



Lublin, 22.05.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Wołosik na temat
„Ocena protekcyjnego wpływu oleju z nasion szarłat wyniosłego
(*Amaranthus cruentus*) na fibroblasty skóry ludzkiej poddane działaniu
promieniowania UVA”**

Wybór tematu

Promieniowanie słoneczne wywiera wielokierunkowy wpływ na organizm człowieka. Z jednej strony jest potrzebne do życia, stymuluje syntezę witaminy D3, ma pozytywny wpływ na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego, odporność oraz stan psychiczny. Z drugiej strony jest istotnym czynnikiem odpowiedzialnym za oparzenia, przedwczesne starzenie skóry, a także zwiększone ryzyko raka skóry. Szczególnie niebezpieczne dla ludzkiej skóry jest, emitowane w jednakowym natężeniu przez cały rok, promieniowanie UVA, które przenika przez chmury oraz szkło i ma zdolność docierania do skóry właściwej, gdzie wpływa na fibroblasty, komórki śródbłona naczyń i układu immunologicznego. UVA powoduje powstawanie produktów utleniania i reaktywnych form tlenu, co skutkuje zakłóceniem procesów oksydacyjno - redukcyjnych, upośledzeniem funkcji komórek skóry, zaburzeniem syntezy kolagenu i uszkodzeniem DNA.

Istnieją naturalne mechanizmy przeciwdziałające negatywnym skutkom stresu oksydacyjnego, np.: poprzez substancje o działaniu przeciwrodnikowym bądź aktywującym naturalne systemy antyoksydacyjne. W wielu przypadkach są one jednak niewystarczające. Dlatego zaleca się stosowanie ochrony przeciwsłonecznej, aby uniknąć lub zminimalizować negatywne skutki promieniowania słonecznego na skórę. Jedną z metod fotoprotekcji jest aplikacja na skórę produktów ochronnych zabezpieczających przeciwko UVA i/lub UVB (np.: tzw. filtrów przeciwsłonecznych). Stale poszukuje się nowych substancji, szczególnie pochodzenia naturalnego, które będą takie działanie wspomagały.

Jedną z substancji, wykazujących potencjał antyoksydacyjny jest olej z nasion szarłat wyniosłego (*Amaranthus cruentus*). Olej ten wyróżnia się obecnością nienasyconych kwasów



tłuszczowych, wśród których przeważa kwas linolowy, skwalen, pochodne witaminy E, m.in.: γ , δ -tokotrienole oraz fitosterole.

Przedstawiona mi do recenzji praca porusza ciekawe zagadnienie dotyczące możliwości wykorzystania protekcyjnego wpływu oleju z nasion szarłat wyniosłego (*Amaranthus cruentus*) na fibroblasty skóry ludzkiej poddane działaniu promieniowania UVA. Doktorantka słusznie podjęła się opracowania naukowego, które jest uzasadnione zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia.

Ocena układu rozprawy doktorskiej i formalnej strony pracy

Przedłożona mi do recenzji praca ma typowy układ rozprawy doktorskiej przygotowanej w postaci monografii. Praca liczy 149 stron i obejmuje 10 rozdziałów: *wprowadzenie* (38 stron), *cel pracy*, *material i metody* (12 stron), *wyniki* (51 stron), *dyskusję* (17 stron), *wnioski*, *streszczenie w języku polskim i angielskim*, *bibliografię oraz spis rycin i tabel*.

Rozprawę rozpoczyna wykaz stosowanych skrótów, co jest przydatne w trakcie czytania poszczególnych części pracy. Całość maszynopisu zilustrowana jest 46 rycinami oraz zawiera 4 tabele, które dobrze porządkują i ułatwiają zrozumienie wyników. Starannie opracowane i właściwie cytowane piśmiennictwo obejmuje 148 pozycji.

Praca napisana jest w przystępny sposób a jej logiczny układ ułatwia czytelnikowi śledzenie realizacji celów postawionych w pracy oraz analizę uzyskanych wyników.

Wprowadzenie

Pracę rozpoczyna obszerne, przejrzyste napisane *Wprowadzenie*, w którym Doktorantka omawia wpływ promieniowania UV na skórę, z uwzględnieniem fotouszkodzeń i fotostarzenia oraz mechanizmu powstawania reaktywnych form tlenu. Następnie Autorka wyjaśnia proces apoptozy z podziałem na szlak wewnątrz- i zewnątrzpochodny oraz przedstawia charakterystykę kolagenu. Dalsza część *Wprowadzenia* to opis gatunku *Amaranthus cruentus* i analiza składu chemicznego nasion szarłat wyniosłego, który obejmuje lipidy, przede wszystkim nienasycone kwasy tłuszczowe, skwalen i jego pochodną skwalan, fitosterole, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach. Ponadto nasiona rośliny cechuje wysoka zawartość białka, węglowodanów oraz żelaza. Obecność flawonoidów i kwasów fenolowych wskazuje na możliwe właściwości antyoksydacyjne. Dopelnieniem Rozdziału jest charakterystyka oleju amarantusowego otrzymywanego z nasion szarłat wyniosłego



(wyprodukowanego przez firmę Szarłat M. i W. Lenkiewicz s.j. Zawady, Polska), a także skwalanu (wyprodukowanego przez Aprinova LLC, USA), które Doktorantka wykorzystała do przeprowadzenia badań własnych.

Cały Rozdział wprowadza czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie i uzasadnia wybór tematyki badawczej pracy.

Cel pracy

Głównym celem pracy było poszukiwanie sposobów przeciwdziałania niekorzystnemu wpływowi promieniowania UVA na komórki skóry, dlatego Doktorantka wyznaczyła szczegółowe cele badawcze, które realizowała w toku prowadzonych doświadczeń. Cele szczegółowe zostały jasno sformułowane i są zgodne z tematem rozprawy.

Doktorantka zaplanowała ocenę wpływ oleju z nasion szarłat wyniosłego i skwalanu (stabilnej i nasyconej pochodnej skwalenu) na wybrane procesy w modelu komórkowym fibroblastów skóry ludzkiej, poddanych działaniu promieniowania UVA, w tym

1. ocenę przeżywalności komórek, apoptozy metodą cytometrii fluorescencyjnej oraz ocenę ekspresji białek kaspazy-3/9 i p53
2. przeżyciową fluorescencyjną ocenę generowania reaktywnych form tlenu, poziomu tioli zredukowanych oraz ekspresji czynnika Nrf2
3. ocenę syntezy DNA oraz ekspresji białka PARP
4. ocenę 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
5. ocenę pro przeżyciowych białek: receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF-IR, związanej z nim kinaz p-Akt i mTOR
6. ocenę prozapalnych białek NF κ B i COX-2
7. ocena migracji i proliferacji komórek w modelu gojenia rany z wykorzystaniem *scratch test*'u

Material i metody

Material i metody zostały opisane w osobnych podrozdziałach. W badaniach Doktorantka zastosowała model komórkowy fibroblastów skóry ludzkiej, które zostały poddane ekspozycji na



promieniowanie UVA w dawce 10 J/cm² w obecności oleju z nasion szarłat wyniosłego (AmO) w stężeniu 0.05%, 0.1% i 0.15% oraz skwalanu (Sq) w stężeniu 0.005%, 0.01% i 0.015%.

Na szczególną uwagę zasługuje szeroki dobór badań doświadczalnych obejmujący: hodowlę fibroblastów skóry ludzkiej, ocenę przeżywalności komórek, cytometryczne oznaczanie apoptozy oraz zawartości grup tiolowych, ocenę stopnia biosyntezy DNA i kolagenu, oznaczanie stężenia białka, ocenę aktywności prolidazy, elektroforetyczny rozdział białek, ocenę ekspresji białek metodą Western Blot, fluorescencyjną analizę ekspresji białek oraz ocenę generowania reaktywnych form tlenu, a także test gojenia rany *in vitro*. Rozdział kończy krótki opis zastosowanych metod statystycznych.

Metody badawcze uważam za właściwe i dobrze dobrane. Co istotne, zostały one szczegółowo opisane i przedstawione adekwatnie do realizowanych celów badawczych. Część eksperymentalna rozprawy doktorskiej została wykonana prawidłowo. Badania zostały zaplanowane logicznie z jasno postawionym celem.

Wyniki

Wyniki zostały przedstawione w sposób dobrze przemyślany i szczegółowy – a tabele i ryciny ułatwiają ich analizę. Rozdział stanowi najobszerniejszą część rozprawy doktorskiej. Zastosowane do dalszych badań stężenia oleju z nasion szarłat wyniosłego (AmO) (0.05%, 0.1% i 0.15%) oraz skwalanu (0.005%, 0.01% i 0.015%) Doktorantka wyznaczyła w sposób doświadczalny na podstawie oceny przeżywalności fibroblastów skóry ludzkiej.

Doktorantka stwierdziła protekcyjny wpływ oleju z nasion szarłat wyniosłego i skwalanu na przeżywalność i funkcjonowanie fibroblastów skóry ludzkiej naświetlanych promieniowaniem UVA. Ponadto wykazała, że oprócz działania antyoksydacyjnego, wpływa on korzystnie na biosyntezę kolagenu, szlaki przekazywania sygnałowego oraz proces gojenia zarówno w komórkach poddanych jak i nie poddanych promieniowaniu UVA.

Dyskusja

Dyskusja została napisana w sposób zrozumiały i zawiera rzeczowe przedstawienie wyników badań w odniesieniu do danych bibliograficznych. Uzyskane wyniki zostały omówione w kontekście danych uzyskanych przez innych autorów. Prowadzona przez Autorkę dyskusja jest konsekwentna i prowadzi do właściwych wniosków. Do tej pory prowadzone były nieliczne badania nad olejem z



nasion szarłatu wyniosłego (*Amaranthus cruentus*), którego skład chemiczny, obejmujący nienasycone kwasy tłuszczowe (np.: kwas linolowy) skwalen oraz pochodne witaminy E ma obiecujący potencjał antyoksydacyjno-fotoprotekcyjny.

Dzięki właściwościom olej z nasion szarłatu wyniosłego i skwalan mogą stać się obiecującymi składnikami preparatów o działaniu nie tylko pielęgnacyjnym, ale również fotoochronnym, antyoksydacyjnym i regeneracyjnym. Niemniej, w tym celu wskazane jest prowadzenie dalszych badań.

Tabele i ryciny zawarte w pracy są czytelne oraz pomocne w interpretacji uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Cenny jest załączony na końcu pracy Wykaz Tabel i Rycin ułatwiający szybkie znalezienie i zapoznanie się z wybranymi fragmentami wyników

Bibliografia

Zacytowane piśmiennictwo jest obszerne i aktualne, obejmuje 148 pozycji, w tym prace opublikowane po 2020 roku.

Wnioski

Pracę podsumowuje 7 wniosków, które zostały sformułowane na podstawie otrzymanych przez Doktorantkę wyników:

1. 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 wewnątrzpochodny proces apoptozy. Zastosowanie oleju z nasion szarłatu wyniosłego oraz skwalanu odwracało niekorzystne efekty wywołane przez UVA na badane procesy.
2. 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.
3. Promieniowanie UVA upośledza biosyntezę kolagenu oraz aktywność prolidazy, ekspresję receptora β 1-integrynowego, 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.

4. 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.
5. Olej z nasion szarłatu wyniosłego i skwalan nasila stymulowaną przez UVA ekspresję i translokację do jądra komórkowego czynnika Nrf2. Stanowi to molekularny mechanizm stymulacji systemu antyoksydacyjnego w fibroblastach.
6. Oleju 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.
7. Olej z nasion szarłatu wyniosłego oraz skwalan mogą stanowić potencjalne preparaty o działaniu przeciwdziałającym niekorzystnym efektom wywołanym przez UVA na skórę.

Uwagi recenzenta

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na błędy i niedociągnięcia głównie o charakterze redakcyjnym.

1. Brak konsekwencji w stosowaniu skrótów. Pomimo ich wcześniejszego wprowadzenia w rozdziale Doktorantka ponownie używa pełnej nazwy zamiast skrótu.
2. Na stronie 8 niejasne jest sformułowanie - ...(upośledzenie aktywności prolidazy dostarczającej podstawowego aminokwasu – prolidazy – do jego syntezy)...
3. Na str. 16 określenie „stan nowotworowy skóry” i „nowotwór skóry” są tożsame
4. Zamiast poparzenia słoneczne powinno być oparzenia słoneczne
5. Na stronie 20 – błąd literowy w skrócie „RTF”
6. Na str. 33 użyto określenia „Małe cienkie włosy pokrywają powierzchnie zarówno liści i łodyg.”
7. Na str. 33 występuje nieścisłość dotyczące kwiatów męskich i żeńskich – „Kwiaty męskie i żeńskie występują w skupieniach po kilka, przy czym nieliczne kwiaty męskie tworzą się na szczycie każdego skupienia. Pięć pręcików o długości 1mm tworzy kwiat męski, podczas gdy szyjka słupka kwiatu żeńskiego zwieńczona jest trójdzielnym znamieniem.” - proszę o wyjaśnienie. Również niejasne są zdania: „Kielkowanie nasion stymuluje światło lub/i



wysokie temperatury.” oraz „Fotosynteza C4 jest serią zmian anatomicznych i biochemicznych...” Proszę wyjaśnić na czym polega fotosynteza C4. Przydatne byłoby zamieszczenie zdjęcia oraz schematu budowy szarłatu wyniosłego. Sugeruję ich zamieszczenie w prezentacji podczas obrony rozprawy doktorskiej.

8. Na str. 62 i 127 zamiast komórek fibroblastów powinno być fibroblastów
9. Na stronie 122 jest odwołanie do Tabeli 5, która nie jest zamieszczona w pracy
10. Niezręczności językowe: np.: „olej amarantusowy stanowi perspektywę zastosowania” lub „z badałam przeżyciowe oznaczanie powstawania RFT w badanym modelu komórkowym”, „markerem uszkodzeń ... jest ocena”, „... oferuje znaczne korzyści po dodaniu do receptur”

Powyższe uwagi nie dotyczą metodologii i wartości naukowej przeprowadzonych badań oraz nie zmniejszają wysokiej oceny merytorycznej pracy.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że doświadczenia stanowiące podstawę pracy doktorskiej zostały starannie zaplanowane i poprawnie wykonane. Doktorantka wykazała się wiedzą i umiejętnością prowadzenia badań naukowych. Uzyskane przez nią wyniki są nowatorskie i ciekawe oraz istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego.

Wnioski końcowe

W mojej ocenie rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.). W związku z powyższym, przedstawiam Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Wołosik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę kompleksowość przeprowadzonych badań, obszerność i wartość merytoryczną uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Joanna Bartosińska