

Lublin, 16 sierpnia 2020 r.

Dr hab. inż. Andrea Baier  
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II  
Wydział Nauk Ścisłych i nauk o Zdrowiu  
Katedra Fizjologii Zwierząt i Toksykologii  
Ul. Konstantynów 1i  
20-708 Lublin  
e-mail: baier@kul.pl  
tel: 81 4545 426

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Anny Matwiejczuk  
**„Wpływ kwasu rozmarynowego ma zmiany indukowane metylo- i  
propyloparabenem w metabolizmie kolagenu fibroblastów skóry ludzkiej“**

Tematem badawczym rozprawy doktorskiej mgr Natalii Anny Matwiejczuk jest wpływ parabenów (wykorzystywanych w kosmetykach) na metabolizm kolagenu oraz proliferację i przeżywalność fibroblastów oraz potencjalny efekt zastosowaniu kwasu rozmarynowego na hamowanie negatywnych oddziaływań konserwantów na komórki skóry ludzkiej.

Struktura parabenów jest podobna do struktury estrogenu i są one absorbowane przez skórę. Istnieje zagrożenie, że mogą one mieć wpływ na układ hormonalny człowieka. Parabeny są bardzo tanie, działają w niskich stężeniach i są dobrze tolerowane w kosmetykach. Inne substancje konserwujące mogą powodować wysypki i inne reakcje alergiczne.

W 2014 Unia Europejska zdecydowała o ograniczeniu stężenia parabenów w kosmetykach do 0,4% dla metylo- i etyloparabenów oraz 0,14% dla n-butylo- i n-propyloparabenów. Stężenia wszystkich parabenów w produkcie nie mogą przekraczać 0,8%. Jednak trzeba brać pod uwagę, że konsumenci używają więcej niż jeden produkt kosmetyczny i nie tylko produkty kosmetyczne ale również produkty spożywcze oraz farmaceutyczne mogą zawierać parabeny.

Istnieją wiele badań na temat parabenów, jednak mimo wyników z różnych grup badawczych nie ma jednoznacznej interpretacji dotyczącej zagrożenia tych związków na zdrowie człowieka. Jest to na pewno też związane z licznymi badaniami statystycznymi

prowadzonymi na małej grupie pacjentów, które nie pozwalają na uzyskanie jednoznacznych i pewnych wyników.

Substancje pochodzenia roślinnego znane są z ich działania przeciwdrobnoustrojowego, przeciwnowotworowego i antyoksydacyjnego. Kwas rozmarynowy, który jest składnikiem wielu ziół, jest polifenolem i posiada aktywności biologiczne, takie jak: przeciwwzapalne, antyalergiczne, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne i chroni przed szkodliwym działaniem promieniowania UV oraz reaktywnych form tlenu (ROS). Z tego powodu kwas rozmarynowy jest stosowany jako naturalna substancja konserwująca w kosmetykach i produktach spożywczych.

Rozprawa doktorska została napisana w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych. Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach jako dwa artykuły oryginalne oraz jedna praca przeglądowa (Journal of Applied Toxicology, Nutrient) o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) 10,145 a zgodnie z punktacją MNiSW 340. Pani Matwiejczuk w wszystkich pracach jest pierwszym autorem.

Rozprawa doktorska mgr Natalii Anny Matwiejczuk posiada układ klasyczny w skróconej formie zgodnie z wewnętrznymi wytycznymi: Wstęp – 5 stron; Cel pracy – 2 strony, Materiały i metody – 2 strony; Wyniki badań – 3 strony oraz Dyskusja i podsumowanie – 2 strony. Cel pracy jest jasno sformułowany, a część opisowa kończy się wnioskami, Bibliografią obejmującą 91 pozycji i Streszczeniem w języku polskim i angielskim.

We wstępie autorka opisuje znaczenie parabenów w kosmetykach i ich potencjalny wpływ na zdrowie człowieka. Jasne podkreślono jak ważne są badanie nad ochroną zdrowia przed toksycznymi substancjami, jak np. parabeny.

W części „Materiały i metody” schematycznie przedstawiono zaplanowane oznaczenia oraz odpowiednie metody badawcze.

Uzyskane wyniki autorka przedstawiła w bardzo skróconej formie podsumowując najważniejsze oznaczenia oraz połączenie pomiędzy nimi. Większość wyników jest zilustrowane w formie jednego schematu, który pokazuje działanie parabenów oraz działanie

ochronne przez RA. Na końcu rozprawy doktorskiej dodane zostały kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy oraz oświadczenia współautorów.

### **Główne celami badawczymi przedstawionymi w rozprawie doktorskiej są:**

- I) Ocena wpływu MP (metyloparaben) na biosyntezę kolagenu i ekspresję poszczególnych typów kolagenu skóry (I, III, VI) oraz aktywność MMP-2 i proliferację komórek w modelu doświadczalnym hodowli fibroblastów skóry ludzkiej.
- II) Zbadanie wpływu MP w połączeniu z PP (propyloparaben) na metabolizm kolagenu i proliferację komórek skóry ludzkiej oraz wyjaśnienie potencjalnych mechanizmów i działania.
- III) Wykazanie protekcyjnego działania kwasu rozmarynowego przed niekorzystnym działaniem parabenów na kolagen i fibroblasty skóry ludzkiej.
- IV) Wyjaśnienie potencjalnych mechanizmów protekcyjnego działania kwasu rozmarynowego (RA) na kolagen i fibroblasty oraz określenie rodzaju jego interakcji z parabenami.

W celu realizacji postawionych celów zostało zaplanowane wiele różnych oznaczeń: badanie biosyntezy kolagenu, sekrecja i degradacja kolagenu, przeżywalność komórek, badanie proliferacji i apoptozy. Do ich realizacji autorka zastosowała różnorodne metody badawcze, do których należały np. RT-PCR, western blot, metody immunocytochemiczne, zymografia, test MTT, test Sircol oraz badanie wbudowania proliny w kolagen i tymidyny do DNA

Zaplanowane badania i metody stosowane do ich realizacji są przedstawione jako schemat.

### **Najważniejsze wyniki**

- I) MP hamują biosyntezę kolagenów, a także ekspresję genów kodujących kolagen typu I, III i VI w sposób zależny od stężenia. Potwierdzono tego wpływu wykazano również dla MP z PP dla kolagenu I i III na poziomie ekspresji genów i białka.
- II) Parabeny obniżają aktywności prolidazy, wydzielanie kolagenu do medium.

- III) MP zwiększa aktywność MMP-2 i jednocześnie obniżają aktywność inhibitora TIMP-2. MP i PP razem zwiększają aktywności MMP-1 i MMP-2 oraz hamują ekspresję TIMP-1 i TIMP-2 na poziomie mRNA i białka
- IV) Ekspresja MTI-MMP jest obniżona na poziomie mRNA, jednak równocześnie obserwuje się zwiększoną ekspresję na poziomie białkowym w obecności MP i PP.
- V) MP wykazuje wpływ na przeżywalność i proliferację komórek
- VI) Pod wpływem MP oraz MP z PP obserwowana jest zwiększona ekspresja i translokacja do jądra kaspazy-3, zwiększona ekspresja białko Bax i obniżona ekspresja białka Bcl-2.
- VII) Wykazano zwiększenie ekspresji białka CTHRC1 i ufosforylowanego ERK1/2.
- VIII) MP i PP obniżają ekspresję białka HSP47.
- IX) RA zapobiega hamowaniu biosyntezy kolagenu spowodowanego przez paraben.
- X) RA odwraca negatywny efekt parabenów na ekspresję kolagenu na poziomie mRNA oraz białkowym.
- XI) W większości przypadków RA (w zależności od stężenie) odwraca niekorzystne działanie parabenów na komórki skóry.

### **Uwagi**

- I) Wstęp nie zawiera aktualnych informacji dotyczących zastosowania parabenów w kosmetykach. Informacje w rozprawie lub w publikacjach w większości są z roku 2015 lub wcześniej.
- II) Jak można wytłumaczyć różnicę w działaniu 100 i 150  $\mu\text{M}$  RA na biosyntezę kolagenu. Na czym może polegać oddziaływanie RA z parabenami?
- III) W pkt. 1 wniosków podano, że MP oraz MP z PP wpływa na ekspresję genów kodujących kolageny typu I, III i VI. Jednak w wynikach rozprawy oraz w załączonych publikacjach nie badano ekspresji genu *COL6A1* dla obu parabenów.
- IV) W pkt. 2 wniosków podano, że hamowanie biosyntezy kolagenu może być spowodowane zwiększeniem pod wpływem parabenów aktywności prolidazy, ekspresji CTHRC1 i aktywności ERK1/2. Nie jest to jednak pokazane ani w części opisowej wyników ani w dołączonych publikacjach. W części opisowej wyników autorka stwierdziła, że aktywność prolidazy jest obniżona. Nie badano aktywności ERK1/2 a jedynie ekspresję ufosforylowanej kinazy.

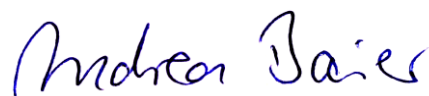
Pragnę podkreślić, że powyższe uwagi nie zmniejszają ogólnie bardzo pozytywnej oceny recenzowanej pracy.

### **Wniosek końcowy**

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Anny Matwiejczuk napisana jest jasno i logicznie. Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład do badań nad wpływem parabenów na metabolizmu kolagenu. Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera ważne i oryginalne wyniki, świadczy o dobrym przygotowaniu doktoranta do prowadzenia badań, wskazując jednocześnie na bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu wykorzystywane do pisania pracy przeglądowej.

Rozprawa spełnia wszystkie kryteria dotyczące przygotowywania rozpraw doktorskich w formie zbioru prac spójnych tematycznie.

Wobec powyższego wnioskuję do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie rozprawy Pani mgr Natalii Anny Matwiejczuk.



Andrea Baier