Prof. dr hab. inż. Stanisław LOCHYŃSKI
Zakład Chemii Bioorganicznej,
Wydział Chemiczny
Politechniki Wrocławskiej
W. Wyspiańskiego 27, 50-370 WROCŁAW
tel.(071)-320-24-00
stanislaw.lochynski@pwr.edu.pl

Wrocław, 25.03.2015 r.

Politechnika Wrocławska

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Beaty Łubkowskiej

„Peptydy w kosmetyce – projektowanie sekwencji, synteza oraz badanie właściwości w produktach kosmetycznych"

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska autorstwa Pani mgr Beaty Łubkowskiej poświęcona jest projektowaniu i syntezie oligopeptydów oraz zbadania ich właściwości w formulacjach kosmetycznych. Rozwój nowoczesnej kosmetologii sprawił, że zaczęto stosować w technologiach wytwarzania nowych preparatów kosmetycznych wiele związków biologicznie aktywnych, a do nich zaliczają się peptydy, pełniące istotne funkcje jako składniki kosmetyków m. in. w komunikacji międzykomórkowej, układzie nerwowym czy procesach immunologicznych.

Badania tego typu prowadzone w Pracowni Chemii Makromolekuł Biologicznych, Katedry Biotechnologii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Prof. Zbigniewa Maćkiewicza dobrze wpisują się w nowatorski nurt badań interdyscyplinarnych, obejmujących poszukiwania na szeroką skalę nowych związków o właściwościach nawilżających przeznaczonych do zastosowania w produktach kosmetycznych..

Pani mgr Beata Łubkowska postawił sobie za cel zaprojektowanie, syntezę chemiczną oraz oczyszczenie i ocenę właściwości fizykochemicznych otrzymanych oligopeptydów. Cel jej badań obejmował również opracowanie receptur hydrożeli kosmetycznych z oligopeptydami oraz zastosowania tych preparatów w nowatorskiej koncepcji badań kosmetycznych wykorzystujących tkankę pochodzenia wieprzowego *e mortuo*.

Licząca sto dziewięćdziesiąt sześć stron dysertacja podzielona jest na cztery główne części: przegląd literaturowy, część doświadczalną, badania własne oraz wyniki i dyskusja otrzymanych rezultatów.

W części teoretycznej Autorka po wprowadzeniu opisała budowę, właściwości i funkcje skóry, jej procesy starzenia, mechanizmy przenikania i wchłaniania oraz ochronę i pielęgnację skóry.

Następnie przedstawiła w sposób bardzo interesujący i zwięzły normalizacje prawne obowiązujące w kosmetologii, opisując preparaty przeznaczone do stosowania na skórę takie

DZIEKANAT
Wydziału Chemii UG
Wpłynęło dn. 31.03.2015
L.dz. 8010-WCH/KC-505/15

jak klasyczne kosmetyki, kosmeceutyki i leki. Interesujący jest również fragment tej części rozprawy poświęcony metodom badań kosmetyków zarówno w testach *in vitro, ex vivo* i *in vivo.*

Część pierwszą zamykają doniesienia literaturowe dotyczące roli peptydów w kosmetologii, gdzie Autorka omawia peptydy sygnałowe, inhibitory enzymów, rozkurczające i nośnikowe, tak niezmiernie ważne dla transportu aktywnych substancji w głąb skóry.

Podsumowując tę część pracy, popartą liczbą 181 cytowań (wszystkich cytowań w rozprawie jest 203) uważam, że charakteryzuje się ona trafnym doborem przykładów i dobrze wprowadza czytelnika w tematykę realizowanych przez Doktorantkę badań.

Na kolejnych stronach w rozdziale IV. „Część doświadczalna" Pani mgr Beata Łubkowska przedstawiła swoje własne dokonania w realizacji postawionego celu. Ten fragment dysertacji zawiera projektowanie sekwencji oligopeptydów. Po wnikliwej analizie doniesień literaturowych Doktorantka zaplanowała otrzymać łącznie 30 sekwencji oligopeptydów z czego 27 były połączeniami nieopisanymi w literaturze. Jest to wyraźny element nowości w recenzowanej dysertacji. Następnie Autorka szczegółowo opisała ich syntezę, odszczepienie od nośnika oraz oczyszczenie i oznaczenie mas cząsteczkowych metodą MALDI-TOF MS. W tej części jest również szczegółowo opisane opracowanie receptury oraz preparatyka hydrożeli, którą wykonała w Pracowni Chemii i Analityki Kosmetycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego przy współpracy z Panią dr hab. Beatą Grobelną. Stanowiły one formulacje kontrolne. W składzie pierwszej receptury umieściła tylko składniki, które są niezbędne do powstania hydrożelu. W drugiej do składników bazowych dodała cytrynowego olejku eterycznego, który wykazuje właściwości antybakteryjne a w kosmetyce pełni rolę promotora sorpcji. Trzeci hydrożel wzbogacony został o aktywne składniki nawilżające, higroskopijne, łagodzące podrażnienia i regenerujące skórę.

Opisywane w tej części dysertacji badania charakteryzują się głęboko przemyślaną strategią postępowania, eliminującą wszystkie elementy procedur wpływające na negatywne wyniki założonego celu. W tym miejscu pragnę podkreślić, że Doktorantka wykazał się dużą wiedzą z zakresu prowadzenie niezbyt łatwych syntez chemicznych oligopeptydów, ale również umiejętnościami pozwalającymi wykonać jego zaplanowane reakcje w sposób, który pozwala na jednoznaczną interpretację uzyskanych wyników. Należy wyróżnić tutaj ogrom pracy syntetycznej a w szczególności żmudną procedurę izolowania czystych produktów z mieszanin poreakcyjnych.

W rozdziale V „Badania własne" Doktorantka opisuje przygotowania „modelowego" naskórka do badań kosmetycznych. Materiałem biologicznym była skóra wieprzowa *e mortuo* pozyskana z gatunku świni domowej (*Sus scrofta f. domestica*). Wyodrębnione fragmenty

skóry pochodziły z części środkowej brzucha i kończyn dolnych. Dobór materiału biologicznego do badań kosmetycznych imitujących skórę człowieka jest niezmiernie ważny ponieważ pod względem budowy i fizjologii musi spełniać wszystkie kryteria podobieństwa do skóry ludzkiej. Ten warunek w prezentowanych badaniach został spełniony. Następnie Autorka wyodrębniła naskórek ze skóry świńskiej wraz z warstwą rogową zbudowaną z korneocytów. Po odpowiednim spreparowaniu fragmenty naskórka były poddawane analizie diagnostycznej. Przy zastosowaniu specjalistycznych przyrządów kosmetycznych Doktorantka wykonała pomiary charakterystycznych parametrów takich jak sebum, nawilżenie, stopień keratynizacji, stopień uwodnienia, pH, wielkość porów oraz wielkość i szerokość zmarszczek, opisując szczegółowo ich procedury. Tę część dysertacji Doktorantka zamyka opisem badań aplikacyjnych hydrożeli referencyjnych i z oligopeptydami. Obejmują one pomiary parametru nawodnienia modelowego naskórka w ustalonych odstępach czasowych oraz przenikalności oligopeptydów z użyciem komór typu Franz'a. Uwolnione z hydrożeli składniki czynne Doktorantka oznaczała metodą MALDI-TOF MS oraz HPLC.

Rozprawę doktorską zamyka dość obszerny bo liczący 86 stron rozdział VI „Wyniki i dyskusja", ale nie ma się co dziwić, skoro Pani mgr Beata Łubkowska wyniki swoich badań przedstawiła podsumowaniem przebiegu syntez i właściwości fizykochemicznych 8 palmitoilowanych oligopeptydów, 2 tripeptydów, 13 tetrapeptydów, 5 pentapeptydów i 2 heksapeptydów, co daje łączną liczbę 30 połączeń peptydowych z których 27 stanowią nowe pochodne dotychczas nieopisane w literaturze.

Jestem pod dużym wrażeniem interpretacji wyników spektroskopowych MS, pozwalających na precyzyjne identyfikowanie poszczególnych produktów otrzymywanych we wcześniej zaplanowanych sekwensach reakcji prowadzących do założonego celu. Zamieszczone w dysertacji chromatogramy HPLC oraz ich doskonała interpretacja w sposób jednoznaczny potwierdzają struktury otrzymanych związków. Wspaniale zaprezentowane wyniki przedstawiające charakterystykę fizykochemiczną wszystkich zaprojektowanych i otrzymanych oligopeptydów w tabeli 12 (s. 109) jednoznacznie wskazują na doskonałe przygotowanie i wiedzę Doktorantki do prowadzenia tego typu badań.

Ale to tylko połowa dokonań Autorki. Kolejne osiągnięcia są również imponujące. Recenzent doliczył się 31 przygotowanych do badań hydrożelowych formulacji kosmetycznych z syntetyzowanymi przez Doktorantkę oligopeptydami jako składnikami aktywnymi. Receptury te zostały przygotowane w trzech typach hydrożeli referencyjnych (tab. 13, s. 113). Najpierw zostały przeprowadzone badania stopnia uwodnienia naskórka pochodzenia wieprzowego *e mortuo* bez stosowania preparatów kosmetycznych. Okazało się, że po upływie 4 godz. Zawartość wody w naskórku była bliska zeru. Po wykonaniu badań na hydrożelach referencyjnych przeprowadzono pomiary po aplikacji preparatów kosmetycznych.

Doktorantka w tym fragmencie rozprawy prezentuje bardzo logiczną i przemyślaną metodologię badań stopnia uwadniania skóry w różnych odstępach czasowych, nie przekraczających 120 min. stosując pomiary do momentu uzyskania wartości stopnia uwodnienia takiego jak przed aplikacją masek. Wyniki przedstawione są w sposób bardzo przejrzysty w tabelach (tab.15-45) i towarzyszących im wykresach (wykres 2-32).

Ponadto Doktorantka w swoich badaniach oceniła możliwość uwalniania się wybranych oligopeptydów z formulacji hydrożelowych. Badaniom poddane zostało 6 sekwencji oligopeptydów (tab. 47). Analizę prowadzono w czasie 6, 12 do 24 godz. co dwie godziny, techniką MS i HPLC. Zastanawia fakt dlaczego badania hydrożeli z oligopeptydami o numerach 1-3 przeprowadzono w temp. 22^0C a następne 4-6 w temp. 37^0C? Wyniki przedstawione na rys. 45-62 są interesujące. Poznanie procesów przenikania oligopeptydów przez warstwę rogową naskórka jest niezwykle istotne w projektowaniu nowych kosmetyków. Tym bardziej, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki charakteryzowały się odtwarzalnością i powtarzalnością.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została zredagowana w sposób czytelny, w formie opracowania o klarownej szacie edytorskiej. Bardzo nieliczne uwagi o charakterze redakcyjno-edytorskim, które nasunęły mi się w trakcie jej lektury wymieniam poniżej, wypełniając obowiązki recenzenta. Proszę nie odnosić się podczas publicznej obrony do tych drobnych uwag, jedynie proszę ustosunkować się do pkt *b)*.

a) Częstym błędem gramatycznym jest stosowanie w tekście zamiennie frazy „za pomocą" i „przy pomocy". Powinno się używać tego sformułowania w kontekście „za pomocą czego", „przy pomocy kogo" (s. 11, 87, 89, 89, 114, 118)

b) Czy skóra jest organem, narządem a może tylko częścią ciała organizmów żywych? Proszę o wyjaśnienie. (s. 10, 12)

c) Czy polipeptydy są „cięte" przez nieswoiste enzymy proteolityczne (żargon), a może hydrolizowane? (s. 20)

d) Stosowanie słowa „ilość" dla rzeczowników policzalnych zamiast „liczba" jest błędem (s. 26, 27, 66)

e) Nieprawidłowa pisownia nazw łacińskich (s. 57).

f) „Pomiędzy czy po między"? (s. 90, 90)

Wspomniane powyżej nieścisłości o charakterze redakcyjno-edytorskie świadczą jedynie o dokładnym zapoznaniu się recenzenta z treścią doktoratu i nie mogą w najmniejszym stopniu wpłynąć na pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej.

Obiektywną miarą naukową wartości dysertacji przedstawionej przez Panią mgr Beatę Łubkowską jest to, że zawarte w niej wyniki zostały częściowo opublikowane w jednym czasopiśmie z listy filadelfijskiej, czterech czasopismach recenzowanych z listy MNiSzW. Doktorankta opublikowała również trzy artykuły jako rozdziały w książkach akademickich

oraz cztery w recenzowanych materiałach konferencyjnych. Swoje osiągnięcia prezentowała na 3 międzynarodowych i 30 krajowych konferencjach naukowych. Uzyskała dwa uczelniane granty badawcze, nagrodę Prezesa Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej i cztery stypendia podczas odbywania studiów doktoranckich.

Podsumowując mogę stwierdzić, że Autorka recenzowanej przez mnie dysertacji jest wszechstronnie wykształconym chemikiem, zdolnym do rozwiązywania trudnych zadań syntetycznych jak i prowadzenia testów kosmetologicznych przy wykorzystaniu dostępnych technik spektralno-analitycznych. Jestem w pełni przekonany, że recenzowana praca doktorska spełnia wszelkie wymagania stawiane tego typu rozprawom przez Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 roku. Pozwala mi to wystąpić z pełnym przekonaniem z wnioskiem do wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Beaty Łubkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z pełnym przekonaniem wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy stosowną nagrodą.

St. Lochyński