

Prof. dr hab. Jerzy Silberring  
Katedra Biochemii i Neurobiologii  
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
Akademia Górniczo-Hutnicza

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Mgr Anny Olejnik  
pt. *"Oznaczanie niskocząsteczkowych peptydów w formulacjach kosmetycznych oraz badanie ich przenikania przez błony syntetyczne"*

Dysertacja przygotowana pod kierunkiem Pani Prof. Izabeli Nowak dotyczy opracowania szybkich i szczegółowych technik analizy peptydów w produktach kosmetycznych. Endogenne peptydy pełnią szere istotnych funkcji w organizmach żywych, począwszy od neuropeptydów działających na układ nerwowy i immunologiczny, poprzez hormony, do działania antybakteryjnego. Szczególnie interesujące zastosowania syntetycznych sekwencji zostały podjęte na bazie sekwencji zidentyfikowanych w niższych organizmach, jak np. ślimak morski, co było podstawą do opracowania dobrze działającego analgetyku (konotoksyna), czy wprowadzenie zikonotydu (Prialt) do terapii pacjentów zainfekowanych wirusem HIV, a także ciekawe wykorzystanie analogów peptydów do ochrony winnic przed szkodnikami.

Zastosowanie krótkich sekwencji w kosmetyce to bardzo ciekawy temat ostatniej dekady. Część tych opracowań ma charakter typowo marketingowy gdzie wprowadza się potencjalnych użytkowników w błąd lub są to sponsorowane, wycinkowe prace mające wykazać pozytywne działanie produktu. Przeważająca większość preparatów zawiera nieoczyszczony hydrolizat np. kazeiny lub innych, łatwo dostępnych białek. Znajdują się jednak dobrze udokumentowane prace wykazujące działanie tego typu peptydów m.in. w dermatologii. Tematyka podjęta

przez Doktorantkę, polegająca na wprowadzeniu rzetelnych technik analitycznych, jest więc ze wszech miar uzasadniona, zważywszy na sporą dowolność panującą na rynku kosmetyków. Dużą w tym zasługą Prof. I. Nowak, która podjęła trud stworzenia nowoczesnego laboratorium, zajmującego się naukową stroną problemów nowoczesnej kosmetyki.

Rozprawa ma klasyczny układ z Wstępem, Materiałami i Metodyką, połączonymi Wynikami i Dyskusją. Każdy fragment wyników opatrzony jest podsumowaniem co zapewnia przejrzystość opracowania. Mnogość i różnorodność stosowanych przez Panią Mgr Olejnik technik analitycznych, ilość eksperymentów oraz zakres posiadanej przez Nią wiedzy niezbędnej do interpretacji wyników, budzą mój szczerzy podziw. Z punktu widzenia neurobiologii bardzo ciekawa jest szczegółowa charakterystyka przechodzenia peptydów przez membrany w różnych warunkach eksperymentalnych. Uzyskane w tym zakresie wyniki mogą mieć potencjalne zastosowanie np. w mikrodializie, sprawiającej duże trudności techniczne w zakresie analizy neuropeptydów.

Obszerny spis piśmiennictwa (219 pozycji), doprowadzony do 2012r. świadczy o dogłębnej znajomości tematyki. Opieranie się na dość wątpliwych publikacjach (m.in Lupo z Lupo Center for Aesthetic and General Dermatology, a więc osoby bezpośrednio zainteresowanej podpieraniem swojej działalności komercyjnej badaniami naukowymi) nie jest tu najlepszym rozwiązaniem. Podobne zastrzeżenia można mieć wobec innego peptydu - argireliny, której działanie opublikowano w dwóch pracach, w tym pierwsza z nich sponsorowana jest przez Lipotec - producenta. Preparat firmy Sederma, która publikuje informacje na swojej stronie internetowej, również należałoby potraktować w kategoriach marketingowych a nie naukowych. Takie odnośniki literaturowe nie powinny znaleźć się w rozprawie doktorskiej a jeśli już zostały przytoczone, powinny być opatrzone odpowiednim komentarzem przez Doktorantkę (poz. 24, 25, 27, 39, 39, 41). Warto w takich przypadkach wykazać większą dozę krytycyzmu, niezależnie od faktu, że jest to przegląd literaturowy a nie dyskusja wyników.

Niezależnie od tych potknięć, mogę z czystym sumieniem stwierdzić, że projekt jest bardzo ciekawym wyzwaniem dla młodego naukowca i z pewnością ma charakter nowatorski. Zestawu aparatury i metodologii można jedynie pozazdrościć, co jest zasługą Promotor, Pani Prof. Izabeli Nowak. Przeprowadzenie eksperymentów jest rzetelne, natomiast samo zredagowanie dysertacji, a w szczególności fragmentów dotyczących zagadnień biochemicznych, mogło być nieco bardziej staranne. Ważniejsze nieścisłości zamieszczone zostały na odrębnej stronie, do ewentualnego wykorzystania w przyszłej pracy i nie wpływają na poziom merytoryczny całości pracy, która poświęcona jest przede wszystkim analityce a nie biochemii. Widoczną i najbardziej prawdopodobną przyczyną większości niedociągnięć był, jak zwykle, pośpiech. Doktorantka ma już przecież spory dorobek naukowy, a prace opublikowane w zagranicznych czasopismach (np. Biochemistry!!) dotyczą właśnie zagadnień biochemicznych.

Opracowanie szybkiej techniki detekcji peptydów bezpośrednio w preparatach kosmetycznych oraz wskazanie szeregu technik komplementarnych z pewnością zostanie zauważone i docenione przez laboratoria podejmujące tę tematykę. Chętnie też przedyskutuję z Doktorantką ewentualną celowość wprowadzenia szybkiej ekstrakcji peptydów celem zminimalizowania złożoności próbki i poprawy czułości oznaczeń.

Podsumowując, należy stwierdzić, że cele pracy zostały osiągnięte. Wypada jedynie żałować, że uzyskane wyniki opublikowane zostały w mało dostępnych czasopismach krajowych i w dodatku w większości w języku polskim.

Sugeruję także możliwość wyróżnienia dysertacji. Jest to praca nowatorska i kompleksowo ujmująca problematykę wszechstronnej analizy peptydów w produktach kosmetycznych. Co ważniejsze, opracowana przez Doktorantkę metodologia ma szerszy wymiar i może zostać zastosowana, po odpowiednich modyfikacjach, do analizy innych składników, nie tylko w kremach.

Równocześnie stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wszelkie wymogi zwyczajowe, stawiane pracom doktorskim. Spełnione są również formalne wymogi

Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003r. (Dz. U. z 2003 nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami Dz. U. z 2005r. nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2011r. nr 84, poz. 455) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani Mgr Anny Olejnik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
Jerzy Silberring

Kraków 26.07.2012

Dodatkowe uwagi i komentarze do rozprawy doktorskiej Pani Mgr Anny Olejnik  
(do wykorzystania w przyszłych pracach)

- str. 5. SNARE jako "receptor impulsów" - co to za funkcja?
- str. 6. czy białka i peptydy rzeczywiście definiowane są wg. liczby aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym? Dlaczego w takim razie hormony jak hGH, FSH, itp. są nazywane hormonami polipeptydowymi a nie białkami?
- str. 7. twierdzenie, że "*Treonina (Thr) jest niezbędna w procesie tworzenia kolagenu i elastyny*" nie jest ściśle. Wszystkie aminokwasy, wchodzące w skład tych białek są niezbędne i wyróżnianie Thr nie ma specjalnego uzasadnienia. Wymieniając już jakieś aminokwasy, wskazałbym raczej na reszty tworzące wiązania krzyżowe, niezbędne dla zachowania biologicznej funkcji tych białek.
- str. 9. określenie "*peptydy rozkurczające (inaczej zwane neuropeptydami)*" jest nieporozumieniem. Neuropeptydy mają już od dawna określone funkcje, które nie ograniczają się do roli substancji rozkurczających
- str. 9. Doktorantka miesza tu szereg pojęć: "*peptydomimetyki czyli peptydy sygnałowe...*". Peptydomimetyki to rodzaj peptydów ze zmodyfikowaną sekwencją, natomiast peptydy sygnałowe to sekwencje endogenne, stanowiące swoisty "adres" do ukierunkowanego transportu białka w komórce.
- str. 9. w jaki sposób peptydomimetyki miałyby być wbudowywane w organizmie żywym do struktur kolagenu i elastyny? Czy działa tu mechanizm odmienny od t.zw. Central Dogma, powszechnie przyjętego przez biochemików?
- str. 10. peptyd "sygnałowy" o sekwencji VGAVPG nie jest peptydem sygnałowym występującym w elastynie. Jest natomiast obecny w sekwencji tego białka (trzykrotne powtórzenie tego motywu).
- str. 11. co oznacza zwrot "*ekspresja elastyny*"?
- str. 16. enkefalina (która z enkefalin?) nie jest "*neuroprzebieżnikiem peptydowym*" tylko neuropeptydem pełniącym funkcję neuromodulatora

- str. 16. fraza "*Przyłączenie enkefaliny do receptorów znajdujących się poza neuronami...*" jest nieściśła. Gdzie, w takim razie, i w jaki sposób wiąże się enkefalina poza receptorami opioidowymi?
- str. 20. spektrometria mas nie jest metodą spektroskopową
- str. 21. analit poddaje się krystalizacji z matrycą na płytce a nie poza nią
- str. 39. Rys. 15 jest błędnie opisany. Część niepolarna oznaczona jest także jako polarna
- str. 40. lipidy mogą też przemieszczać się pomiędzy warstwami (ruchy flip-flop), co w ogóle umożliwia wprowadzanie nowych cząsteczek do warstwy zewnętrznej. Warto o tym zjawisku przynajmniej wspomnieć, skoro poruszony został efekt lateral movements.
- str. 53. ESI to nie jest "electron spray" lecz electrospray
- str. 73. określenie "*protonowany jon peptydu*" jest nieściśłe Z samej definicji jonu wynika, że proton został przyłączony (lub usunięty)
- str. 90. odnośnik do Tabeli 24 w tekście jest nieprawidłowy i wskazuje na Tab. 25.

