błoną lipidową dochodzi do oddziaływań, i w jaki sposób wpływają one na właściwości dwuwarstwy lipidowej*” oraz udowodnienia przyjętych trzech tez badawczych postawionych na początku rozprawy w następującym brzmieniu:

1. *Pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową występują specyficzne oddziaływania, które różnią się w zależności od składu lipidowego dwuwarstwy lipidowej oraz warunków środowiskowych.*
2. *Parametry termodynamiczne powiązane z oddziaływaniami występującymi pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową, umożliwiają wyznaczenie wielkości charakteryzujących transport tej molekuły przez dwuwarstwą lipidową.*
3. *Oddziaływania pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową zmieniają właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej.*

Doktorantka zaproponowała spójny merytorycznie program badawczy.

Część trzecia rozprawy **III. Wyniki** zawiera rezultaty badań oraz ich dyskusję. Została podzielona na 3 główne rozdziały, które odnoszą się do wcześniej przyjętych przez Panią mgr inż. Paulinę Dałek tez pracy. Taki układ sprawił, że praca jest przejrzysta oraz zrozumiała dla czytelnika. Rozdziały 13, 14 i 15 zostały odpowiednio przedyskutowane i podsumowane.

W pierwszej kolejności Doktorantka zaprezentowała wyniki badań oddziaływania witaminy C z dwuwarstwą lipidową z wykorzystaniem techniki ITC, w zależności od: stężenia jonów askorbinowych, składu i uporządkowania dwuwarstwy lipidowej, pH środowiska wodnego. W rozdziale 14 przedstawiono ciekawe wyniki wskazujące na większe powinowactwo witaminy C do środowiska niepolarnego. Końcowy fragment tej części pracy obejmował prezentację wyników badań właściwości fizykochemicznych dwuwarstwy lipidowej w obecności witaminy C.

Pani mgr inż. Paulina Dałek zrealizowała szereg wzajemnie uzupełniających się badań umożliwiających wykazanie, że obecność jonów askorbinowych poprzez obniżenie temperatury przejścia fazowego i zaniku przedprzejścia fazowego wpływa na interfazę dwuwarstwy lipidowej.

Po analizie przedstawionych przez Doktorantkę wyników badań proszę o wyjaśnienie następujących kwestii:

- dlaczego w tabeli 13.1 (str.60) prezentującej średni rozmiar wielkości liposomów oraz polidispersyjność (PDI) przed i po pomiarze ITC nie podano wyników dla DOPC + 4.2 % mol. DOPE?
- z czego może wynikać zanikanie oddziaływań pomiędzy jonami askorbinowymi, a modelem dwuwarstwy lipidowej w przypadku obecności lipidu DOPE? Dlaczego nie zwiększono liczby cząsteczek askorbinianu sodu w komorze pomiarowej skoro w obecności lipidu DOPE oddziaływania pomiędzy jonami askorbinowymi a modelem dwuwarstwy lipidowej zanikały?
- czy nie byłoby zasadne prowadzenie badań w temperaturze fizjologicznej tzn. 37°C lub lekko podwyższonej np. 39-40°C , a nie tylko w temp. 25°C lub 45°C (witaminę C stosuje się również w przypadku stanu zapalnego organizmu)?
- dlaczego nie sprawdzono jak inne stężenie lipidu DOPS (nie tylko 15% mol) zmienia charakter badanych oddziaływań?
- dlaczego w tabeli 13.4 do porównania właściwości wybranych molekuł podano masę cząsteczkową witaminy C w formie kwasu askorbinowego skoro w badaniach stosowano sól sodową tego kwasu? Na późniejszych zestawieniach prezentowano zmiany entalpii molowej ΔH_{mol} wyznaczonej eksperymentalnie dla askorbinianu sodu.
- jak można wytłumaczyć uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań dotyczące większego powinowactwa witaminy C do środowiska niepolarnego? Wyniki te są rozbieżne z danymi literaturowymi.
- jakimi innymi metodami można spróbować wyznaczyć współczynnik podziału błona/woda aby porównać uzyskane w pracy doktorskiej wyniki badań?

W ostatnim rozdziale pracy Pani mgr inż. Paulina Dałek w sposób prawidłowy dokonała podsumowania zrealizowanych prac badawczych i sformułowała wnioski końcowe.

Pisząc pracę, Doktorantka nie ustrzegła się błędów edytorskich i stylistycznych takich jak np.: „*stanowiły punkt wyjściowych w prowadzonych badaniach*” zamiast „*stanowiły punkt wyjścia w prowadzonych badaniach*”, „*w celu wyznaczenia płynność dwuwarstwy lipidowej*” zamiast „*w celu wyznaczenia płynności dwuwarstwy lipidowej*”, „*alternatywną techniką umożliwiające pomiar potencjału*” zamiast „*alternatywną techniką umożliwiającą pomiar potencjału*”, na str. 66 w tekście zamiast symbolu DOPC + 4.2% mol DOPE pojawił się zapis

DOPE + 4.2% mol DOPE, itp. Doktorantka dwukrotnie użyła słowa „charakteryzacja” na str.31 („... stanowią ważną składową w charakteryzacji tych nośników...” oraz na str. 104 („... zastosowana w charakteryzacji oddziaływań...”) zamiast „charakterystyka”. Słowo „charakteryzacja” odnosi się do literatury bądź stosowane jest w sztuce teatralnej lub filmowej.

Nie wnoszę zasadniczych uwag merytorycznych do zrealizowanych przez Panią mgr inż. Paulinę Dałek badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej. W mojej opinii uzyskane przez Doktorantkę wyniki są interesujące i wnoszą wkład zarówno z punktu widzenia nauk podstawowych, jak również wykazują duży potencjał aplikacyjny. Wymienione uwagi przedstawione w recenzji nie wpływają na wartość naukową pracy doktorskiej. Doktorantka podczas realizacji pracy doktorskiej wykazała się dobrą znajomością zagadnień związanych z oddziaływaniami występującymi pomiędzy molekułami czynnymi biologicznie, a błoną lipidową. Sformułowane zagadnienia z tego obszaru są prawidłowe, a całość pracy doktorskiej wskazuje na umiejętność przygotowania zarówno dobrego planu badań jak i analizy uzyskanych wyników.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Dałek pt. „Wpływ witaminy C na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej” jest bardzo wartościowym dziełem wnoszącym wkład w rozwój dyscypliny „Inżynieria Biomedyczna”. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że spełnia ona wymagania odpowiednich przepisów prawnych stawianych pracom doktorskim (*ustawa z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*) i na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Inżynieria Biomedyczna Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Pauliny Dałek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

