

Dr hab. n.med. prof. uczelni Elżbieta Rębas

Zakład Neurochemii Molekularnej

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Recenzja pracy doktorskiej

mgr Pauliny Agnieszki Machały

„Rola ekstraktów z surowców roślinnych z rodziny *Oleaceae* i *Rubiaceae* w ochronie komórek skóry przed promieniowaniem UVA”

Przedstawiona do recenzji rozprawa została wykonana w Katedrze Biochemii Ogólnej Instytutu Biochemii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Haliny Małgorzaty Żbikowskiej, prof. UŁ.

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania ekstraktów z pięciu surowców roślinnych: liści oliwki (OLE)(*Olea europaea*), kory jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior*), liści jesionu wyniosłego, kory jesionu koreańskiego (*Fraxinus rhynchophylla*) z rodziny oliwkowatych (*Oleaceae*) i z nasion kawy (GCBE)(*Coffea robusta*) z rodziny marzanowatych (*Rubiaceae*) w ochronie komórek skóry (fibroblastów) przed promieniowaniem UVA oraz zbadanie mechanizmu ich działania fotoochronnego. Badania wykonywano w warunkach in vitro przy użyciu linii komórkowej Hs68 oraz jednojądrzastych komórek krwi obwodowej. Od wielu lat stosuje się preparaty, głównie zewnętrznie na powierzchnię skóry, w celu jej ochrony przed szkodliwym działaniem promieniowania UVA i UVB. W związku ze zmieniającym się klimatem, ekspozycja skóry na naturalne promieniowanie słoneczne jest coraz dłuższa. Ale nie tylko słońce jest źródłem promieniowania UV, dochodzi także promieniowanie sztuczne np. z lamp UV w solariach lub urządzeń diagnostycznych. Umiarkowane dawki promieniowania UV są korzystne dla organizmu, umożliwiają np. syntezę witaminy D. Uważa się także, że lekka „opalenizna” nadaje skórze ładniejszy wygląd. Niestety, zbyt długotrwałe wystawianie się na promieniowanie UV prowadzi do wielu chorób skóry w tym nowotworów. W zależności od rodzaju promieniowania może to być rumień i oparzenia skóry, pojawiające się dość szybko po ekspozycji głównie na promieniowanie UVB oraz odczyny alergiczne powodowane przez

promieniowanie UVA. Odległymi w czasie skutkami nadmiernej ekspozycji na oba rodzaje promieniowania UV są uszkodzenia DNA, mutacje, stany zapalne prowadzące z czasem do przedwczesnego starzenia się skóry, zwiększonej pigmentacji oraz nowotworów skóry. Należy także pamiętać, że szkodliwe działanie promieniowania słonecznego będzie miało inny mechanizm w naskórku i skórze właściwej. Stosowane na skórę kosmetyki z mineralnymi lub chemicznymi (w tym syntetycznymi) filtry UV skutecznie chronią przed bezpośrednimi skutkami promieniowania (oparzenia, rumień), jednak w mniejszym stopniu zapobiegają uszkodzeniom DNA oraz generowaniem ROS (reaktywnych form tlenu) i stresem oksydacyjnym a często nie dają wystarczającej ochrony przeciwko promieniowaniu UVA. Dodatkowo syntetyczne filtry UV mogą powodować reakcje alergiczne i zaburzać działanie systemu hormonalnego u ludzi, a uwalniane do środowiska (np. podczas kąpieli) są szkodliwe dla innych organizmów, głównie ekosystemów wodnych. Doktorantka podjęła się zbadania czy w celu ochrony przed promieniowaniem UVA można wykorzystać substancje naturalne, pochodzące ze znanych i dostępnych roślin. Przewagą takich związków jest mniejsza toksyczność dla ludzi i środowiska, a nie bez znaczenia jest też kwestia ekonomiczna, surowce te są stosunkowo tanie i od lat wykorzystywane w suplementach diety jako związki o działaniu przeciwnowotworowym i antyoksydacyjnym. Podjęcie takiej pracy jest jak najbardziej uzasadnione i ważne ponieważ nowotwory skóry są jednymi z często diagnozowanych nowotworów, są trudne w leczeniu i profilaktyka wydaje się być najskuteczniejszą bronią w walce z nimi. Wyniki pracy Doktorantki mogą więc znaleźć w przyszłości praktyczne zastosowanie w medycynie lub kosmetologii.

Rozprawa doktorska jest monografią liczącą 163 strony i podzieloną klasycznie na Część teoretyczną/Wprowadzenie, Cel pracy, Metody, Wyniki, Dyskusję oraz Podsumowanie i Wnioski. Proporcje poszczególnych rozdziałów są prawidłowe. Na końcu rozprawy zamieszczono Streszczenia w języku polskim i angielskim, Bibliografię oraz Dorobek naukowy – spis publikacji oryginalnych oraz doniesień konferencyjnych, w których Doktorantka jest współautorem a także udział w kursach i szkoleniach. Na początku rozprawy zamieszczono spis treści oraz spis stosowanych skrótów.

W części teoretycznej Doktorantka wyczerpująco przedstawia dostępny w literaturze stan wiedzy związany z tematyką rozprawy doktorskiej. Część ta podzielona została na kilka podrozdziałów. W pierwszej części Doktorantka opisuje różnice pomiędzy wpływem na komórki

promieniowania UVA i UVB oraz opisuje mechanizm działania obu rodzajów promieniowania. W drugiej części Doktorantka opisuje mechanizmy fotostarzenia skóry ze szczególnym uwzględnieniem wpływu promieniowania UVA, opisane są uszkodzenia DNA, stres oksydacyjny, procesy zapalne, modyfikacje komórkowych szlaków sygnalizacyjnych, rola metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej. W trzeciej części Autorka przedstawia współczesne koncepcje ochrony przeciwsłonecznej, charakterystykę filtrów UV oraz naturalnych antyoksydantów stosowanych w produktach ochronnych i ich bezpieczeństwo. W części czwartej Doktorantka więcej miejsca poświęca na opisanie właściwości biologicznych i prozdrowotnych związków zawartych w ekstraktach z surowców pochodzących z wybranych roślin z rodziny *Oleaceae* i *Rubiaceae* oraz ich potencjalnego zastosowania w ochronie przed promieniowaniem UV. Cała część teoretyczna stanowi bardzo dobre wprowadzenie w tematykę pracy i świadczy o teoretycznym przygotowaniu Doktorantki do podjęcia prac doświadczalnych oraz o dobrej znajomości tematu. Część ta mogłaby stanowić bardzo dobrą bazę do napisania artykułu pogładowego. Zrozumienie tematu ułatwia 6 starannie wykonanych rycin. Jediną uwagą jaką mam do tej części jest dość częste używanie zbyt ogólnych sformułowań: różnorodne związki charakterystyczne dla poszczególnych grup (str. 37) – jakie, jakich; są różnymi estrami... (str. 40) – jakimi; inne polifenole (str.40) – jakie; itp. Na tym etapie pracy należałoby uściślić opis. Na stronie 38 błędnie zaliczono α -tokoferol do karotenoidów a na stronie 49 zwrot „działanie przeciwustrojowe” powinno chyba oznaczać przeciwdrobnoustrojowe.

Na kolejnych stronach rozprawy przedstawione zostały: uzasadnienie podjęcia badań i założenia i cel pracy. Uzasadnienie podjęcia badań jest bardzo dobrym pomysłem, niestety połowa tego rozdziału jest powtórzeniem informacji zawartych we wprowadzeniu. Istotną informacją jest to, że brak jest danych dotyczących potencjału fotoochronnego ekstraktów izolowanych z różnych organów i gatunków jesionów oraz, że nieliczne badania nad ochronną rolą ekstraktów z liści oliwki oraz nasion kawy dotyczą głównie tylko promieniowania UVB. Celem głównym pracy było udowodnienie, że wybrane do badań ekstrakty roślinne chronią ludzkie fibroblasty skóry (linia komórkowa Hs68) przed szkodliwymi skutkami promieniowania UVA dzięki ich właściwościom antyoksydacyjnym, antyapoptotycznym i przeciwzapalnym. Doktorantka opisała również cele szczegółowe pomagające wyciągnąć wnioski z otrzymanych wyników.

Kolejne rozdziały to Materiały i Metody. W sekcji Materiały Doktorantka dokładnie wymienia

badane ekstrakty, materiały biologiczne ze szczegółową charakterystyką linii komórkowej Hs68, odczynniki, w tym także komercyjne zestawy odczynników (zebrane w tabeli) oraz wykorzystaną aparaturę badawczą. Doktorantka użyła do doświadczeń linię komórkową Hs68 będącą jedną z serii linii ludzkich fibroblastów i był to wybór uzasadniony. Dodatkowo część doświadczeń przeprowadzona była z użyciem jednojądrzastych komórek krwi obwodowej. W rozdziale Metody szczegółowo opisano zasady metod oraz przebieg wszystkich doświadczeń.

Doktorantka wykazała się znajomością szeregu technik wykorzystywanych w biologii molekularnej m.in. techniki z zakresu hodowli komórkowych, testy immunoenzymatyczne, Western blotting, testy na żywotność komórek, cytometria przepływowa, spektrofotometria czy analiza zdolności antyoksydacyjnej, analiza uszkodzeń DNA (test kometowy). Sposób przeprowadzenia doświadczeń został opisany przez Doktorantkę bardzo dokładnie, krok po kroku. Doktorantka w doświadczeniach stosowała także komercyjne gotowe zestawy do oznaczeń, zostały one jednak prawidłowo dobrane i również szczegółowo zostało opisane wykonanie doświadczeń z ich użyciem. Rozdział zawiera 3 tabele. Różnorodność użytych metod wskazuje na bardzo dobre przygotowanie Doktorantki do pracy doświadczalnej. Warto wspomnieć, że Doktorantka doskonalila swoje umiejętności uczestnicząc w dwóch kursach praktycznych z podstaw techniki immunoenzymatycznej ELISA oraz z technik blottingu w diagnostyce autoimmunizacyjnych chorób układu pokarmowego oraz w 32 kursach teoretycznych.

Uzyskane wyniki przedstawiono przy użyciu 18 czytelnych, starannie wykonanych i chronologicznie i logicznie ułożonych rycin oraz 2 tabel. Przebieg doświadczenia oraz wyniki uzyskane we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Łodzi zostały zamieszczone na końcu pracy w postaci suplementu. Badania te dotyczyły oznaczania profilu fitochemicznego badanych ekstraktów roślinnych. W rozdziale Wyniki zaobserwowałam brak konsekwencji w stosowaniu (a może tylko w przedstawianiu wyników) związków referencyjnych, w niektórych eksperymentach są to trzy związki: kwas askorbinowy, kwercetyna, rutyna (ryc. 7 i 8 wykresy przedstawiające wyniki z zastosowaniem ekstraktów z jesionu – 3 związki referencyjne, ekstrakt z ziaren kawy – 1 związek referencyjny, ekstrakt z liści oliwki – dwa związki referencyjne ale już na ryc. 9 i 10 przy wynikach z użyciem ekstraktu z ziaren kawy są ujęte trzy związki referencyjne, kolejna rycina 11 – tylko jeden związek referencyjny dla wszystkich pięciu badanych ekstraktów itd.). Podobnie, nie jest wyjaśniona

rezygnacja z kilku stężeń ekstraktów stosowanych zwłaszcza w pierwszych doświadczeniach, początkowo był to zakres 2,5 – 25 µg/ml (pięć stężeń) dla GCBE i OLE, w późniejszych badaniach zakres 5 – 25 µg/ml (cztery stężenia)(ryc.9) , później znowu zakres od 2,5 µg/ml (ryc.10), następnie 5 – 25 µg/ml, od ryciny 12 pokazano wyniki z zastosowania dwóch stężeń 5 i 25 µg/ml przy czym na wykresie 12 i 13 przedstawiono dane z 4 ekstraktów a na ryc. 15 brak danych ze stosowania ekstraktu z liści oliwki ale pokazano 3 stężenia. Wyjaśnienie zastosowania konkanawaliny A pojawia się dopiero w rozdziale 9.7.2. podczas gdy użyto tego związku już we wcześniejszych eksperymentach.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka szerzej omawia uzyskane wyniki i porównuje je z najnowszymi doniesieniami dostępnymi w literaturze światowej. Dyskusję uzupełnia rycina przedstawiająca wpływ analizowanych ekstraktów roślinnych na główne szlaki sygnałowe zaangażowane w proces fotostarzenia zainicjowany ekspozycją na promieniowanie UVA choć niejasne jest zaznaczenie kolorem czerwonym finałowego etapu – nie wiadomo czy fotostarzenie jest zahamowane czy nasilone.

Po podsumowaniu otrzymanych wyników w kilku punktach (rozdział 11 Podsumowanie) Doktorantka wyciągnęła i zwięźle przedstawiła wnioski z wykonanych badań (rozdział 12 Wnioski).

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wnoszą nowe, istotne informacje na temat ochronnego działania ekstraktów otrzymywanych z nasion kawy, liści oliwki i kory jesionów przed szkodliwym wpływem promieniowania UVA. Bardzo ważne jest zidentyfikowanie przez Doktorantkę mechanizmów wewnątrzkomórkowych, dzięki którym badane ekstrakty wykazywały swoje właściwości protekcyjne.

Do najważniejszych osiągnięć zaliczyć można wykazanie, że wszystkie analizowane ekstrakty roślinne wykazują skuteczne działanie fotoochronne wobec fibroblastów skóry naświetlanych promieniowaniem UVA oraz że działanie to wynika przede wszystkim z właściwości antyoksydacyjnych i przez to zdolności do hamowania procesu starzenia i apoptozy oraz z właściwości przeciwzapalnych badanych ekstraktów. Udowodniono, że ekstrakty roślinne modulują wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne poprzez zmianę równowagi redox i przyczyniają się do hamowania kaskad, w które zaangażowane są białka p53, AP-1 oraz czynnik transkrypcyjny NFκB, a także powodują aktywację kaskady białka Klotho. Wyniki badań Doktorantki sugerują, że badane

ekstrakty mogą stanowić składnik kosmetyków przeciwsłonecznych zapewniając ochronę przeciw promieniowaniu UVA jednocześnie pozwalając na zmniejszenie zawartości syntetycznych filtrów w tych kosmetykach.

Używane w pracy skróty wyszczególnione zostały na początku pracy, podane zostało pełne rozwinięcie w języku angielskim oraz używana nazwa polska.

Umieszczony na końcu spis literatury obejmuje 204 pozycji z szerokiego okresu od roku 1968 do najnowszych publikacji z 2023 roku. Jednak większość prac cytowanych w rozprawie (58% pozycji literaturowych) to artykuły z ostatnich pięciu lat, opublikowane od roku 2018. Co ważne, najnowsze artykuły zostały wykorzystane w rozdziale Dyskusja, a więc Doktorantka porównuje swoje wyniki z jak najbardziej aktualnymi doniesieniami. Przy kilku pozycjach literaturowych brak np. numeru czasopisma i stron lub doi albo roku wydania, np. Pratiwi, L. Coffea: The Application of green Components in Cosmetics Formulation. *Majalah Obat Tradisional*, 26(3), 174-187 – brak roku publikacji. W jednym przypadku brak podstawowych danych publikacji: Santhra Krishnan, P., Salian, A., Dutta, S., & Mandal, S. A roadmap to UV-protective natural resources: classification, characteristics, and applications.

Autorka rozprawy jest współautorem artykułu oryginalnego opublikowanego w liczącym się czasopiśmie zagranicznym o zasięgu światowym ze współczynnikiem IF: 4,6 i punktami MEiN = 140. Uczestniczyła także w licznych krajowych konferencjach prezentując uzyskane wyniki zarówno w formie ustnej jak i plakatowej.

Manuskrypt przygotowany został starannie, bez błędów gramatycznych, ortograficznych i tzw. literówek i bez nadmiernego używania zapożyczeń z języka angielskiego. Czytanie utrudniają jedynie liczne błędy interpunkcyjne oraz częste powtórzenia treści.

Podsumowując, praca zawiera elementy nowości, doświadczenia i model badawczy są przemyślane i zaplanowane prawidłowo, a uzyskane wyniki wnoszą nową wiedzę na temat potencjalnego zastosowania ekstraktów otrzymywanych z nasion kawy, liści oliwki oraz liści i kory jesionów wyniosłego i koreańskiego w ochronie przed szkodliwym wpływem promieniowania UVA i stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Opisane drobne uchybienia nie mają wpływu na ogólną pozytywną ocenę pracy.

Przedstawiona do recenzji praca w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim i uzasadnia nadanie Pani mgr Paulinie Machale stopnia naukowego doktora. Zwracam się do Komisji do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Machały do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dn. 20 lipca 2018 r. z późniejszymi zmianami (Dz.U. z 20.07.2018 r. art. 187 ust. 1 -4).

dr hab. n.med. prof. uczelni Elżbieta Rębas

Łódź, 21 września 2023

Zakład Neurochemii Molekularnej
Katedry Biochemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Dr hab. n. med. prof. nadzw.
Elżbieta Rębas

