

Sosnowiec, 15.05.2023r.

Ocena pracy doktorskiej pt.

**Ocena protekcyjnego wpływu oleju z nasion szarłatu wyniosłego
(*Amaranthus cruentus*) na fibroblasty skóry ludzkiej poddane działaniu
promieniowania UVA**

wykonanej przez
mgr Katarzynę Wołosik

**w Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny
Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku**

Katedra i Zakład Chemii
i Analizy leków

Wydział Nauk Farmaceutycznych
w Sosnowcu

Śląski
Uniwersytet Medyczny
w Katowicach

ul. Jagiellońska 4
41-200 Sosnowiec
www.chemialekow.sum.edu.pl

Dr hab.n.farm.
Artur Beberok, prof. SUM
tel.: (+48 32) 364 16 91
abeberok@sum.edu.pl

SEKRETARIAT
tel./fax: (+48 32) 364 16 11
chemlek@sum.edu.pl



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

W grupie czynników fizycznych promieniowanie słoneczne stanowi jeden z najbardziej wszechobecných środowiskowych czynników stresowych. Promieniowanie, szczególnie w zakresie UVA, nieustannie oddziałuje na skórę, wpływając na jej wygląd i kondycję, zarówno w sposób zauważalny na co dzień, jak i w sposób odległy w czasie, powodując jej nieodwracalne uszkodzenia. Promieniowanie słoneczne stanowi najistotniejszy czynnik, wpływający na przyspieszenie procesu starzenia skóry, nazywanego fotostarzeniem. Wyróżnia się dwa mechanizmy fotostarzenia, z których pierwszy polega na produkowaniu reaktywnych form tlenu (RFT) pod wpływem UVA. Zwiększona ilość RFT może prowadzić do uszkodzeń DNA, zaburzenia biosyntezy kolagenu oraz śmierci komórki na drodze apoptozy. Drugi mechanizm opiera się na bezpośredniej interakcji promieniowania UVB z DNA komórkowym i indukowaniu powstawania jego uszkodzeń. Dodatkowo w wyniku oddziaływania RFT zmianom strukturalnym ulega kolagen. Zmniejszona jego ilość w wyniku oddziaływania promieniowania UVA odbywa się na wielu płaszczyznach. Zaburzeniom ulega zarówno proces biosyntezy na poziomie substratowym (upośledzenie aktywności prolidazy dostarczającej podstawowego aminokwasu – proliny- do jego syntezy), na poziomie transkrypcyjnym (zmiany w przekaźnictwie sygnału do jądra komórkowego oraz zmiany ekspresji genów kolagenu typu I poprzez aktywację NFκB) oraz na poziomie jego degradacji poprzez aktywację metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMP).

Promieniowanie UVA powoduje wzrost ekspresji białka p53, które odgrywa kluczową rolę w kierowaniu komórek na drogę przeżycia lub apoptozy. W wyniku przewlekłego napromieniowania, śmierć komórek może prowadzić do trwałego uszkodzenia tkanek skóry. Aby zachować integralność bariery skórnej, reakcje na UV dodatkowo mogą obejmować mechanizmy, dzięki którym komórki mogą przetrwać w warunkach stresu. Jednym z tych mechanizmów jest sygnalizacja serynowo-treoninowej kinazy Akt z kinazą serynowo-treoninową mTOR, wzajemnie oddziałującą z białkiem p53 i pojawiającą się jako potencjalny regulator życia i śmierci napromieniowanych komórek skóry. W konsekwencji oddziaływania promieniowania UV na komórki, dochodzi do ich zaprogramowanej śmierci na drodze apoptozy, podczas której aktywowane są proteazy cysteinowe, zwane kaspazami. Długotrwała ekspozycja na UV może powodować wiele niekorzystnych zmian struktury, funkcji i wyglądu skóry. Zjawiska zachodzące w skórze pod wpływem światła są związane z procesem zapalnym. Przewlekłe oddziaływanie UVA powoduje stan zapalny skóry właściwej z uwalnianiem cytokin i czynników wzrostu, w tym jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Aktywowany NF- κ B odgrywa rolę w regulacji ekspresji różnych genów zaangażowanych w odpowiedzi immunologiczne i zapalne m.in.: ekspresję cyklooksygenazy COX-2, enzymu związanego z procesem zapalnym. Nadmierna ekspozycja skóry na promieniowanie słoneczne, wiąże się ze zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu i azotu, co skutkuje stresem oksydacyjnym, stanem zapalnym, immunosupresją, produkcją metaloproteinaz macierzy, uszkodzeniami DNA czy mutacjami.

W organizmie istnieją naturalne mechanizmy pozwalające zmniejszać negatywne skutki oddziaływania RFT. Działanie tego systemu polega na niedopuszczeniu do powstawania i oddziaływania reaktywnych rodników ze składnikami komórki lub na przerywaniu łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych. W skład tych wewnątrzkomórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych wchodzi: antyoksydanty drobnocząsteczkowe (np.: witamina C, witamina E, koenzym Q, karoteny, glutation, pierwiastki śladowe) oraz antyoksydanty wielkocząsteczkowe (enzymatyczne), do których należą: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationu czy reduktaza glutationu. Na skutek działania czynników zewnętrznych, w tym promieniowania UV, wewnątrzkomórkowe antyoksydanty ulegają zubożeniu i z tego powodu poszukuje się nowych substancji pochodzenia zewnętrznego, które będą takie działanie wykazywały.

Należy podkreślić, iż przedmiotem ciągłego zainteresowania zarówno naukowców, jak i firm kosmetycznych, są zagadnienia ochrony skóry przed promieniowaniem UV. Nowoczesne preparaty kosmetyczne zawierają w swoim składzie składniki o potencjalnym działaniu antyoksydacyjnym lub/i ochronnym względem tego promieniowania. W nowoczesnej kosmetologii obserwuje się więc rosnące zainteresowanie wzbogacaniem receptur kosmetyków naturalnymi składnikami o działaniu protekcyjnym i antyoksydacyjnym np.: olejami roślinnymi.

Opierając się na najnowszych doniesieniach naukowych można stwierdzić, iż oleje roślinne, w tym olej rokitnikowy, olej z pestek dyni, sezamowy, z wiesiołka czy awokado, posiadają potencjał fotoprotekcyjny i antyoksydacyjny. Do tej pory, nieliczne są badania nad olejem z nasion szarłatki wyniosłego (*Amaranthus cruentus*), którego skład chemiczny sugeruje potencjał antyoksydacyjno-fotoprotekcyjny. Olej ten, pomimo niskiej zawartości lipidów (4.8% - 8.9%), wyróżnia się obecnością nienasyconych kwasów tłuszczowych, wśród których przeważa kwas linolowy, powszechnie stosowany jako antyoksydant. Dodatkowo olej ten zawiera skwalen, pochodne witaminy E, m.in.: γ -, δ -tokotrienole oraz fitosterole, składniki niewystępujące jednocześnie w innych znanych olejach roślinnych, a posiadające duży potencjał oksydoredukcyjny i tym samym dające perspektywę zastosowania oleju amarantusowego w preparatach kosmetycznych, których celem jest zapobieganie procesowi fotostarzenia, jako naturalny filtr ochronny i antyoksydant.

Uzasadnionym zatem celem badań, przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Wołosik, była ocena wpływ oleju z nasion szarłatki wyniosłego i skwalanu (stabilnej

i nasyconej pochodnej skwalenu) na procesy biochemiczne w modelu komórkowym fibroblastów skóry ludzkiej, poddanych działaniu promieniowania UVA

Tytuł dysertacji Doktorantki został prawidłowo sformułowany i w pełni odzwierciedla cel badań. Wybór tematu pracy doktorskiej uważam za trafny, zgodny z kierunkiem współczesnych badań naukowych i aktualnym stanem wiedzy. Podejmowany problem uważam za uzasadniony, niezwykle ważny zarówno: i/ z punktu widzenia naukowego, ii/ znaczenia medycznego oraz iii/ społecznego, z uwagi na fakt, iż zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej na poziomie komórkowym leżą u podstaw rozwoju wielu chorób cywilizacyjnych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 149 strony tekstu wraz z piśmiennictwem. Tekst pracy zawiera typowe dla opracowań naukowych rozdziały, z zachowaniem właściwych proporcji. Dodatkowo w pracy zamieszczono wykaz skrótów stosowanych w tekście pracy, co bardzo ułatwia ocenę dysertacji.

We Wstępie Doktorantka w oparciu o obszerne piśmiennictwo przedstawiła aktualną wiedzę z zakresu charakterystyki promieniowania ultrafioletowego, procesu fotostarzenia, apoptozy oraz kolagenu. W kolejnym podrozdziale dokonała i/ systematyki rodzaju *Amaranthus* i gatunku *Amaranthus cruentus*, ii/ opisu botanicznego gatunku *Amaranthus cruentus* oraz iii/ analizy składu chemicznego nasion szarłatki wyniosłego. Na uwagę zasługuje fakt, iż ostatni podrozdział tej części pracy Autorka poświęciła charakterystyce badanego oleju z nasion szarłatki wyniosłego oraz badanego skwalanu. Zagadnienia omówione na 36 stronach Wstępu zostały dodatkowo uzupełnione 7 rycinami oraz 4 tabelami. Należy podkreślić, iż omówione we Wstępie pracy zagadnienia świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do podjęcia badań, będących podstawą pracy doktorskiej, a także stanowią wprowadzenie do postawionego celu badań.

Przedstawiony przez Panią mgr Katarzynę Wołosik cykl badań stanowi starannie zaplanowany i dobrze przemyślany panel eksperymentalny umożliwiający analizę założonej hipotezy badawczej. Realizacja postawionego celu pracy wymagała od Doktorantki dokonania oceny i/ przeżywalności komórek, apoptozy metodą cytometrii fluorescencyjnej oraz ocenę ekspresji białek kaspazy-3/9 i p53, ii/ generowania reaktywnych form tlenu, poziomu tioli zredukowanych oraz ekspresji czynnika Nrf2, iii/ syntezy DNA oraz ekspresji białka PARP, iv/ syntezy kolagenu oraz związaną z tym procesem ocenę aktywności prolidazy, ekspresji receptora β 1-integrynowego, fosforylowanej formy kinazy ERK1/2 i p38 oraz transformującego czynnika wzrostu TGF- β , v/ pro przeżyciowych białek: receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF-IR, związanej z nim kinaz p-Akt i mTOR vi/ prozapalnych białek NF κ B i COX-2 oraz vii/ oceny migracji i proliferacji komórek w modelu gojenia rany z wykorzystaniem *scratch test*'u. Szczegółowy opis zastosowanych metod badawczych został zamieszczony w rozdziale „Materiał i Metody”. Przedstawione metody są co do zasady aktualne i adekwatne do rozwiązywanych problemów naukowych i w zdecydowanej większości nie budzą żadnych wątpliwości. Na uwagę zasługuje fakt, iż w pracy zastosowano nowoczesne techniki badawcze, w tym fluorescencyjną cytometrię obrazową oraz fluorescencyjną analizę ekspresji białek przy pomocy bioobrazowania z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego BD Pathway 855. Pojawiło się jednak kilka zagadnień, które w mojej opinii wymagają wyjaśnienia lub przedyskutowania:

i/ co stanowiło kryterium wyboru dla zastosowanej w badaniach linii komórkowej fibroblastów skóry ludzkiej – proszę o przedyskutowanie dlaczego nie zastosowano linii komórkowych ludzkich melanocytów czy keratynocytów.

ii/ co stanowiło kryterium wyboru dla zastosowanej w badaniach dawki promieniowania UVA - 10 J/cm².

iii/ czy podczas procedury naświetlania komórek zastosowano PBS z dodatkiem jonów wapnia i magnezu, gdyż w przypadku niektórych linii komórkowych naświetlanie promieniowaniem UVA w obecności PBS nie wzbogaconego o te składniki może przyczynić się do niekontrolowanego odklejania komórek.

Sformułowanie powyższych pytań wynika jedynie z przywileju recenzenta, z którego skorzystałem i w żadnym wypadku nie ma charakteru uwag krytycznych. Powyższe pytania mogą natomiast stanowić wskazówki w kierunku doskonalenia warsztatu badawczego oraz interesujący przedmiot dyskusji na polu naukowo-akademickim.

Uzyskane wyniki badań zostały zredagowane na 50 stronach pracy w rozdziale „Wyniki” oraz udokumentowane szczegółowo na 39 rycinach. W tej części Autorka dokonuje zasadniczego omówienia wyników. Należy podkreślić, iż rozdział ten świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnienia oraz dobrym przygotowaniu do realizacji badań.

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie uzasadnionych wniosków, korespondujących z założonym celem pracy i wnoszących nowe istotne informacje do aktualnego stanu wiedzy. W mojej opinii najistotniejszymi efektami prowadzonych badań było wykazanie iż:

i/ promieniowanie UVA w dawce 10 J/cm² pobudza ekspresję białek p53, kaspazy -3 i -9, PARP, powstawanie reaktywnych form tlenu, oraz obniża ilość zredukowanych tioli, upośledzając biosyntezę DNA, przeżywalność fibroblastów i indukując wewnątrzpochozny proces apoptozy. Zastosowanie oleju z nasion szarłatu wyniosłego oraz skwalanu odwracało niekorzystne efekty wywołane przez UVA na badane procesy;

ii/ promieniowanie UVA obniża ekspresję receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-IR) oraz białek przekąźnikowych p-AKT i mTOR. Zastosowanie oleju amarantusowego oraz skwalanu działało protekcyjnie na omawiany proces;

iii/ promieniowanie UVA upośledza biosyntezę kolagenu oraz aktywność prolidazy, ekspresję receptora β 1-integrzynowego, fosforylowanych form kinaz ERK1/2 oraz czynnika TGF- β , natomiast pobudza ekspresję kinazy p38. Zastosowanie oleju z nasion szarłatu wyniosłego oraz skwalanu odwracało niekorzystne efekty wywołane przez UVA na badane procesy;

iv/ promieniowanie UVA indukuje ekspresję i translokację do jądra komórkowego prozapalnego czynnika NF- κ B oraz nasila ekspresję COX-2. Zastosowanie oleju z nasion szarłatu wyniosłego i skwalanu powodowało znaczne zahamowanie ekspresji tych czynników;

v/ olej z nasion szarłatu wyniosłego i skwalan nasila stymulowaną przez UVA ekspresję i translokację do jądra komórkowego czynnika Nrf2 co stanowi molekularny mechanizm stymulacji systemu antyoksydacyjnego w fibroblastach;

vi/ olej z nasion szarłatu wyniosłego oraz skwalan stymulują proliferację i migrację fibroblastów w modelu gojenia ran. Po ekspozycji komórek na promieniowanie ultrafioletowe, olej amarantusowy pobudzał proces gojenia, natomiast skwalan w nieznacznym stopniu wpływał na ten proces.

vii/ olej z nasion szarłatu wyniosłego oraz skwalan mogą stanowić potencjalne preparaty o działaniu przeciwdziałającym niekorzystnym efektom wywołanym przez UVA na skórę.

Cytowane przez Doktorantkę 148 pozycje piśmiennictwa naukowego odzwierciedla rzetelnie stan wiedzy w obrębie omawianego tematu. Warto podkreślić, iż 47/148 pozycji, co stanowi około 32%

wszystkich danych literaturowych - to doniesienia z ostatnich 10 lat, a spośród nich 21/47 pozycji (około 45%) to prace opublikowane w ciągu ostatnich 5 lat, co wskazuje na dużą aktualność podjętego do oceny przez Doktorantkę problemu naukowo-medyczno-społecznego. Rozprawa doktorska została zakończona Streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są oryginalne i zaprezentowane w rzetelny sposób. Autorka posługuje się fachowym słownictwem, co świadczy o dobrej orientacji w badanej dziedzinie. Treść pracy napisana jest starannie, zwarcie i utrzymana jest w logicznej sekwencji.

Z dużą satysfakcją pragnę podkreślić wartości poznawcze przedstawionych do oceny badań naukowych. Uzyskane wyniki dla przeprowadzonych analiz potwierdzają hipotezę o protekcyjnych i antyoksydacyjnych właściwościach oleju z nasion szarłatu wyniosłego i skwalanu. Stanowi to podstawę do prowadzenia dalszych badań nad zastosowaniem badanych substancji w formulacjach o działaniu nie tylko pielęgnacyjnym, ale również fotoochronnym, antyoksydacyjnym i regeneracyjnym.

Reasumując wyrażam opinię, że przedstawiona do recenzji praca odpowiada wymogom stawianym rozprawom na stopień naukowy doktora, co w konsekwencji upoważnia mnie do wystąpienia z wnioskiem do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Wołosik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

PROFESOR SUM BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Zakładu Chemii i Analizy Leków
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Artur Beberok
dr hab. n. farm. Artur Beberok prof. SUM

