



Poznań, dnia 14.04.2015 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej Pani mgr Beaty Łubkowskiej

pt.: „Peptydy w kosmetyce – projektowanie sekwencji, synteza oraz badania właściwości w produktach kosmetycznych”

opracowana na zlecenie Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

(L. dz.-8010-WCH/IP-24/2015) z dnia 12 stycznia 2015 r.

Recenzowana praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr. hab. Zbigniewa Maćkiewicza na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego i leży w zakresie badań prowadzonych przez grupę badawczą Promotora pracy, obejmującym m.in. syntezę, charakterystykę właściwości peptydów, w szczególności o właściwościach przeciwbólowych i przeciwnowotworowych, a obecnie także o znaczeniu kosmetycznym. Profesor Zbigniew Maćkiewicz jest wybitnym specjalistą w zakresie chemii peptydów i aminokwasów – w tym nurcie prowadzonych przez niego badań jest zlokalizowana recenzowana praca doktorska. Przedmiot pracy doktorskiej jest wysoce interesujący, albowiem zakotwiczony jest w zakresie szeroko rozumianej chemii kosmetycznej. Główną inspiracją do podjęcia przez Doktorantkę badań jest duże zapotrzebowanie przemysłu kosmetycznego na nowe grupy oligopeptydów w charakterze nowych substancji aktywnych.

Badania wykonane w ramach przedłożonej do recenzji pracy były współfinansowane dwukrotnie ze środków Unii Europejskiej w ramach stypendium **„Kształcimy najlepszych – kompleksowy program rozwoju doktorantów, młodych doktorów i akademickiej kadry dydaktycznej Uniwersytetu Gdańskiego”**, komponentu „Wsparcie stypendialne i szkoleniowe dla doktorantów i młodych doktorów oraz projektu systemowego **„InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów, V edycja”**”. Wyżej wymienione fakty

pozwalają na wstępną pozytywną ocenę ważności tematyki dysertacji, w szczególności w aspektach aplikacyjnych i użytkowych.

Praca liczy 196 stron, zilustrowana jest 62 rysunkami i zawiera 47 tabel. Tytuł przedłożonej rozprawy doktorskiej został poprawnie zdefiniowany i odpowiada przedstawionym wynikom badań. Praca napisana jest w języku polskim, w układzie niemal klasycznym i jest podzielona na rozdziały:

- ✓ wstęp i część literaturową (53 strony);
- ✓ cel pracy (2 strony);
- ✓ część eksperymentalna/metodyka pracy (27 stron)
- ✓ omówienie wyników i ich dyskusja (83 strony);
- ✓ wnioski - podsumowanie końcowe wyników (2 strony);

Całość pracy zakończona jest spisem literatury, który obejmuje 203 prace. Dysertacja doktorska kończy się wykazem prac naukowych oraz komunikatów prezentowanych przez Doktorantkę publicznie, tj. 1 publikacji opublikowanej w czasopiśmie z listy JCR oraz pięciu w recenzowanych czasopismach związanych z tematyką pracy, trzech rozdziałach książkowych oraz czterech innych, co wyraźnie wskazuje, że tezy rozprawy doktorskiej zostały już bardzo dobrze opublikowane. Ponadto Autorka wykorzystuje swoje prace w części literaturowej i dyskusji wyników, tj. jest współautorką pozycji literaturowych 54, 105, 149, 200-202.

Część doświadczalna pracy została poprzedzona kompetentnie i przejrzystym ujętym przeglądem literatury, w którym Pani mgr Beata Łubkowska syntetycznie przedstawiła istotne zagadnienia związane z tematyką przedstawionej pracy. A mianowicie opisała pojęcia związane z budową, procesami starzenia się, metodami pielęgnacji i ochrony skóry, a także co najważniejsze zajęła się opisem mechanizmu przenikania przez skórę. Przeprowadziła przegląd literaturowy nt. metod badania kosmetyków. W szczególności opisała techniki badań *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. Opisała rolę peptydów w kosmetykach. Ogólnie część literaturowa jest bardzo interesująca, tematy są trafnie dobrane, zaś Autorka właściwie stosuje przypisy literaturowe w tekście oraz przy podpisach rysunków. Zabrakło mi jedynie opisu metod *in silico*, które są obecnie najszybciej rozwijającą się dziedziną badań kosmetyków.

Kolejne części omawianej pracy to opis metodyki pracy, w szczególności opis badań związanych z przygotowaniem modelowego naskórka do badań przenikania peptydów przez skórę oraz wyniki przeprowadzonych badań. W tych rozdziałach dysertacji Pani mgr Beata

Łupkowska przedstawiła dokładne warunki syntezy oligopeptydów, preparatyki hydrożeli oraz opis stosowanych metod badawczych. Według mnie podział na „część doświadczalną” i „badania własne” przed zestawieniem wyników i ich dyskusją sugeruje brak własnego udziału w pierwszej ww. części, co nie miało miejsca. Doktorantka w oparciu o dane literaturowe zaproponowała do badań 27 nowych oligopeptydów o sekwencji i składzie aminokwasów występujących w strukturze białka α -kolagenu i elastyny skóry ludzkiej, czy fragmentu prokolagenu. Bardzo trafnie zastosowała podobny system opisu charakterystyki dla każdej grupy badanych oligopeptydów. W tejże części zaprezentowała ponad 20 widm mas co doprowadziło do określenia sumarycznej masy cząsteczkowej, jednak nie podano czy przesłędzono proces fragmentacji jonu molekularnego i odtworzono na tej podstawie sekwencji aminokwasów (Peptide Mass Fingerprinting). Zabrakło mi także chociażby jednej metody określenia struktury (np. dwuwymiarowej spektroskopii NMR).

W ramach najbardziej objętościowej części pracy – omówienia działania zsyntetyzowanych oligopeptydów na skórę – Pani mgr Beata Łubkowska w szczególności podjęła się:

- opracowania receptur hydrożeli kosmetycznych, w tym preparatykę hydrożeli z oligopeptydami;
- porównania badania kosmetyków z wykorzystaniem tkanki pochodzenia wieprzowego *e mortuo* i syntetycznych membran stosowanych do badań;
- badania właściwości użytkowych otrzymanych produktów kosmetycznych przy użyciu aparatów kosmetycznych (Skintest plus oraz PSI wraz z systemem Aphrodite-1);
- badania przenikalności oligopeptydów przez z zastosowaniem komory typu Franz.

Ciekawym elementem wieńczącym taki cykl badań byłoby określenie biodostępności oligopeptydów w skórze otrzymanej z tkanki pochodzenia wieprzowego *e mortuo*, np. z użyciem metody z wykorzystaniem pasków adhezyjnych („strippingu”).

W kontekście omówionych wyżej badań chciałabym podkreślić, że recenzowana praca traktuje nie tylko o skutecznym wprowadzaniu oligopeptydów do matryc kosmetycznych, ale

także, na bazie wyników w tym głównym nurcie badań, stanowi pogłębione studium w zakresie aplikacji nowych form kosmetycznych. Badania Autorki, w których przeprowadziła testy aplikacyjne na przygotowanych uprzednio fragmentach naskórka pochodzenia z gatunku świni domowej stanowi wartość dodaną do wiedzy na temat warunków stosowania kosmetyków.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej Pani mgr Beaty Łubkowskiej zaliczam:

1. Wykazanie różnic parametrów skóry w zależności od czasu pomiaru i określenie optymalnego czasu w przypadku badań aplikacyjnych na naskórku pozyskanym bezpośrednio z gatunku świni domowej (*Sus scrofa f. domestica*) – 210 minut;
2. Potwierdzenie doskonałych właściwości nawilżające hydrożeli o znaczeniu komercyjnym (zawierającego oligopeptyd o sekwencji: Lys–Thr–Thr–Lys–Ser);
3. Wykazanie wysokiego stopień nawodnienia skóry dla kilku oligopeptydów (sekwencje aminokwasów: Palm–Gly–Gly–His–Lys, Palm–Gly–Gly–Gln–Pro–Arg, Ac–Lys–Val–Lys, Gly–Pro–Ala–Glu; Thr–Thr–Lys–Ser; Glu–Thr–Thr–Lys–Ala);
4. Potwierdzenie uwalnianie oligopeptydów z hydrożeli do płynów akceptorowych z wykorzystaniem technik, takich jak: HPLC oraz MALDI–TOF MS;
5. Stwierdzenie, że konstrukt skóry pochodzący od świni był bierny chemicznie względem badanego kosmetyku oraz płynu akceptorowego. Użycie błon utworzonych z polimerów naturalnych, takich jak pochodne celulozy, zapewniło nieograniczone uwalnianie wybranego oligopeptydu.

Obowiązkiem recenzenta jest wskazanie pewnych niedokładności, błędnych sformułowań, kolokwializmów oraz przede wszystkim ocena merytoryczna, która ma wskazać pewne niejasności czy sugestie. Generalnie praca jest napisana poprawnie językowo, stylistycznie, wyróżnia się ponadto bogatą i niezwykle estetyczną szatą graficzną i nie zawiera większych błędów merytorycznych (stwierdziłam np. brak zgodności pomiędzy danymi zawartymi w Tab. 35 i na wykresie 22 (str. 146)). Do tej części pracy mam tylko kilka uwag i pytań, które stawiam w celu doprecyzowania pewnych fragmentów:

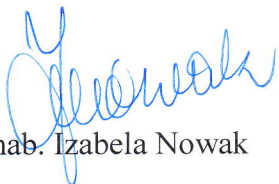
1. Zwyczajowo podczas redagowania prac doktorskich, monografii czy publikacji naukowych stosuje się formę bezosobową.
2. W pracy brakuje odnośników literaturowych do wcześniej opublikowanych badań. I tak na przykład Autorka na str. 131 pisze, że: „Połączenie peptydu o właściwościach hydrofilowych z palmitolem o właściwościach hydrofobowych, pozwoliło na

otrzymanie struktury o charakterze amfifilowym. Takie cząsteczki są postrzegane jako najłatwiej penetrujące barierę rogową naskórka, co też wykazałam w niniejszych badaniach”.

3. Autorka nie przedstawiła informacji na temat sposobu wyboru określonej grupy hydrożeli (I-III) do wybranych oligopeptydów, np. większość tetrapeptydów bez grupy palmitoilowej wprowadzono do hydrożeli typu I i II, a nie III.
4. Zabrakło mi podsumowania wszystkich wyników dla badania stopnia nawilżenia skóry pochodzącej od świni domowej w postaci jednej tabeli – ułatwiłoby to łatwiejsze zapoznanie się z wynikami badań. W szczególności także brakuje dyskusji na temat wpływu sekwencji aminokwasów na stopień nawilżenia. Wybrano bowiem aminokwasy występujące w strukturze białka α -kolagenu i elastyny skóry ludzkiej, czy prokolagenu (sekwencja (x-Thr-Thr-Lys-y)_n) a zatem pokuszenie się o taką zależność byłoby wskazane.
5. Ciekawe byłoby zastosowanie „modelowego” konstruktury – skóry pochodzenia zwierzęcego – zamiast z celulozy do badań uwalniania oligopeptydów. Warto także byłoby pokusić się o określenie kinetyki uwalniania z różnych form hydrożeli (I-III), a tym samym o wskazanie najodpowiedniejszej formułacji kosmetycznej dla wybranej grupy oligopeptydów. Właściwsze byłoby zastosowanie we wszystkich badaniach przenikania transdermalnego rekomendowanej temperatury wg Farmakopei, tj. $37 \pm 0,5$ °C.
6. Warto byłoby przeprowadzić testy stabilności formułacji kosmetycznych z oligopeptydami (zwłaszcza stabilności oligopeptydów), co stanowi podstawę do dalszego ich zastosowania w przemyśle.
7. Autorka pracy nie skonfrontowała jednoznacznie swoich rezultatów z obecnie stosowanymi rozwiązaniami technologicznymi w zakresie modeli skóry. Warto byłoby porównać konstrukt skóry zwierzęcej z innymi stosowanymi modelami.

Podsumowując, cel pracy został osiągnięty, praca posiada elementy nowości naukowej, a Autorka wykazała, iż jest dobrym eksperymentatorem i potrafi interpretować otrzymane wyniki w sposób właściwy.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Beaty Łubkowskiej zgodnie z rozporządzeniem MENiS z dnia 15 stycznia 2004 (Dz. U. z 2004 r., nr 15 poz.128 z późniejszymi zmianami) oraz art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 pozycja 595 z późniejszymi zmianami) w pełni odpowiada wymogom określonym przez wyżej wymienione ustawy. Recenzowana rozprawa reprezentuje bardzo dobry poziom naukowy, zawiera elementy nowości naukowej, a wymienione powyżej uwagi polemiczne i pytania nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny recenzowanej pracy. Doktorantka uzyskała szereg ciekawych rezultatów, które powinny zostać szerzej opublikowane. Napisana przez Panią Łubkowską rozprawa świadczy, że posiada wiedzę i umiejętności, którymi powinien charakteryzować się doktor. Wobec powyższego wnioskuję o przyjęcie pracy i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Izabela Nowak