



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I FARMAKOGENOMIKI

dr hab. Monika Ewa Czerwińska
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Adres e-mail: monika.czerwinska@wum.edu.pl

Warszawa, 1.09.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Pauliny Agnieszki Machały

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

przedstawiona Komisji Uniwersytetu Łódzkiego

ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych

w dyscyplinie nauki biologiczne

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Machały została wykonana pod kierunkiem dr hab. Haliny Małgorzaty Żbikowskiej (prof. UŁ) w Katedrze Biochemii Ogólnej Instytutu Biochemii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Współcześnie skóra ludzka jest często narażona na działanie niekorzystnych czynników środowiskowych. Jednym z nich jest promieniowanie UV, które jest emitowane przez słońce jak również pochodzi ze sztucznych źródeł, takich jak lampy ultrafioletowe stosowane m.in. w solarjach. W obliczu wzrastającej zachorowalności na nowotwory skóry zalecane jest stosowanie kremów przeciwsłonecznych o określonych wskaźnikach przeciwsłonecznych SPF lub innych substancji o potencjalnym działaniu fotoprotekcyjnym. Ekspozycja na promieniowanie generuje produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) w keratynocytach i fibroblastach skóry. Jednak dzięki komórkowym mechanizmom obronnym, takim jak prewencyjne układy enzymatyczne czy nieenzymatyczne przeciwutleniacze interwencyjne, zostają one szybko usunięte. Jeśli mechanizmy obronne zawodzą, nadmiar RFT rozpoczyna kaskadę reakcji prowadzących do pogorszenia struktury i funkcji komórek, modyfikacje oksydacyjne białek, lipidów i DNA, a w konsekwencji następuje nieprawidłowa ekspresja genów. Niewątpliwie fotoprotekcja, zapobieganie nowotworom i opóźnianie procesów starzenia są wyzwaniem dla współczesnej dermatologii. W związku z tym rośnie zainteresowanie substancjami pochodzenia naturalnego, najczęściej w postaci przetworów roślinnych, które mogą być stosowane zewnętrznie lub wewnętrznie. Dzięki występującym w nich związkom o charakterze fenoli, które charakteryzują się znacznym potencjałem wychwytywania wolnych rodników, ich zastosowanie sprzyja ochronie skóry przed nadmiernym narażeniem na czynniki utleniające powstające pod



WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY
WUM

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.farmakogenomika.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 735
faks: +48 22 57 20 735
katedrabiochemii@wum.edu.pl

wpływem promieniowania UV. W związku z tym podjęta przez Panią mgr Paulinę Machałę tematyka jest bardzo aktualna i realizuje współczesne kierunki badań substancji pochodzenia naturalnego mające na celu ocenę ich aktywności biologicznej i możliwości zastosowania w terapii.

Obiektem badań Doktorantki stały się przetwory roślinne z liści oliwki europejskiej (*Olea europaea* L), kory i liści jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.) oraz kory jesionu koreańskiego (*Fraxinus rhynchophylla* Hance) należących do rodziny oliwkowatych (Oleaceae) oraz wyciąg z nasion kawy (*Coffea robusta* L. Linden) z rodziny marzanowatych (Rubiaceae). Doktorantka w postawionej hipotezie badawczej założyła, że ekstrakty roślinne chronią ludzkie fibroblasty skóry przed szkodliwymi skutkami promieniowania UVA poprzez aktywność antyoksydacyjną, antyapoptotyczną oraz przeciwzapalną. Hipoteza ta została poparta właściwym celem i konsekwentnie realizowanymi zadaniami badawczymi. Za cel pracy Doktorantka obrała bowiem określenie potencjału i mechanizmów fotoprotekcyjnych ekstraktów z liści oliwki oraz z nasion kawy stosowanych w suplementach diety, a także trzech ekstraktów z surowców zielarskich – kory i liści jesionu wyniosłego oraz kory jesionu koreańskiego – wobec fibroblastów skóry linii komórkowej Hs68 – w warunkach *in vitro*. Wiązało się to z realizacją celów szczegółowych, takich jak:

- 1) ocena cytotoksyczności badanych ekstraktów wobec komórek linii Hs68 i jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC),
- 2) ocena udziału ekstraktów roślinnych w ochronie fibroblastów przed stresem oksydacyjnym indukowanym promieniowaniem UVA poprzez pomiar żywotności komórek, poziomu uszkodzeń DNA, poziomu wewnątrzkomórkowych RFT w fibroblastach linii Hs68,
- 3) ocena działania przeciwzapalnego (IL-2 i $TNF\alpha$, MMP-1,-3 i -9, $NF\kappa B$) i przeciwutleniającego (FRAP, ABTS+, DPPH) wyciągów,
- 4) określenie wpływu ekstraktów na układ tioredoksyna/reduktaza tioredoksyny, proces apoptozy i starzenia komórkowego (p53, AP-1, kaspazy-8, -9 i -3, β -galaktozydaza, białko Klotho) w celu wskazania prawdopodobnych mechanizmów odpowiedzialnych za ich działanie antyoksydacyjne i fotoochronne.

Realizując powyższe zadania mgr Paulina Machała korzystała z szerokiego wachlarza metod badawczych z zakresu biologii molekularnej. Doktorantka wykorzystwała między innymi testy immunoenzymatyczne (MMP-1, -3 i -9, kaspazy-8, -9 i -3, β -galaktozydaza, reduktaza tioredoksyny, p53, AP-1 i $NF\kappa B$, białko Klotho), metody fluorescencyjne ($H_2DCF-DA$) oraz test kometowy stosowany w celu określenia uszkodzeń DNA. Żywotność komórek pod wpływem badanych ekstraktów czy promieniowania UV mgr Machała zbadała za pomocą testu CCK-8. W celu oceny potencjalnego działania antyapoptotycznego ekstraktów wobec fibroblastów poddanych działaniu promieniowania UVA zastosowała technikę cytometrii przepływowej barwiąc komórki roztworami aneksyny V i jodku propidyny. Za pomocą metody spektrofotometrycznej wyznaczyła wskaźnik ochrony przeciwsłonecznej dla badanych ekstraktów. W celach eksperymentalnych fibroblasty były traktowane promieniowaniem UVA o gęstości energii 8 J/cm². W związku z tym można zauważyć, że projekt doktorski mgr Pauliny Machały uwzględnia szereg złożonych etapów badawczych i reprezentuje wysoki poziom zróżnicowania warsztatu naukowego. Warto podkreślić, że Doktorantka podjęła się ambitnego zadania naukowego, ujęła je i rozwinęła w sposób wieloaspektowy. Dobór stosowanych metod badawczych nie budzi zastrzeżeń. W eksperymentach Doktorantka zastosowała kontrole pozytywne, takie jak kwas askorbinowy, kwercetyna czy indometacyna. Metodyka pracy została przedstawiona w sposób bardzo staranny i przejrzysty.



Wybrane do badania substancje roślinne znajdują zastosowanie w dietetyce i fitoterapii, dlatego podjęcie badań nad ich mechanizmem działania, zwłaszcza w kontekście wykorzystania ich jako produktów fotoprotekcyjnych w dermatologii jest uzasadnione. Są one źródłem cennych związków, głównie fenolowych. W nasionach kawy zidentyfikowano kwasy fenolowe i diterpeny, choć mogą one także dostarczać kofeinę z grupy alkaloidów purynowych. Z kolei głównymi składnikami liści oliwki europejskiej są glikozydy sekoirydoidowe, takie jak oleuropeina (glikozydowy ester kwasu elenolowego i hydroksytyrozolu), 11-demetylooleuropeina, ligstrozyd (glikozydowy ester kwasu elenolowego i tyrozolu), glikozydy flawonoidowe, głównie glikozydy kwercetyny, luteoliny oraz apigeniny, triterpeny, kwasy fenolowe oraz fenylopropanoidy. Wśród wolnych aglikonów sekoirydoidowych w przetworach z liści oliwki spotykane są oleaceina (dialdehydowa forma dekarboksymetylowego kwasu elenolowego związana z hydroksytyrozolem, 3,4-DHPEA-EDA) oraz oleokantal (dialdehydowa forma dekarboksymetylowego kwasu elenolowego związana z tyrozolem, 4-HPEA-EDA), przy czym formy te jako aglikony częściej występują we frakcji fenolowej oliwy. W rodzaju *Fraxinus* występują z kolei głównie kumaryny, sekoirydoidy i fenylopropanoidy. Obecność kumaryn, głównie eskuliny i fraksyny, jest cechą charakterystyczną, odróżniającą go od innych rodzajów należących do rodziny Oleaceae. W szczególności warto przy tym zwrócić uwagę na kumaryny, które znane są ze swych właściwości światłochronnych i chroniących przed promieniowaniem nadfioletowym i jonizującym – zwłaszcza eskulina. Z drugiej strony niektóre związki z tej grupy, takie jak ksantotoksyna, bergapten czy psoralen działają fotouczulająco. Z tego powodu wybór substancji roślinnej zawierającej kumaryny typu eskulina należy uznać za słuszny w kontekście poszukiwania mechanizmów działania fotoprotekcyjnego. Analiza fitochemiczna badanych ekstraktów została przeprowadzona we współpracy z Zakładem Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, gdzie również zostały przygotowane wyciągi z kory i liści jesionu wyniosłego oraz z kory jesionu koreańskiego. Wyniki szczegółowej analizy fitochemicznej zostały zamieszczone w rozdziale 13, który stanowił suplement do przedstawionej pracy. Wyniki badań przeprowadzonych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z matrycą diodową oraz spektrometrem mas z pułapką jonową (UHPLC-PDA-ESI-MS) potwierdziła obecność charakterystycznych grup związków w badanych wyciągach, które dotychczas opisano w literaturze. Na uwagę zasługuje również fakt, że dodatkowo została przeprowadzona wnikliwa analiza ilościowa składników ekstraktów. W wyciągu z liści oliwki oznaczono zawartość 3 związków, w ekstrakcie z nasion kawy – 7, a w wyciągach z kory i liści jesionu wyniosłego oraz kory jesionu koreańskiego – odpowiednio 18, 17 i 14 związków. Taka charakterystyka i standaryzacja materiału badawczego zapewnia jego jakość i stanowi dobrą podstawę do badań aktywności biologicznej. Szczegółowa dokumentacja w postaci chromatogramów i tabel została zamieszczona w Suplemencie.

Przedstawiona mi do oceny praca stanowi monografię w postaci publikacji książkowej, liczącej 163 strony, w układzie typowym dla prac doktorskich. W części teoretycznej, obejmującej 4 rozdziały, mgr Machała w sposób przejrzysty omówiła mechanizmy fotostarzenia skóry oraz współczesne koncepcje ochrony przeciwslonecznej. Zagadnienia omawiane w tych rozdziałach stanowią dobre uzasadnienie i wprowadzenie do części doświadczalnej pracy. Następnie, w rozdziale 4. Doktorantka w sposób spójny omówiła właściwości biologiczne i prozdrowotne ekstraktów z substancji roślinnych pochodzących z rodzin Oleaceae i Rubiaceae. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę na pewne nieścisłości w klasyfikacji związków. Niekiedy Doktorantka klasyfikuje „katechiny” jako flawony lub „katechinę” jako flawon-3-ol, podczas gdy katechina należy do grupy flawan-3-oli. Opisując związki charakterystyczne dla liści oliwki europejskiej Doktorantka wymieniła m.in. hydroksytyrozol i tyrozol, ale czasami w tekście opisywane były „hydroksytyrozyna” czy „tyrozyna”, które jak rozumiem miały być odpowiednikami hydroksytyrozolu i tyrozolu. Kwas kawowy został z kolei sklasyfikowany jako podstawiony fenol, a bardziej poprawnym stwierdzeniem byłoby przypisanie tego związku do

grupy kwasów fenolowych. Podobnie α -tokoferol powinien być przypisany do grupy tokoferoli a nie karotenoidów. Natomiast kwas rozmarynowy i chlorogenowy stanowią właściwie połączenia estrowe kwasów fenolowych zwane depsydami, dlatego sformułowanie „kwaśne pochodne” wydaje się być sformułowaniem potocznym. Z drugiej strony przedstawione na rycinie 6. struktury związków występujących w wybranych do badania substancji roślinnych wymagałyby weryfikacji, zwłaszcza struktura eskuliny i kwasu 3,4-dikawoilochinowego. Eskulina jest glikozydem kumarynowym, podczas gdy zaprezentowana na rycinie eskuletyna jest jej formą aglikonową. Natomiast w zamieszczonej strukturze kwasu kawoilochinowego podstawniki znajdują się w pozycji 1 i 5, a nie – 3 i 4 jako opisano. W dalszej części rozprawy poświęconej pracy doświadczalnej Doktorantka uzasadniła podjęcie tematu, omówiła założenia i cele badań, a następnie przedstawiła materiały, zastosowane metody badawcze, wyniki i dyskusję. Podczas analizy wyników pracy dało się zauważyć, że na niektórych wykresach były prezentowane wyniki dla wszystkich wyciągów oznaczonych akronimami FEL, FEK, FRK, OLE i GCBE, a na innych tylko niektóre. Przykładowo na rycinach 15. i 16. nie zauważyłam wyników dla wyciągu z liści oliwki europejskiej czy z liści jesionu wyniosłego. Całość pracy zamyka podsumowanie wyników i wnioski. Warto zwrócić uwagę, że dyskusja pracy jest bardzo obszerna i w sposób wyczerpujący odnosi się do aktualnej literatury w zakresie tematycznym.

Pani mgr Machała jest autorką jednej publikacji związanej z tematyką pracy doktorskiej „*Valorization of the photo-protective potential of the phytochemically standardized olive (Olea europaea L.) leaf extract in UVA-irradiated human skin fibroblasts*”, która ukazała się w czasopiśmie *Molecules* (2022, 27, 5144). Publikacji tej przypisuje się współczynnik oddziaływania *Impact Factor* (IF) = 4.927, MEiN = 140. Czasopismo *Molecules* znajduje się na liście *Journal Citation Reports* (JCR) i należy do II kwartyła czasopism o najwyższym IF oraz III kwartyła czasopism o najwyższej cytowalności w kategorii *Biochemistry & Molecular Biology*. W związku z tym mgr Machała spełnia wymagania dotyczące nadania stopnia doktora opisane w art. 186 pkt. 3 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z 20.07.2018r.

Analizując wyniki pracy, które nie budzą moich jakichkolwiek zastrzeżeń, nasunęło mi się kilka pytań, które kieruję do Doktorantki.

Dwa wyciągi, tj. z liści oliwki oraz z nasion kawy zostały pozyskane komercyjnie. W opublikowanej pracy można znaleźć informację nt. producenta suplementu zawierającego wyciąg etanolowo-wodny z liści oliwki (Medica Herbs, Kraków), ale nieznane jest źródło pozyskania ekstraktu z nasion kawy ani liści i/lub kory jesionu wyniosłego oraz koreańskiego. Niestety poza informacją, że Doktorantka badała ekstrakty metanolowe z liści i/lub kory jesionu wyniosłego oraz koreańskiego, nie znalazłam opisu sposobu przygotowania tych wyciągów. Ze względu na częste różnice w składzie oraz jakości substancji roślinnych czy suplementów diety, a także konieczność potwierdzenia tożsamości badanych surowców lub przetworów z nich pozyskanych taka informacja wydaje się być istotna. Niekiedy dochodzi bowiem do zafalszowań, niezgodności lub niewłaściwego nazewnictwa substancji roślinnych.

Gęstość energii, która w przypadku prezentowanych doświadczeń wynosiła 8 J/cm^2 , jest faktycznie tradycyjnie stosowanym parametrem określającym naświetlanie komórek w warunkach *in vitro*. Doktorantka wspomniała, że „optymalna zastosowana dawka promieniowania została ustalona wcześniej doświadczalnie”. Czy Doktorantka mogłaby podać więcej szczegółów na temat tej optymalizacji? Z praktycznego punktu widzenia nasuwa się pytanie, jak długi był czas naświetlania komórek. Wiąże się to bowiem z inkubacją komórek poza inkubatorem zapewniającym standardowe warunki hodowli.

Na jakiej podstawie Doktorantka wybrała stężenia badanych wyciągów, tj. 5 i 25 $\mu\text{g/ml}$? Czy Doktorantka podejmowała próby określenia wpływu ekstraktów w wyższych stężeniach na żywotność komórek czy inne parametry będące przedmiotem przedstawionej rozprawy? Który

z badanych wyciągów – według Doktorantki – może wykazywać największy potencjał fotoprotekcyjny na podstawie uzyskanych wyników badań?

W przeprowadzonych doświadczeniach Doktorantka inkubowała komórki linii Hs68 przez 24 godziny, po czym po płukaniu za pomocą zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej poddawała naświetlaniu promieniami UVA. Następnie kontynuowała inkubację komórek w medium hodowlanym bez dodatku wyciągów. Czy możliwe jest, że za efekty obserwowane w przeprowadzonych eksperymentach odpowiadają inne związki niż te, które zidentyfikowano pierwotnie w wyciągach za pomocą metod chromatograficznych? Jakie zmiany strukturalne mogą występować w strukturach związków charakterystycznych dla badanych substancji roślinnych po wpływie promieniowania UVA? Jakim reakcjom mogą one – zwłaszcza kumaryny i sekoirydoidy – ulegać w trakcie naświetlania?

Podsumowując najważniejsze osiągnięcia recenzowanej pracy doktorskiej, należy wymienić rezultaty o największym, nowatorskim znaczeniu, takie jak:

- wskazanie aktywności hamującej tworzenie indukowanych promieniowaniem UVA uszkodzeń DNA przez badane wyciągi;
- określenie wpływu ekstraktów na poziom ekspresji reduktazy tioredoksyny;
- zmniejszenie aktywności β -galaktozydazy związanej ze starzeniem pod wpływem testowanych wyciągów;
- wskazanie, że badane ekstrakty ograniczają procesy apoptozy i starzenia komórkowego poprzez hamowanie poziomu ekspresji białka p53, czynników transkrypcyjnych AP-1 oraz NF κ B, jak również aktywację białka Klotho odpowiadającego za spowolnienie procesów fotostarzenia;
- wyznaczenie wskaźników ochrony przeciwsłonecznej SPF dla badanych wyciągów.

W recenzowanej pracy potwierdzono, że badane przetwory roślinne wykazują ponadto aktywność przeciwutleniającą, jak również hamują sekrecję mediatorów stanu zapalnego. Dodatkowo – jak wspomniała Doktorantka – większość przebadanych naturalnych substancji i wyciągów roślinnych posiada zbyt niski SPF, by mogły być stosowane samodzielnie w kremach do opalania, natomiast mogą one stanowić cenny składnik kremów o niskim SPF do codziennego użytku. Dzięki temu wykazują działanie fotoprotekcyjne, co może stanowić podstawę dla ich dalszych badań w warunkach *in vivo* oraz potencjalnego zastosowania w praktyce dermatologicznej. W związku z powyższym badania podjęte przez mgr Machałę dostarczają oryginalnych informacji w zakresie badania aktywności wybranych substancji roślinnych i charakteryzują się znacznym potencjałem aplikacyjnym. W mojej opinii recenzowana praca oraz liczne kursy i szkolenia, które odbyła Doktorantka, potwierdzają, że jest Ona gotowa do samodzielnego planowania i prowadzenia projektów naukowych. Szeroki zakres metod badawczych i realizacja założonych, wielokierunkowych celów badawczych pozwala mi na przedstawienie pozytywnej opinii na temat rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Machały.

Przechodząc do wniosków końcowych stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca mgr Pauliny Machały spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dn. 20.07.2018r. (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm., dział V, rozdział 1 i 2, art. 186, 187 pkt.1-4). Na tej podstawie wnioskuję do Komisji ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Pauliny Machały do dalszych etapów postępowania doktorskiego, rekomendując tym samym nadanie Pani mgr Paulinie Machale stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki

Monika Czerwińska
dr hab. Monika Czerwińska

