

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

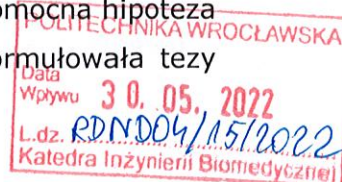
www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii

Wrocław, 24.05.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Dalek pod tytułem
"Wpływ witaminy C na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej"**

Fizjologiczna rola witaminy C w organizmie człowieka jest doniosła, a co za tym idzie także szeroko opisywana. Powszechnie znana jest ona jako jeden z kluczowych przeciwutleniaczy, chociaż bierze udział w zdecydowanie szerszym spektrum procesów komórkowych. W perspektywie faktu, iż człowiek należy do grupy organizmów niesyntetyzujących witaminy C, ważnym jest rozwikłanie zagadki mechanizmów gospodarowania tą cząsteczką na poziomie całego organizmu, poszczególnych tkanek, jak i indywidualnych komórek. W tym kontekście jedną z najistotniejszych kwestii jest transport przez błony biologiczne, który w przypadku hydrofilowych molekuł, takich jak witamina C, przybiera zwykle postać procesu przebiegającego za pośrednictwem integralnych białek błonowych. Z drugiej jednak strony, pasywna przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej względem słabych kwasów, do których należy także wspomniana cząsteczka, jest w literaturze fachowej opisywana jako odgrywająca potencjalnie istotną rolę w warunkach fizjologicznych. Zgromadzona w tym zakresie wiedza wciąż jednak pozostaje w dużym stopniu niekompletna, głównie za sprawą słabo poznanych oddziaływań molekularnych witaminy C z lipidami tworzącymi błony biologiczne. By zmienić taki stan rzeczy konieczne jest zastosowanie narzędzi opartych o modelowe systemy błonowe pozwalających na badania w ściśle kontrolowanych warunkach, co jest niezbędne do jednoznacznej interpretacji obserwowanych zjawisk.

Przedstawiona do oceny dysertacja naukowa wychodzi naprzeciw tym potrzebom. Jej Autorka postanowiła w sposób ilościowy i kompleksowy zbadać właściwości błon lipidowych w kontekście ich oddziaływań z jonami askorbinowymi, które to stanowią dominującą formę witaminy C w warunkach fizjologicznych. Takie podejście bardzo dobrze wpisuje się w zarysowany już w literaturze trend poszukiwania ścieżek transportu tej cząsteczki przez błony, który stanowiłby uzupełnienie (i swoistą przeciwwagę) do systemu aktywnego transportu do wnętrza komórki za pośrednictwem kotransporterów sodowo-askorbinianowych z rodziny SVCT. Do ilościowego ujęcia mechanizmów utrzymywania odpowiedniego stężenia witaminy C w komórkach i tkankach może być pomocna hipoteza dot. transportu pasywnego. W związku z tym Doktorantka trafnie sformułowała tezę





badawcze odnoszące się do zależności oddziaływań witaminy C z błoną w funkcji składu zarówno dwuwarstwy jak i fazy wodnej oraz wpływu witaminy C na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej. Badania Autorki rozprawy doktorskiej na modelu syntetycznych pęcherzyków lipidowych z wykorzystaniem trafnie dobranych technik biofizycznych opartych głównie o izotermiczną kalorymetrię miareczkującą (ITC), spektroskopię fluorescencyjną i pomiary dynamicznego rozpraszania światła, pozwoliły jej uzyskać interesujące i wartościowe wyniki, które znacząco przyczyniają się do uzyskania pełnego obrazu wspomnianych oddziaływań na poziomie molekularnym.

Doktorantka przedstawiła swoje dokonania w postaci klasycznej rozprawy doktorskiej. Należy jednak zaznaczyć, że część przedstawionej w niej wyników została już opublikowana na łamach *Chemistry and Physics of Lipids* (Łukawski i wsp. 2020), a publikacja ta stanowi część stosunkowo bogatego dorobku Doktorantki. Dorobek ten obejmuje siedem prac eksperymentalnych, których tematyka jest ściśle związana z mechaniką dwuwarstw lipidowych, ich oddziaływaniami z witaminami C i D oraz formulacjami liposomowymi tych witamin o dużym potencjale terapeutycznym. Niebagatelne znaczenie tego dorobku dla rozwoju dziedziny naukowej znajduje swoje odzwierciedlenie nie tylko w prestiżu czasopism i ich międzynarodowym zasięgu, ale także w tym, że został on już zauważony w środowisku naukowym, o czym świadczy sumaryczna ilość cytowań wynosząca 29 (bez autocytowań, wg bazy Scopus na dzień sporządzenia recenzji).

Meritum zaprezentowano w języku polskim w postaci czterech głównych części, a całość obejmuje 127 stron. Rozprawa opatrzona jest także streszczeniem w języku angielskim, omówieniem celu i motywacji prowadzonych prac oraz wykazami symboli i skrótów, wykazem dorobku naukowego, spisem rysunków, tabel i wykresów jak również bibliografią obejmującą w sumie 165 pozycji w tym 24 opublikowanych w ciągu ostatnich czterech lat. Pierwszą z głównych części pracy stanowi „wprowadzenie” stanowiące przykład dobrego, zwięźle napisanego podsumowania zdeponowanej dotychczas wiedzy potrzebnej do zrozumienia całości pracy. Właściwym posunięciem było rozdzielenie tego fragmentu na pięć rozdziałów. W pierwszym z nich przedstawione są zagadnienia dotyczące roli witaminy C w organizmie człowieka. Z perspektywy tematyki pracy zaskakuje nieco fakt, iż rozdział ten jest przedstawiony w bardzo oszczędnej formie. Kolejne elementy składowe tej części pracy stanowią kompendium wiedzy o właściwościach dwuwarstwy lipidowej oraz modelach eksperymentalnych i technikach wykorzystywanych przez Doktorantkę. Generalnie, wstęp jest napisany w sposób interesujący i klarowny, a wrażenie takie potęgowane jest odpowiednim doбором rycin. Niemniej, Autorka nie ustrzegła się przed

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad_cytobiochemii

popętnieniem kilku drobnych, aczkolwiek istotnych błędów i nieścisłości. Przykładami tego są m.in. błędny schemat przedstawiający strukturę sfingomieliny na rysunku 2.3, postulat o obecności cholesterolu we wszystkich komórkach eukariotycznych (s. 20), niejednoznaczne określenie elementów strukturalnych fosfolipidów wpływających na płynność błony (s. 27), lokalizację ładunku w postaci znaku „-„ wewnątrz dwuwarstwy lipidowej na rysunku 3.2, nieco dziwnie brzmiące (szczególnie dla biologa) sformułowanie „macierz wewnątrzkomórkowa” użyte w odniesieniu do cytoplazmy. Z kolei od strony koncepcyjnej nie do końca zrozumiałe jest omawianie modeli komputerowych (s. 30) w ramach rozdziału 4 traktującego o modelach dwuwarstwy lipidowej (szczególnie, że opis ten ze względu na swoją powierzchowność mało wnosi do całości pracy), zaliczenie monowarstw Langmuir-Blodgett do „modeli na podłożu stałym” oraz wliczenie techniki *in vitro* opartej o komórki Caco-2 hodowane na membranie oddzielającej dwie komory z pożywką do metod pomiarowych wybranych właściwości dwuwarstwy lipidowej (s. 32).

Następna część to zawierający się na osiemnastu stronach opis użytych w ramach realizacji badań materiałów i metod. Napisana jest ona w sposób przejrzysty i logiczny, przy czym na uwagę zwraca w szczególności dbałość o wyjaśnienie zjawisk, na których opierają się poszczególne techniki badawcze. Z drugiej strony, w wielu miejscach brakuje szczegółowości koniecznej do zagwarantowania pełnej odtwarzalności opisywanych eksperymentów. Brakuje m.in. danych dot. membran użytych do ekstruzji, opisu metody oznaczania stężenia lipidów, sposobu wyliczenia parametru „PDI width”, szczegółów pomiaru pH, typu i producenta kuwety użytej do pomiarów ELS, itp.

Centralnym punktem rozprawy doktorskiej jest licząca 45 stron część obejmująca opis uzyskanych wyników. W pierwszej kolejności Autorka opisuje cenne dane dotyczące oddziaływania witaminy C z dwuwarstwami lipidowymi o różnym składzie i stopniu uporządkowania uzyskane przy użyciu metody izotermicznej kalorymetrii miareczkującej. Opis kroków potrzebnych do optymalizacji podejścia metodologicznego wskazuje, że Doktorantka bardzo skrupulatnie podeszła do swojego zadania, a zaangażowanie intelektualne pozwoliło jej na rzetelne opracowanie i interpretację uzyskanych wyników. Wynika z nich, że błony fosfatydylocholinowe wiążą witaminę C, a obecność cholesterolu, fosfatydyloetanolaminy lub fosfatydylseryny w dwuwarstwie znacząco wpływa na te oddziaływania. Nie uzyskano jednak jednoznacznej odpowiedzi na pytanie jak stopień uporządkowania dwuwarstwy lipidowej wpływa na te oddziaływania. Przeszkodą okazał się zastosowany model błonowy złożony z DPPC, którego stosunkowo wysoka temperatura głównego przejścia fazowego (T_m) niesie ryzyko rozpadu jonów askorbinowych w trakcie eksperymentu. Być może zastosowanie lipidu o niższej wartości T_m , na przykład DMPC,



pozwoliłoby obejść wspomniany problem? Z kolei obserwowane w dalszych eksperymentach różnice w oddziaływaniach w zależności od pH fazy wodnej wskazały, że to jony askorbinowe (a nie inne formy witaminy C) są odpowiedzialne za wysokoenergetyczne oddziaływanie z błoną. Doktorantka podjęła także próby odniesienia uzyskanych rezultatów do oddziaływań dwuwarstwy lipidowej z innymi molekułami hydrofilowymi celem identyfikacji potencjalnych korelacji pomiędzy mierzonymi parametrami termodynamicznymi a właściwościami fizykochemicznymi tych molekuł. Jednak przetestowanie jedynie czterech dodatkowych związków w odniesieniu do dwuwarstwy DPPC wskazuje, że tę część wyników należy traktować raczej jako punkt wyjściowy do dalszych, bardziej rozbudowanych badań. Przy tej okazji nasuwa się pytanie, dlaczego do tych eksperymentów wybrano pęcherzyki zbudowane z DPPC a nie z DOPC. Szerszego komentarza ze strony Autorki wymaga też zestawienie ze sobą wyników uzyskanych dla próbek o różnym stężeniu liposomów na wykresach 13.17 i 13.19.

Wyniki opisane w kolejnym rozdziale są owocem badań parametrów termodynamicznych uzyskanych metodami kalorymetrycznymi mających na celu sparametryzowanie procesów potencjalnie związanych z transportem witaminy C przez dwuwarstwę lipidową. Cenną zdobyczą jest wyznaczenie współczynników podziału błona/woda dla jonów askorbinowych i porównania ich wartości do danych literaturowych w zakresie współczynnika podziału oktanol/woda i w odniesieniu do powszechnie akceptowanej zasady Owertona. Pozwoliło to Autorce postawić śmiało, aczkolwiek w pełni uzasadnione twierdzenie, że współczynnik podziału oktanol/woda nie jest dobrym parametrem w kontekście oddziaływań z dwuwarstwą lipidową. Dalszych uściśleń wymagałoby jedynie to czy prezentowane dane wskazują na niedoszacowane uprzednio powinowactwo do jak to ujęła Autorka „środowiska niepolarnego”, czy raczej w większym stopniu mówią one o powinowactwie do interfazy błona/woda? Przy okazji opisywania tego problemu Doktorantka pominęła niestety najistotniejsze z perspektywy tego zagadnienia doniesienie literaturowe (Hanneschlaeger i Pohl 2018 Membrane Permeabilities of Ascorbic Acid and Ascorbate, *Biomolecules* 8: 73). Wspomniana praca jest też ważnym punktem odniesienia przy omawianiu współczynnika przepuszczalności witaminy C przez dwuwarstwę lipidową. Autorzy wspomnianej pracy opisują oparty o technikę skaningowej mikroskopii elektrochemicznej sposób wyznaczania tego współczynnika i postulują, że jego niska wartość wskazuje na niskie znaczenie fizjologiczne dyfuzji pasywnej w transporcie przezkomórkowym. Doktorantka w swojej pracy stworzyła alternatywny model pozwalający na obliczenie tego parametru w oparciu o dane pozyskane z eksperymentów ITC. Takie podejście jest niezwykle interesujące i może sprzyjać

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii

pełniejszemu opisywaniu wielu zjawisk, jednak wszystko wskazuje na to, że opierając się tylko na tym podejściu niezwykle trudno jest jednoznacznie określić czy mierzony parametr rzeczywiście wynika ze zjawiska przepuszczalności czy też po prostu oddziaływania z dwuwarstwą lipidową (a w szczególności z interfazą błona/woda). Za tą drugą interpretacją przemawia brak obserwowalnych różnic pomiędzy wartościami współczynnika przepuszczalności dla błon zbudowanych z DOPC i tych złożonych z DPPC w temperaturze 25°C. Podana przez Autorkę konkluzja brzmiąca „Inny stopień uporządkowania błony lipidowej wraz z jednoczesnym brakiem różnicy w wartości współczynnika przepuszczalności może oznaczać, że organizacja części hydrofobowej nie wpływa na proces oddziaływań witaminy C oraz jej możliwy transport przez błonę lipidową, a większą rolę odgrywa interfeza.” wymaga bardziej dogłębnej i ostrożnej weryfikacji, szczególnie w kontekście doniesień literaturowych definiujących różnice w przepuszczalności błon DOPC i DPPC (np. Frallicciardi i wsp. 2022 Nat Commun 13: 1605; opublikowane jako tzw. preprint w lipcu 2021).

W kolejnym rozdziale opisane zostały rezultaty badań nad wpływem jonów askorbinowych na wybrane parametry fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej. Doktorantka słusznie skoncentrowała się na temperaturze przejścia fazowego, mikrolepkości dwuwarstwy lipidowej i ładunku powierzchniowym. Pierwszy z wymienionych parametrów wyznaczony został dla błon złożonych z DPPC metodą dynamicznego rozpraszania światła. Uzyskane wyniki są interesujące, jednak powstaje pytanie czy ze względu na prowadzenie eksperymentu w zakresie temperatur 26-45 °C mogą być one obarczone błędem wynikającym z wspomnianego już wcześniej przez Autorkę (s. 71) ryzyka rozpadu jonów askorbinowych w trakcie eksperymentu? Być może także w przypadku tych pomiarów zastosowanie innego lipidu jak 16:0-14:0 PC ($T_m = 27^\circ\text{C}$) lub 15:0 PC ($T_m = 35^\circ\text{C}$) pozwoliłoby uniknąć tego typu wątpliwości? Płynność dwuwarstwy lipidowej mierzono z wykorzystaniem fluorescencji polaryzacyjnej względem pęcherzyków lipidowych wyznakowanych sondą DPH. W badaniach tych Doktorantka udowodniła, że jony askorbinowe znacząco zmniejszają mikrolepkość, a tym samym zwiększają płynność dwuwarstwy złożonej z DOPC. Bardzo pożądane byłyby rozszerzenie tych badań o błony zawierające DOPE lub cholesterol w kontekście wyników prezentowanych w rozdziale 13.2. Z kolei badania potencjału zeta i mobilności elektroforetycznej także wskazują na interakcje jonów askorbinowych z błoną DOPC, przy czym inne związki hydrofilowe miały na te parametry znacznie większy wpływ. Poszukiwanie korelacji pomiędzy zmianą mikrolepkości a ładunkiem efektywnym dla badanych molekuł jest dobrym pomysłem, ale z pewnością do wyciągnięcia bardziej



jednoznacznych wniosków konieczne byłoby uwzględnienie w badaniach szersze spektrum molekuł.

Podsumowując, konstrukcja logiczna części opisującej wyniki jest spójna i pozwala na bardzo dobrą ocenę wagi poczynionych obserwacji, co w dużym stopniu jest też zasługą na ogół prawidłowo przygotowanych ilustracji i tabel. Drobna uwaga adresowana do tej części pracy dotyczy potrzeby zunifikowania sposobu przedstawiania stosunków molowych (na niektórych wykresach występują one w formie „ n_{AS}/n_{LIP} ”, w innych „ n_{LIPID}/n_{AS} ”, a w jeszcze w innych jako mało sprecyzowany „ułamek molowy”)

Recenzowana praca doktorska zwieńczona jest częścią zatytułowaną „Podsumowanie i wnioski”, która stanowi syntetyczne przedstawienie najważniejszych osiągnięć i wnioski wypływające z uzyskanych wyników. Ta część utwierdza w przekonaniu, że dokonania Doktorantki mają znaczący wpływ na rozwój reprezentowanej dziedziny naukowej. Niemniej, po przeczytaniu całości pracy odbiorca może odczuwać pewien niedosyt ze względu na niedoreprezentowany element dyskusji i krytycznego podejścia do stosowanej metodologii i uzyskanych wyników. Odniesienia prezentowanych wyników do aktualnego stanu wiedzy są raczej skąpe i miejscami sprawiają wrażenie nie do końca kompletnych. W szczególności kilka kwestii wymienionych poniżej godne jest głębszego omówienia.

1. Jak zaznaczono na s. 84 dane pozyskane za pomocą metody ITC mogą służyć do kwantyfikacji oddziaływań cząsteczek z błoną lipidową, jednak nie wydaje się możliwe jednoznaczne zdeterminowanie charakteru tego typu oddziaływań. Stąd potrzeba weryfikacji tych wyników za pomocą innych metod pozwalających na bardziej bezpośredni pomiar zdolności do przenikania cząsteczki przez błonę, takich jak wspomniana już skaningowa mikroskopia elektrochemiczna, elektronowy rezonans paramagnetyczny, itp. Najprawdopodobniej z tego też powodu publikacja Łukawski i wsp. 2020 (której współautorką jest Doktorantka) oprócz danych kalorymetrycznych obejmuje wyniki uzyskane za pomocą podejścia opartego o ultrafiltrację. Dane opisane w tej publikacji są interesujące, jednak z niewiadomych względów nie zostały w odpowiedni sposób przytoczone w pracy doktorskiej.
2. Wyznaczony współczynnik przepuszczalności jonów askorbinowych przez dwuwarstwę lipidową jest zgodny co do rzędu z wartościami uzyskanymi przez inne zespoły w oparciu o technikę jądrowego rezonansu magnetycznego (Sapper i wsp. 1985 J. Microencapsul 2: 23) lub o rząd wielkości niższy (wspomniana powyżej praca Hanneschlaeger i Pohl 2018). Ważne w tym kontekście byłoby dogłębne przedyskutowanie wad i zalet poszczególnych podejść eksperymentalnych celem oceny wagi tych danych.

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**

ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii

3. Autorka pracy postuluje, że wyznaczone wartości współczynnika przepuszczalności jonów askorbinowych przez dwuwarstwę lipidową świadczą o tym, że dyfuzja bierna może odgrywać istotną rolę w homeostazie witaminy C w organizmie. Odnosząc te wartości do rysunku 3.1 warto by przedyskutować tę kwestię w porównaniu do innych cząsteczek o dużej roli fizjologicznej, np. do glukozy. W perspektywie warunków fizjologicznych, ważne byłoby także bardziej szczegółowe omówienie możliwej konwersji różnych form witaminy C (jak przedstawiono na rysunku 1.1) na różnych etapach asocjacji i przechodzenia przez dwuwarstwę lipidową (np. poprzez indukowane interfazą lokalne zmiany pH). Co więcej, w niektórych proponowanych modelach opisujących wpływ tych jonów z komórki konieczne jest uwzględnienie transporterów białkowych. Środowisko naukowe wielokrotnie spekulowało na temat istnienia takich eksporterów, jednak w ostatnim czasie zidentyfikowano tego typu białko (GLUT12) i udowodniono jego rolę w utrzymaniu właściwego stężenia witaminy C w mózgach zwierząt doświadczalnych (Miyata i wsp. 2022 iScience 25 103642).
4. Niektóre z założeń zawartych w pracy wymaga szerszego komentarza. Jak oddziaływania witaminy C z błoną lipidową będą zależały od obecności/stężenia fizjologicznie istotnych jonów jedno- i dwuwartościowych (por. pierwsza teza badawcza na s. 8) oraz od istnienia potencjału błonowego? Dlaczego w perspektywie niedoboru danych na temat penetracji części hydrofobowej dwuwarstwy lipidowej przez witaminę C wyznaczony dla tej cząsteczki współczynnik podziału błona/woda „wskazuje na większe powinowactwo tej molekuly do środowiska niepolarnego”?

W ujęciu całościowym praca wywiera bardzo dobre wrażenie zarówno pod względem stylu wypowiedzi jak i edycji tekstu, ilustracji oraz tabel. Harmonijny obraz zaburza nieco kilka niefortunnych sformułowań, jak na przykład „...tworzenie się por błonowych...” (s. 26) – poprawna forma to „porów błonowych”, dana technika nie może być „...trudniejsza w interpretacji.” (s. 35), „...niskich wartości elektrolitów w próbce...” (s. 96), „...wartości mikrolepkości wybranych molekuł...” (s. 99), itp. Błędy typograficzne i edytorskie są stosunkowo nieliczne, jak na przykład w wykazie symboli i skrótów niektóre skróty pisane są kursywą a inne nie, niekompletna nazwa TMA-DPH, PDI to indeks polidispersyjności (nie polidispersyjność), brak polskich nazw dla PAMPA i SLB, SVCT1 i SVCT2 to nie kanały białkowe (s. 15), DOPE to nie 1,2-dipalmitoilolo-3-glicero-3-fosfoetanoloamina (s. 37), nie do końca logiczne rozdzielanie ilustracji na wykresy i rysunki (tym mniej zrozumiałe, że wśród tych ostatnich można spotkać takie składające się jedynie z wykresów jak w przypadku np. 13.1, 14.1 i 15.1), brak uzasadnienia stosowania dużej litery przy

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii

odnoszeniu się do rysunków, tabel itp. w tekście. W kilku miejscach pojawiły się odnośniki do niewłaściwych pozycji bibliograficznych (np. [17] na s. 81, [142] na s. 84 i 85, [158] na s. 93, itp.). Pragnę jednak podkreślić, że wyszczególnione drobne niedociągnięcia nie mają istotnego wpływu na pozytywną recepcję pracy, która z pewnością stanowi wartościowe osiągnięcie naukowe.

W moim przekonaniu przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Dałek spełnia wszystkie warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone przez obowiązującą ustawę o stopniach i tytułach naukowych, a dorobek naukowy Doktorantki w pełni uzasadnia nadanie jej stopnia naukowego doktora w dyscyplinie naukowej inżynieria biomedyczna. Niniejszym wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Pauliny Dałek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Aleksander Czogalla