



Opole 20 listopada 2018

dr hab. Jacek Lipok, prof. UO

## OCENA

Pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Zielińskiej

pt. „Synteza i charakterystyka stałych nanocząstek oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych przeznaczonych do celów kosmetycznych i farmaceutycznych”,

wykonanej w Pracowni Chemii Stosowanej Wydziału Chemii

Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,

pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Izabeli Nowak – promotora oraz

Pani dr Agnieszki Feliczak-Guzik – promotora pomocniczego

Działania związane z wytwarzaniem nowoczesnych kosmetyków o dobrze zdefiniowanej, stabilnej kompozycji chemicznej i wykazujących określony zakres aktywności biologicznej, a przy tym w pełni bezpiecznych dla osób stosujących te specyfiki, stanowią ciekawy obszar interdyscyplinarnych badań, w którym przenikają się metodologie nauk chemicznych i farmaceutycznych.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja Pani mgr Aleksandry Zielińskiej, dobrze wpisuje się we wspomniany nurt zagadnień badawczych, ponieważ celem działań Autorki było opracowanie powtarzalnych procedur otrzymywania stałych nanocząstek lipidowych (ang. *Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych (ang. *Nanostructured Lipid Carriers*, NLC), inkorporowanych wybranymi składnikami aktywnymi, posiadającymi szczególne znaczenie w przemyśle kosmetycznym oraz farmaceutycznym. Wspomniane składniki aktywne wybrano m.in. ze względu na szeroki zakres aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwwirusowej oraz przeciwutleniającej. Warto zwrócić uwagę, że wśród wybranych, enkapsulowanych substancji znalazły się monoterepeny, stosowane od wieków jako naturalne antyseptyki. Drugą grupę substancji inkorporowanych do nanostruktur lipidowych stanowiły naturalne, lipofilowe modulatory aktywności metabolicznej komórek, wykazujące aktywność przeciwutleniającą. Stosując również naturalne tłuszczoce do tworzenia SLN i NLC, Autorka proponuje spójną koncepcję formowania jakościowo nowych struktur, posiadających korzystne cechy tworzących je substancji. Imponujący zestaw zadań badawczych obejmujących cele wskazane przez Panią Aleksandrę, jednoznacznie wspiera tę tezę.

Niezwykle obszerny opis dociekań zajmuje dwieście osiemdziesiąt siedem (287) numerowanych stron, włączając w tę liczbę także wykaz dorobku naukowego Doktorantki, załączniki i wykaz cytowanej literatury. Z kolei dane, które Autorka zdecydowała się zestawić, zaprezentowano w siedemdziesięciu czterech (74) tabelach, a tekst pracy wzbogaca niebagatelna liczba dziewięćdziesięciu sześciu (96) rysunków. Dodatkowe dane zamieszczone w dwudziestu trzech (23) załącznikach, dopełniają zestaw podanych informacji, potwierdzając obszerność materiału badawczego opracowanego przez Panią mgr Aleksandrę Zielińską, w formie niniejszej dysertacji. Proporcje poszczególnych działów i układ ocenianej rozprawy, w pełni odzwierciedlają eksperymentalny charakter toku badań przeprowadzonych przez Doktorantkę.

Lektura „Wstępu” pozwala na zorientowanie się, jaki zakres prac badawczych został podjęty, a kolejne podrozdziały „Części teoretycznej” zawierają zestawy informacji odpowiednio dobranych do zagadnień związanych z istotą badań. Zawartość merytoryczna tego rozdziału wskazuje, że Autorka dysponuje aktualną wiedzą i bardzo dobrze orientuje się w problematyce swoich badań. Drobnym dyskomfortem w podążaniu za głównym nurtem wywodu Autorki spowodowany jest, moim zdaniem, nadmiernym rozdrobnieniem części zagadnień prezentowanych np. w podrozdziale 2.6.8 zawierającym niewiele istotnych danych, lub w przypadku podrozdziału 2.6.3 zawierającym zbyt skondensowany fragment wywodu, dotyczący bardzo ogólnych zasad analizy statystycznej. Sądzę także, że zagadnienia ujęte w podrozdziałach 2.6.1; 2.6.2 i 2.6.3 zyskałyby w pełni należne im znaczenie, gdyby były omówione w części metodologicznej niniejszej rozprawy, gdzie mogłyby być odniesione bezpośrednio do konkretnych eksperymentów i procedur badawczych. Rozumiem jednak, że stworzenie spójnego opisu zagadnień teoretycznych obejmujących interdyscyplinarne studia, które stały się udziałem Pani mgr Aleksandry Zielińskiej, nie jest łatwym zadaniem, szczególnie w przypadku pracy o zdecydowanie eksperymentalnym charakterze. Na taki właśnie charakter ocenianej dysertacji wskazuje skrupulatnie przygotowany i obszerny, ze względu na mnogość stosowanych metod i technik oznaczeń, rozdział poświęcony metodyce badań. W mojej opinii, opis kilku spośród stosowanych przez Autorkę procedur, wymaga większej uwagi, dlatego proszę o wyjaśnienie podanych niżej kwestii.

1. W tabeli 15 (str. 68) Doktorantka przedstawia schemat układu eksperymentalnego, który zgodnie z przywoływanymi przez nią zasadami *Experimental Factorial Design (EFD)* wskazuje, że tak skonstruowany eksperyment jest projektem czynnikowym  $3^2$ , bowiem testowane są dwa czynniki niezależne (Imwitor® i Poloxamer®), a każdy z nich na trzech poziomach (trzy wartości stężeń wagowych). Należało zatem przeprowadzić dziewięć (9) wariantów doświadczeń, by w pełni wykorzystać walory tej metody statystycznej. Arbitralne uznanie stężeń; 4% Imwitoru® i 2,5% Poloxameru®, jako poziomu „neutralnego” – „0” i dopasowanie nieco „na siłę” tego projektu do ram  $2^2$ , mogło doprowadzić do nadreprezentacji udziału próbek: SLN5, SLN6 i SLN7, w stosownych zbiorach wyników, które następnie poddawano analizie statystycznej (ANOVA). Będę wdzięczny za przedyskutowanie tej kwestii.

2. Lotność wybranych monoterpenu powoduje, że w temperaturze stopionego lipidu substancje te łatwo ulatniają się z matrycy, w której pozostaje jedynie część wprowadzonej nominalnie ilości. Nie znalazłem

informacji (być może przeoczyłem), czy mieszanie monoterpenów z Imwitorem® odbywało się w szczelnie zamkniętych naczyniach, a także czy oznaczono rzeczywistą zawartość monoterpenów w tzw. lipofazie.

3. str. 91, podrozdział 4.6.5 - Autorka nie podaje powodu dla którego zastosowała spektrofotometrię UV-VIS, jako inną, niż stosowana w kolejnych eksperymentach chromatografia gazowa (GC), metodę ilościowego oznaczenia monoterpenów uwalnianych w testach przeprowadzonych z wykorzystaniem komór dyfuzyjnych. Istnieje realna obawa, że szczególnie przy niższych długościach fali (bliższych 200 nm) znaczący wpływ na wynik pomiaru może mieć absorpcja samego buforu. Czy przeprowadzono walidację tej metody oznaczeń?

Niezależnie od wyrażonych wcześniej próśb o wyjaśnienie niektórych elementów procedur badawczych, z pełnym uznaniem odnoszę się do sposobu omówienia imponującego zbioru danych będących rezultatami szerokiej gamy przeprowadzonych eksperymentów. Zawartość tej części pracy w pełni dowodzi jej interdyscyplinarnego charakteru, gdyż poczynając od doboru lipidów i warunków procesu gwarantujących uzyskanie SLN oraz NLC, poprzez stworzenie nanostruktur inkorporowanych testowanymi substancjami naturalnymi, obszerną charakterystykę właściwości fizyko-chemicznych tych struktur, po wstępną ocenę efektów ich stosowania wobec linii komórek nowotworowych (wątek medyczny) oraz skóry probantów (wątek kosmetyczny), czytelnik zyskuje kompletny obraz przedmiotu badań Pani mgr Aleksandry Zielińskiej. Właśnie dzięki takiemu zestawieniu wyników, możliwe stało się wskazanie tak licznych korelacji pomiędzy typem, strukturą i trwałością nanonośników, a dynamiką uwalniania inkorporowanych substancji aktywnych, a zatem ich potencjalnym efektem terapeutycznym.

W tym kontekście chciałbym prosić o wyjaśnienie jakie czynniki zadecydowały o enkapsulacji  $\alpha$ -pinenu, cytralu, geraniolu i limonenu w SLN, a co sprawiło, że retinol, koenzym Q10 i  $\alpha$ -tokoferol enkapsulowano w NLC. Czy istnieją przesłanki takiego właśnie doboru: np. mniejsze molekuly w SLN, a większe, bardziej amfilowe, w NLC oraz, czy taki dobór był zamierzony? Kontynuując ten wątek chciałbym zapytać, czy Autorka brała pod uwagę możliwość stworzenia nanonośników lipidowych inkorporowanych równocześnie substancjami reprezentującymi obydwie testowane grupy związków? W takim przypadku substancje amfilowe wykazujące aktywność przeciwutleniającą mogłyby dodatkowo chronić monoterpeny, których obecność mogłaby indukować ciekawe efekty synergistyczne.

Analizując szczegółowo przedstawione wyniki znalazłem dane, które szczególnie mnie zainteresowały:

- Str. 104, Tab. 33; Str. 109, Tab. 37; Str. 118, Tab. 45; Co może być powodem tak znaczącej różnicy wartości Z-Ave oraz PDI próbek SLN? Czy wartości te włączono do testu statystycznego na takich samych zasadach jak pozostałe?

- Str. 128 Czy Autorka znajduje wytłumaczenie tak szybkiej agregacji SLN inkorporowanych geraniolemi w niskiej temperaturze, która raczej powinna sprzyjać trwałości tego typu układów dyspersyjnych?

Jednym z bardzo interesujących pomysłów, dodam z sukcesem zrealizowanym przez Panią Aleksandrę, było zastosowanie w pełni naturalnych lipidów – oleju z nasion rośliny o zwyczajowej nazwie angielskiej „Meadowfoam”, jako matrycy lipidowej. Dzięki temu Autorka uzyskała stabilne nanostruktury, złożone w pełni ze związków występujących w naturze. Sądzę, że ta część wyników już w prezentowanej formie jest bardzo

atrakcyjna z aplikacyjnego punktu widzenia. Podobną wartość, przede wszystkim dla technologii produkcji nanośników lipidowych, mają wyniki serii doświadczeń przeprowadzonych przez Doktorantkę, które wskazują, że homogenizacja wysokociśnieniowa (na gorąco) jest nie tylko najszybszą, ale i najbardziej efektywną metodą syntezy tych struktur.

Zdecydowana większość wyników, często bardzo szczegółowo sformułowanych, została wyeksponowana w rozdziale zatytułowanym podsumowanie i wnioski. Właśnie wspomniana „szczegółowość” umieszczonych tam informacji, w moim pojęciu nie przystaje do terminu „podsumowanie”. Tę absolutnie subiektywną ocenę łagodzi lektura „Streszczenia”, w którym Autorka precyzyjnie i bardzo rzetelnie przedstawiła istotne aspekty całego, bardzo obszernego toku badań.

Jak w każdej dysertacji, również i w pracy Pani mgr Aleksandry Zielińskiej znaleźć można błędy redakcyjne, najczęściej o charakterze: interpunkcyjnym, zastosowania odpowiedniego terminu lub formy gramatycznej, albo szyku zdania. Uważam jednak, że błędy te nie mają znaczenia dla przekazu istoty prezentowanych treści, wobec czego nie będę ich przytaczał. Chciałbym jednak zwrócić uwagę na kilka kwestii, ze względu na ich odniesienia merytoryczne:

- Str.14 Tab. 4 - Czy to możliwe żeby cząsteczki kwasu tłuszczowego, zapewne kwasu karboksylowego zawierały tylko jeden atom tlenu? Wzór ogólny jest raczej niepoprawny ...
- Str.15 Czy jest regułą w tym obszarze wiedzy, że mikroemulsje zawierają mniejsze cząsteczki zdyspergowane (10-100 nm) niż nanoemulsje (20 - 500nm) ?
- Str.38 „Z uwagi na hydrofilowy charakter cząsteczki, możliwa jest jedynie synteza SLN inkorporowanych retinolem [196, 197].” - Trudno zgodzić się, na podstawie przedstawionej struktury (Rys. 18) ze stwierdzeniem Autorki, o hydrofilowym charakterze cząsteczki.
- Str.47 Tab. 9 określenie "liczba powtórzeń" jest bardziej adekwatne ... Ponadto w klasycznym podejściu EFD wartości te oznaczają liczbę wariantów eksperymentu.
- Str.57 Tab.10 - w kolumnie 3 "Typ nanocząstek" umieszczono również informacje przypisane do kol. 2 "Funkcja". Czy ten zabieg ma służyć czemuś szczególnemu w tym zestawieniu ?
- Str.131 (nad rys. 61) - podana wartość dotyczy liczby obrotów w jednostce czasu, a nie przyspieszenia, które rzeczywiście byłoby lepszym wskaźnikiem przebiegu procesu.

Jest rzeczą oczywistą, że wymienione wyżej kwestie związane ze stroną redakcyjną bardzo obszernego tekstu ocenianej rozprawy, w żaden sposób nie przesłaniają wartości merytorycznej, tak toku badań, jak i niniejszego opracowania. Co więcej, chciałbym zwrócić uwagę na, moim zdaniem, istotną cechę tej dysertacji, która merytorycznie wyczerpuje część zaplanowanych zadań badawczych, a równocześnie zawiera informacje i fragmenty dyskusji inicjujące nowe tematy badań.

Podsumowując ocenę pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Zielińskiej mogę stwierdzić, iż opracowanie to zawiera oryginalny i aktualny tematycznie, niezwykle obszerny opis interdyscyplinarnych dociekań Autorki, poświęconych opracowaniu powtarzalnych procedur: enkapsulacji wybranych monoterpenu w stałych nanocząstkach lipidowych (SLN) oraz enkapsulacji znanych ze swej skuteczności, naturalnych,

lipofilowych substancji o właściwościach przeciwutleniających, w nanostrukturalnych nośnikach lipidowych (NLC). Warto również podkreślić wysiłki Doktorantki zmierzające do przeprowadzenia charakterystyki fizykochemicznej i określenia stabilności składu uzyskanych nanostruktur, a także do ustalenia zakresu i intensywności ich działania na wybrane układy biologiczne. Z uznaniem stwierdzam, iż racjonalnie zaprojektowany, wielowątkowy tok badań, imponujący nakład pracy i umiejętności Doktorantki, przyniosły bardzo pozytywne rezultaty, gdyż w oparciu o wnikliwą interpretację wyników, istotnie pogłębiającą stan wiedzy w zakresie problematyki badań, praca oferuje wiele, niemal gotowych rozwiązań aplikacyjnych.

Biorąc pod uwagę powyższą ocenę oraz wartość naukową wyników zaprezentowanych przez Panią mgr Aleksandrę Zielińską w dysertacji zatytułowanej „*Synteza i charakterystyka stałych nanocząstek oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych przeznaczonych do celów kosmetycznych i farmaceutycznych*” uważam, iż niniejsza rozprawa z nawiązką spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, wymienione w Ustawie o Tytule i Stopniach Naukowych z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, z dnia 26 września 2016. W mojej ocenie dysertacja ta spełnia również zwyczajowe wymagania stawiane bardzo dobrym rozprawom doktorskim. Dlatego też kieruję do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek, o dopuszczenie Autorki do kolejnych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Ponadto, uwzględniając wartość poznawczą i walory aplikacyjne niniejszej rozprawy, jak również odpowiadający im dorobek naukowy Pani mgr Aleksandry Zielińskiej, poddaję pod rozagę Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek, o wyróżnienie ocenianej dysertacji.

