



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW



ZAKŁAD BROMATOLOGII

Dr hab. Barbara Bobrowska-Korczak

Warszawa 2021-07-12



RPW/13242/2021
Data: 2021-07-14
UMB

Recenzja rozprawy doktorskiej pani magister Krystyny Joanny Gromkowskiej-Kępk

Tytuł rozprawy: „Ocena ochronnego działania ekstraktu z młodego jęczmienia na fibroblasty skóry ludzkiej”

Praca wykonana w Zakładzie Bromatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Promotor pracy: dr hab. n. farm. Renata Markiewicz-Żukowska.

Skóra to jeden z najważniejszych i największych narządów naszego ciała. Jej średnia powierzchnia u dorosłego człowieka wynosi od 1,5 do 2 m², a masa wraz z tkanką podskórną może dochodzić do 20 kg. Trójwarstwowa struktura skóry zapewnia jej elastyczność i wytrzymałość. Skóra człowieka spełnia wiele kluczowych funkcji, bez których życie nie byłoby możliwe. Przede wszystkim chroni nas przed zimnem, ciepłem, promieniowaniem, działaniem środków chemicznych, przed wnikaniem drobnoustrojów i pasożytów. Spośród wielu aktywnych funkcji tego narządu należy wymienić przede wszystkim regulację cieplną, czynności wydzielnicze, syntezę witaminy D₃, hormonów oraz melaniny, a także istotną rolę w procesach odpornościowych ustroju.

Wraz z upływem lat w skórze zachodzą zmiany ograniczające jej możliwości funkcjonalne. Starzenie się skóry spowodowane jest czynnikami endogennymi, które są genetycznie zapisanymi zmianami w organizmie człowieka oraz czynnikami egzogennymi, czyli wpływem środowiska zewnętrznego. Mechanizmy te nakładają się i oddziałują wzajemnie na siebie. Przedwczesne starzenie się, czyli starzenie egzogenne wywołane jest najczęściej przez niewłaściwą dietę, częste wystawianie skóry na promieniowanie UV, a także palenie tytoniu. Najbardziej szkodliwym czynnikiem wśród wymienionych jest ekspozycja na promieniowanie UV. Wśród charakterystycznych zmian skóry, związanych z procesem jej starzenia, możemy wyróżnić: zmarszczki, wysuszenie, zwiotczenie, teleangiektazje, przebarwienia i odbarwienia. Sucha skóra występuje u 75% osób powyżej 65 roku życia.



WARSZAWSKI UNIwersYTET MEDYCZNY MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

ZAKŁAD BROMATOLOGII



O skórę należy dbać nawet gdy jest zdrowa, aby zapobiegać jej chorobom w przyszłości. Rynek kosmetyków to gałąź przemysłu, która w ostatnim czasie rozwija się bardzo dynamicznie. Współcześnie kosmetyk ma służyć nie tylko jako środek myjący, ale także pielęgnujący. O dynamice rozwoju tego rynku świadczą nowe formy kosmetyków, takie jak plastry przezskórne, tkaniny kosmetyczne czy suplementy diety poprawiające urodę zwane nutrikosmetykami. Nutrikosmetyki są środkami spożywczymi, zawierającymi takie składniki żywności, które mają wpływać na poprawę kondycji włosów, paznokci, zapobiegać procesom starzenia skóry, a także zmniejszać cellulit. Warto podkreślić, że wszelkie działania korygujące niedoskonałości skóry poprawiają samopoczucie i wpływają również na dobrostan psychiczny danej osoby. Najpopularniejszymi surowcami roślinnymi o działaniu prozdrowotnym na skórę, wykorzystywanymi w nutrikosmetykach są: kwiat rumianku, ziele wąkroty, ziele pokrzywy, kwiat fiołka trójbarwnego, wyciąg ze skrzypu polnego czy olej z nasion ogórecznika. Bardzo ciekawe jest, że Doktorantka w swoich badaniach zainteresowała się preparatami z młodego jęczmienia. Mianem „młodego jęczmienia” określane są młode części liściowe rośliny jęczmienia zwyczajnego - *Hordeum vulgare* L., należącej do rodziny wiechlinowatych. Preparaty z młodego jęczmienia, dostępne komercyjnie na rynku polskim, zalecane są przede wszystkim jako środki wpływające pozytywnie na zdrowie wątroby i woreczka żółciowego, usprawniające pracę układu odpornościowego i pokarmowego, wspomagające odchudzanie, chroniące komórki i tkanki przed uszkodzeniami spowodowanymi działaniem wolnych rodników, wspomagające zdrowie psychiczne (dane producentów z ulotek wybranych preparatów). Z badań wynika, że młody jęczmień wykazuje szerokie spektrum właściwości, takich jak: antyoksydacyjne, przeciwzapalne, hipoglikemiczne, przeciwmiażdżycowe czy przeciwnowotworowe. Natomiast Doktorantka w swoich badaniach podjęła się zadania sprawdzenia czy preparaty z młodego jęczmienia wykazują potencjalną aktywność fotoprotekcyjną, która może być wykorzystana w celu zapewnienia ochrony skóry przed szkodliwym działaniem promieniowania UV, tym samym mając na uwadze poszerzenie spektrum możliwości stosowania w/w preparatów.

W związku z powyższym celem badań, których podjęła się pani magister Krystyna Gromkowska-Kępka, była ocena potencjału antyoksydacyjnego oraz występowania możliwych zanieczyszczeń w preparatach zawierających młody jęczmień, jak również ocena działania ekstraktów z w/w preparatów na fibroblasty poddane działaniu promieniowania UV.



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

ZAKŁAD BROMATOLOGII



Młody jęczmień, ze względu na obecność szeregu związków biologicznie aktywnych wydaje się być obiecującym surowcem do wykorzystania w ochronie przeciwsłonecznej.

Przedstawiona do oceny rozprawa naukowa obejmuje 152 strony. Treść pracy w pełni odpowiada tematowi określonemu w tytule. Układ pracy jest typowy dla prac doktorskich. Praca zawiera 12 rozdziałów, wśród których wyróżniamy: wstęp (36 stron), cel pracy (2 strony), materiał i metodyka (18 stron), wyniki (33 strony), omówienie wyników i dyskusja (17 stron), wnioski (1 strona), streszczenia (4 strony), piśmiennictwo (28 stron) oraz wykaz tabel i rycin (5 stron). O merytorycznym przygotowaniu Doktorantki do realizacji badań świadczy bardzo interesująca część teoretyczna pracy, obejmująca Wstęp (strony od 9 do 44). Doktorantka w sposób staranny i czytelny przedstawiła dane dotyczące: budowy i funkcji skóry, czynników wewnątrzpochodnych i zewnątrzpochodnych wpływających na stan skóry, ochrony skóry przed promieniowaniem UV oraz dane na temat możliwego wpływu młodego jęczmienia na zdrowie człowieka. Następnie przedstawiła cel ogólny i 6 celów szczegółowych prezentowanej pracy. Stwierdzam kompletność celów i ich istotną wartość praktyczną.

Materiał do badań stanowiły suplementy diety z młodego jęczmienia oraz chlorofilu dostępne na rynku w Polsce. W badaniach Doktorantka wykorzystwała 5 preparatów suplementów diety, z których przygotowała po pięć ekstraktów (szczegółowy opis uzyskanych ekstraktów znajduje się w części Metody na stronie 51). W celu oceny jakości badanych preparatów pani Krystyna Gromkowska-Kępka oznaczyła zawartość cynku, miedzi, seleniu oraz rtęci, kadmu i ołowiu, jak również określiła ich status antyoksydacyjny. Stężenie wybranych pierwiastków w wybranych preparatach Doktorantka oznaczyła z wykorzystaniem metody atomowej spektrometrii absorpcyjnej (FAAS) z atomizacją w płomieniu acetylen-powietrze (Zn, Cu), oraz techniką bezpłomieniową z atomizacją elektrotermiczną w kuwecie grafitowej (Se, Cd i Pb) z korekcją tła Zeemana. Stężenie Hg zostało oznaczone metodą spektrometrii absorpcyjno-atomowej z wykorzystaniem techniki amalgamacji przy użyciu analizatora rtęci AMA-245. Wiarygodność i dokładność zastosowanych metod analitycznych Doktorantka potwierdziła stosując certyfikowany materiał odniesienia (INCT-TL-1). Do oznaczenia całkowitej ilości związków polifenolowych (TPC) oraz całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) badanych produktów wykorzystana została metoda spektrofotometryczna.



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

ZAKŁAD BROMATOLOGII



Kluczowym elementem pracy były jednak badania aktywności biologicznej ekstraktów z młodego jęczmienia w warunkach *in vitro*. Doktorantka przeprowadziła wielokierunkową i wnikliwą analizę działania uzyskanych ekstraktów. Przede wszystkim określiła ich cytotoksyczność oraz dokonała oceny ich wpływu na biosyntezę DNA, cykl komórkowy, aktywność metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9) oraz migrację komórek. W zależności od czasu ekspozycji komórek na promieniowanie UV Doktorantka dokonała oceny zarówno właściwości ochronnych, jak i właściwości naprawczych zastosowanych ekstraktów. Warto podkreślić, iż aby osiągnąć postawiony sobie cel pani Krystyna Gromkowska-Kępka wybrała do badań komórki fibroblastów skóry ludzkiej linii NHSF (pozyskane z kolekcji ATCC, Rockville, Maryland, USA). Fibroblasty skórne są głównym typem komórek skóry właściwej. Biorą one udział w większości procesów zachodzących w skórze w ciągu całego życia: przyczyniając się do utrzymania homeostazy skóry, biorąc udział w procesach: gojenia, włóknienia, starzenia, w trakcie przebiegu łuszczycy i raku skóry. Poza produkcją składników macierzy zewnątrzkomórkowej, fibroblasty wydzielają szereg czynników wzrostu i proteaz, które promują oraz regulują gojenie się ran, takie jak czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF2), czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej (VEGF) i czynnik wzrostu hepatocytów (HGF). Fibroblasty są zaangażowane w pigmentację skóry poprzez wydzielanie czynników wpływających na ekspresję enzymów biorących udział w wydzielaniu melaniny i transferu melanosomów. Ocenę syntezy DNA w komórkach fibroblastów, w obecności badanych ekstraktów, Doktorantka przeprowadziła metodą radioizotopową poprzez pomiar wbudowywania [3H]-tymidyny do DNA komórek fibroblastów. Ocenę wpływu badanych ekstraktów na cykl komórkowy fibroblastów wykonała poprzez analizę obrazu po zastosowaniu systemu i odczytników NucleoCounter NC-3000, ocenę aktywności metaloproteinaz określiła z wykorzystaniem metody zymografii żelatynowej, natomiast migrację komórek z wykorzystaniem testu scratch test (wound healing test).

Reasumując, dobór zastosowanych metod badawczych uważam za poprawny. Na podkreślenie zasługuje umiejętność Doktorantki prowadzenia badań z wykorzystaniem tak wielu, nowoczesnych technik badawczych: umiejętność prowadzenia badań w warunkach *in vitro*, jak i umiejętność wykorzystania metod instrumentalnych.

Uzyskane wyniki badań, Doktorantka przedstawiła w części Wyniki, w tabelach VII-XV oraz na rycinach 1-13. Przeprowadzona ocena jakości badanych ekstraktów z młodego



jęczmienia wykazała, że charakteryzują się one wysoką całkowitą zawartością związków polifenolowych (TPC) oraz korzystnym całkowitym statusem antyoksydacyjnym (TAS). Zawartość wybranych składników mineralnych w badanych suplementach diety wynosiła odpowiednio: dla Zn: od $77,3 \pm 2,4$ mg/kg do $289,2 \pm 12,9$ mg/kg; dla miedzi: od $0,097 \pm 0,03$ mg/kg do 7722 ± 6 mg/kg; dla selenu: od $22,4 \pm 5,2$ mg/kg do 496 ± 13 mg/kg. Warto dodać, że etykiety zastosowanych preparatów nie zawierały informacji odnośnie zawartości w/w pierwiastków. Z przeglądu piśmiennictwa z ostatnich lat wynika, że nikt wcześniej nie prowadził badań w tym kierunku. Ze względu na istotną rolę, jaką pełnią Zn, Se i Cu w zapewnieniu prawidłowego funkcjonowania skóry oznaczenie ich zawartości w badanych preparatach ma szczególny wymiar praktyczny. Przyjmowanie suplementów diety z młodego jęczmienia może być pomocne w zapobieganiu występowaniu niedoborów w/w pierwiastków w diecie, a tym samym niwelowaniu skutków ich deficytu w organizmie. Doktorantka stwierdziła, że stosowanie preparatów z młodego jęczmienia wydaje się być bezpieczne: nie wykazała bowiem ani działania cytotoksycznego ekstraktów, ani przekroczenia najwyższych dopuszczalnych zawartości dla pierwiastków toksycznych w badanych preparatach. Doktorantka stwierdziła, że wybrane ekstrakty z młodego jęczmienia wykazują działanie ochronne, jak i naprawcze na fibroblasty skóry poddane działaniu UV poprzez: korzystny wpływ na proliferację, pobudzenie syntezy DNA, wzrost ilości komórek zatrzymanych w fazie S cyklu komórkowego, inhibicję ekspresji metaloproteinaz oraz przyspieszenie migracji komórek. Uwzględniając powyżej przedstawione efekty można stwierdzić, że mogłyby być one z powodzeniem wykorzystane w produkcji nutrikosmetyków.

Z obowiązku recenzenta muszę przedstawić kilka uchybień i słabych punktów przedstawionej do oceny dysertacji. W prezentowanej pracy, w opisie zastosowanych metod badawczych, brakuje dbałości o przedstawienie szczegółów, które pozwoliłyby na wierne ich odtworzenie przez następnych badaczy. Informacja dotycząca zastosowanych suplementów diety jest wg mnie również zbyt zawężona. W opisie wyników i ich dyskusji, podczas formowania wniosków wydaje się, iż Doktorantka z tą samą miarą traktuje preparaty z młodego jęczmienia, jak i uzyskane z nich ekstrakty, co wprowadza pewien chaos i sprawia wrażenie niedopowiedzenia. We wnioskach, w punkcie 2b Doktorantka stwierdziła, że: „produkty z młodego jęczmienia nie zawierały pierwiastków toksycznych” tymczasem oznaczone ilości nie były poniżej granicy oznaczalności/wykrywalności zastosowanej metody



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

ZAKŁAD BROMATOLOGII



analitycznej i wskazywały, iż były to niskie stężenia, nie przekraczające dopuszczalnych ustawowo najwyższych zawartości. Zgodnie z rozporządzeniami regulującymi obecność pierwiastków toksycznych w środkach spożywczych, w tym suplementach diety, stosuje się pojęcie „najwyższy dopuszczalny poziom”, a nie „normy” (Tabela IX). Czytając pracę można napotkać drobne błędy edytorskie i stylistyczne. Jednakże, chcę podkreślić, iż moje krytyczne uwagi nie wpływają na ocenę pracy, raczej stanowią wskazówkę na przyszłość.

Podsumowanie

Podsumowując uważam, iż założenia i cel pracy zostały w pełni zrealizowane, a uzyskane wyniki mogą posłużyć jako cenna informacja dla producentów kosmetyków/nutrikosmetyków o rozszerzonym spectrum działania surowców z młodego jęczmienia i w tym kontekście możliwościach ich wykorzystania w opracowywanych przez nich formulacjach produktów. Na preparaty z młodego jęczmienia warto również zwrócić uwagę pod kątem zapobiegania występowaniu niedoborów cynku, selenu i miedzi w dietach Polaków, a tym samym niwelowaniu skutków ich deficytu w organizmie, zarówno w stanie zdrowia, jak i u pacjentów z chorobami skóry, np. u pacjentów z bielactwem. Istnieje potrzeba, w ramach urzędowej kontroli, prowadzenia badań zawartości pierwiastków toksycznych w suplementach diety. Warto podkreślić, iż na możliwość występowania zanieczyszczeń Pb, Cd, Hg w badanych preparatach zwróciła uwagę również Doktorantka w swojej pracy. Na podkreślenie zasługuje praktyczny aspekt prowadzonych badań. Realizacja badań wymagała od Doktorantki szczególnego nakładu pracy, pełnego zaangażowania i odpowiednich umiejętności. Z przekonaniem stwierdzam, iż recenzowana przez mnie dysertacja spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym, zwracam się z prośbą do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Krystyny Joanny Gromkowskiej-Kępa do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK
Zakładu Bromatologii

Barbara Dobrowolska-Korczak
dr hab. n. farm. Barbara Bobrowska-Korczak