

Recenzja pracy doktorskiej pt.:

„Ocena ochronnego działania ekstraktu z młodego jęczmienia na fibroblasty skóry ludzkiej”, wykonanej przez mgr Krystynę Joannę Gromkowską-Kępka w Zakładzie Bromatologii, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem naukowym dr hab. n. farm. Renaty Markiewicz-Żukowskiej

Ocena wyboru tematu

Skóra jest zewnętrznym organem ludzkiego organizmu, który łączy w sobie liczne funkcje fizjologiczne, a jej stan czynnościowy jest wektorem ogólnego stanu zdrowia człowieka. To także jedna ze składowych szeroko pojętej definicji piękna ludzkiego ciała, w którą wpisują się nie tylko idealne proporcje ciała, piękne rysy twarzy, lecz także pozbawiona skaz i zmarszczek skóra. Nie jest zatem zaskoczeniem, że dbałość o jej wygląd zewnętrzny jest czynnością, która towarzyszy człowiekowi od zarania dziejów. Oczywiście, dostępny arsenał środków do jej pielęgnacji - na przestrzeni kolejnych epok historycznych był zróżnicowany i podlegał kanonowi piękna charakterystycznego dla danego okresu w dziejach ludzkości. Problem szerokiej gamy środków upiększających nabrał szczególnego znaczenia na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci z uwagi na ogromną ilość, dostępnych na rynku środków kosmetycznych, dokonywanych w gabinetach kosmetycznych zabiegów upiększających oraz modą na całoroczną „piękną letnią opaleniznę”. Konsekwencją są zaburzenia funkcji fizjologicznych tego narządu, prowadzące do niespotykanego w historii medycyny rozwoju chorób skóry. Problem ten potęgują, zanieczyszczenie środowiska naturalnego oraz niewłaściwy styl życia, którego składową jest między innymi niewłaściwy sposób żywienia. Indukowana postępującą cywilizacją, szczególnie niekorzystna jest ta pierwsza składowa, niszcząca warstwę ozonową, i w konsekwencji silniejsze oddziaływanie promieniowania UV przyspieszającego procesy starzenia, wywołującego liczne choroby skóry, indukującego kancerogenezę. Problem dodatkowo komplikuje cała gama środków kosmetycznych, których celem jest ochrona przed promieniowaniem UV-A i UV-B. Działając z jednej strony ochronnie, z drugiej mogą nasilać reakcje fotoalergiczne.

W świetle powyższych faktów podejmowanie działań zmierzających do pozyskiwania nowych, bezpiecznych preparatów kosmetycznych, wydaje się w pełni uzasadnione. Tę drogę wybrała również Doktorantka, która pod kierunkiem naukowym dr hab. Renaty Markiewicz-Żukowskiej, podjęła się ambitnego zadania, dotyczącego oceny przydatności młodych części

liściowych jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L) pod kątem bezpiecznego i skutecznego działania fotoprotekcyjnego. Wybór tematu pracy doktorskiej nie został dokonany przypadkowo, lecz poprzedziła go dogłębna analiza piśmiennictwa z tego zakresu, wskazująca na brak prac z tego obszaru badań.

Ocena układu redakcyjnego pracy

Rozprawa doktorska mgr Krystyny Joanny Gromkowskiej-Kępka jest opracowaniem obejmującym 152 strony maszynopisu. Przedstawiona do oceny dysertacja została napisana w sposób zgodny z ogólnymi wymogami, przyjętymi w tego typu opracowaniach. Proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami pracy nie budzą zastrzeżeń. Praca jest napisana językiem komunikatywnym, a drobne błędy logiczne i stylistyczne występują rzadko. Problematyka badawcza została opisana w sposób wyczerpujący. Układ redakcyjny pracy obejmuje 12 rozdziałów – zróżnicowanych tematycznie i objętościowo. Obejmują one: wstęp – będący przeglądem piśmiennictwa naukowego z zakresu prowadzonych badań, cel pracy – zawierający pytania badawcze, materiał i obszerną metodykę – uwzględniającą przygotowanie ekstraktów, oznaczanie zawartości składników mineralnych i metali ciężkich, związków polifenolowych, całkowitego statusu antyoksydacyjnego oraz aktywności biologicznej ekstraktów z młodego jęczmienia, wyników badań, ich omówienia i dyskusji, wniosków, streszczeń w języku polskim i angielskim, piśmiennictwa, wykazu tabel i rycin. Całość poprzedzona jest wykazem skrótów. Praca zawiera łącznie 15 tabel – przy czym tabele 1 do 6 zostały zamieszczone w części teoretycznej pracy oraz metodyce badań, kolejne – 7 do 15 zamieszczono w rozdziale Wyniki. Rozdział ten zawiera również 13 rycin, na których zaprezentowano wyniki badań. Zarówno tabele jak i ryciny zostały zaprojektowane w sposób prawidłowy, a ich estetyka jest na najwyższym poziomie. Pewne wątpliwości recenzenta, budzą tabele 10 do 15, które wyłamują się z tradycyjnego charakteru tabeli wynikowej, i nie do końca zgadzam się z takim rozwiązaniem. Oczywiście, fakt ten nie obniża wartości praktycznych i poznawczych przeprowadzonych badań, a dotyczy jedynie formy prezentowania wyników badań. Omawiając układ redakcyjny dysertacji, z obowiązku recenzenta, chciałbym jeszcze zwrócić uwagę na kilka kwestii, które nie mają charakteru merytorycznego, lecz redakcyjny, i nie wpływają na ostateczną ocenę pracy. Dla recenzenta niezrozumiałe jest pozbawienie części teoretycznej pracy jakichkolwiek elementów graficznych, które będąc dopełnieniem tekstu, w istotny sposób ułatwiają jego percepcję. Wydaje się również, że rozdział 1.2. zyskałby na przejrzystości, gdyby był inaczej zredagowany, a niektóre fragmenty z dyskusji wyników z powodzeniem mogłyby wzbogacić część teoretyczną dysertacji. Warto pamiętać, że zdań nie rozpoczynamy od akronimów (str. 10, 19, 25, 28...), we wzorach chemicznych (str. 20, 21, 34), należy wykorzystać dostępny w każdym edytorze tekstu tzw. „indeks dolny”, wzory na obliczanie % błędu oraz współczynnika zmienności, nie mają opisów (str. 54, 55). Dla recenzenta, niezrozumiałe jest również sformułowanie „fotodermatozy o podłożu immunologicznym (idiopatyczne) – str. 22. Idiopatyczny – to znaczy mający nieznaną przyczynę. Wydaje się również, że niewielkich poprawek redakcyjnych wymagają tabele VII (wartość współczynnika zmienności dla Se) oraz tabela IX (zamiast „norma dla Cd, Pb, Hg, lepiej byłoby użyć zwrotu „najwyższa dopuszczalna zawartość”). Niezbyt dobrze wygląda również tabela VIII z nieuporządkowanymi miejscami dziesiętnymi. Słownik terminów można by było uzupełnić wykazem skrótów pojawiających się

w dysertacji – np. GAG, PG, UVA, UVB). Należy podkreślić, że będący przedmiotem dysertacji, szeroki zakres badań, w sposób oczywisty komplikuje opracowanie obszernego materiału badawczego. W konkluzji należy jednak stwierdzić z całą stanowczością, że Doktorantka bardzo dobrze poradziła sobie z opracowaniem poszczególnych części pracy. Zarówno pod względem formy, jak i treści dysertacja prezentuje sobą opracowanie tworzące zwartą logiczną całość.

Bibliografia i znajomość omawianej przez Doktorantkę problematyki

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera bardzo obszerną, obejmującą 268 pozycji piśmiennictwa bibliografię, która została starannie dobrana i wyselekcjonowana ze zbiorów światowego piśmiennictwa i uzupełnioną z uwagi na specyfikę tematu badań – stosownymi rozporządzeniami. W większości (około 90 % ogółu cytowanych prac), to pozycje zagraniczne, uzupełnione wybranymi pracami polskojęzycznymi. Co ciekawe – piśmiennictwo jest praktycznie pozbawione odnośników do stron internetowych (tylko dwa niezbędne „wejścia”). W opinii recenzenta, podnosi to wartość bibliograficzną dzieła, bowiem zgodnie z zasadami *evidence base medicine/nutrition...*, tylko wyniki badań opartych na wiarygodnych, aktualnych i istotnych faktach, spełniają wymogi EBM. Niestety, strony internetowe, najczęściej są pozbawione tych cech. Na uwagę zasługuje fakt, że 3/4 ogółu cytowanych prac pochodzi z ostatniej dekady. To niewątpliwy sygnał, potwierdzający aktualność i celowość podjętej problematyki badawczej. To także wyraz dbałości Doktorantki o zapewnienie sobie wszechstronnej wiedzy w zakresie realizowanego zadania badawczego. Sprawdzeniem tej wiedzy jest dobrze zredagowany wstęp – będący *de facto* częścią teoretyczną pracy. Należy podkreślić, że zawartość treściowa poszczególnych podrozdziałów, nie jest przypadkowa, i w sposób celowy wprowadza w istotę problemu ochrony skóry przed promieniowaniem UV. Oczywiście, poprzedzają go podstawowe informacje dotyczące budowy i funkcji skóry oraz czynników wewnątrz- i zewnątrzpochodnych wpływających na skórę. Należy podkreślić logiczny układ części teoretycznej – od ogółu do szczegółu. Bazę stanowią podstawowe informacje związane z budową i fizjologią skóry. Kolejne dwa rozdziały charakteryzują wybrane czynniki patogenetyczne – ze szczególnym zwróceniem uwagi na promieniowanie UV oraz opis metod ochrony skóry przed tym promieniowaniem. Fragmentem finalnym części teoretycznej jest rozdział opisujący pod względem farmakognostycznym, a może lepiej „funkcyjnym”, młode części liściowe rośliny jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.), będącego przedmiotem badań Doktorantki. Na kanwie tych informacji, przekonująco brzmi uzasadnienie podjętych przez Doktorantkę badań – cytując za Doktorantką „... kontrowersje związane ze stosowaniem produktów fotoochronnych stały się bodźcem do poszukiwań alternatywnych filtrów, np. pochodzących ze źródeł roślinnych....”. Podsumowując część teoretyczną należy podkreślić, że Doktorantka wykazała dobrą znajomość piśmiennictwa naukowego związanego tematycznie z szeroko pojętą problematyką wpływu czynników wewnętrznych, jak i zewnętrznych na stan czynnościowy skóry.

Ocena merytoryczna pracy

Dobrze napisany – z zachowaniem umiaru, zarówno pod względem treści jak i formy wstęp, wprowadza czytelnika w istotę podjętych przez Doktorantkę badań. Nadrzędnym celem badawczym była cyt. *explicite* „ocena ochronnego działania ekstraktów z młodego

jęczmienia na fibroblasty skóry ludzkiej poddane działaniu promieniowania UV". Szczegółowe cele zostały opisane pod postacią sześciu zadań badawczych dotyczących: oceny potencjału antyoksydacyjnego i składu pierwiastkowego ekstraktów z młodego jęczmienia, oceny cytotoksyczności, wpływu na biosyntezę DNA, na cykl komórkowy fibroblastów, wpływu ekstraktów na migrację fibroblastów oraz aktywność MMP-2 oraz MMP-9. Precyzyjnie ujęte cele szczegółowe wręcz proszą się o sformułowanie ich pod postacią hipotez badawczych. Oczywiście, uwaga ta nie dotyczy pierwszego zadania badawczego, które w opinii recenzenta powinno mieć charakter drugoplanowy. Taki układ celów badawczych wyakcentowałby w sposób bardziej wyrazisty osiągnięcia Doktorantki w aspekcie walorów praktycznych i poznawczych przeprowadzonych badań.

Sformułowane w pytaniach badawczych cele, stały się podstawą do przeprowadzenia eksperymentu badawczego i uzyskania wyników badań, na podstawie których przeprowadzono ich analizę, dyskusję i przedstawiono wnioski końcowe. Uwagę zwraca ciekawie zaprogramowana metodyka badań, która w zależności od obszaru poszukiwań Doktorantki została ukierunkowana głównie na uzyskanie jak najbardziej wiarygodnych, rzetelnych i obiektywnych wyników. Materiał badawczy stanowiły ekstrakty wodne, metanolowe, etanolowe oraz PBS-owy (buforowana fosforanem sól fizjologiczna), sproszkowanych soków z młodego jęczmienia, sproszkowanej trawy jęczmiennej oraz chlorofilu – dostępnych pod postacią suplementów diety. Zawartość składników mineralnych (Zn, Cu, Se) oraz metali ciężkich (Cd, Hg, Pb) oznaczono metodą atomowej spektroskopii absorpcyjnej, zawartość związków polifenolowych (TCP) i całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) – metodą spektrofotometryczną. Aktywność biologiczną ekstraktów z młodego jęczmienia przeprowadzono w modelu hodowli komórkowej *in vitro*, w trzech układach doświadczalnych: bez UV (kontrola), po 24-godzinnej inkubacji komórek badanymi ekstraktami (UV 24h – ocena działania ochronnego ekstraktów) oraz UV 0h – ekstrakty dodano po 24 godzinnej ekspozycji na promieniowanie UV (ocena właściwości naprawczych ekstraktów). Cele szczegółowe osiągnięto wykorzystując: test MTT do oceny toksyczności, metodę radioizotopową do pomiaru wbudowywania znakowanej trytem tymidyny do DNA – wpływ ekstraktów na biosyntezę DNA, metody obrazowej – wpływ ekstraktów na cykl komórkowy fibroblastów, metodę zymografii żelatynowej – wpływ ekstraktów na ekspresję metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9) oraz „scratch testu” – wpływ ekstraktów na migrację komórek fibroblastów skóry ludzkiej. Umieszczenie w recenzji powyższego „metodycznego” fragmentu nie jest przypadkowe, bowiem w opinii recenzenta, zastosowana metodyka badawcza została dobrana w sposób przemyślany, zoptymalizowany na uzyskanie kompleksowej odpowiedzi na postawione pytania badawcze. Nie mijając się z prawdą, można zaryzykować twierdzenie, że zastosowane procedury badawcze, mogą być wzorem dla prowadzenia podobnych badań. Szkoda jedynie, że tak szeroko zaprogramowane badania nie zostały udokumentowane schematem badań. Zakres analizowanych parametrów jest imponujący, co świadczy o pracowitości i dociekliwości naukowej Doktorantki, jednakże z drugiej strony, ta mnogość zmiennych utrudnia interpretację i dyskusję wyników.

Uzyskane wyniki badań mają zarówno aspekty poznawcze jak i praktyczne. Co prawda, w piśmiennictwie z tego zakresu można znaleźć prace, które wskazują na korzystne działanie preparatów z młodego jęczmienia na stan czynnościowy skóry, jednakże badanie ich wpływu

na fibroblasty skóry ludzkiej ma charakter unikatowy. Wstępna dwuetapowa „selekcja ekstraktów” (I etap – ubogi profil antyoksydacyjny, wysoka zawartość Pb, II etap – ocena cytotoksyczności), do dalszych etapów badań nad wpływem ekstraktów z młodego jęczmienia na fibroblasty skóry ludzkiej linii NHSF w badaniach *in vitro* z zastosowaniem promieniowania UV wybrano ekstrakty: 70% etanolowy ekstrakt z trawy jęczmiennej (A.4) oraz PBS-owy z soku z młodego jęczmienia (E.2). Kluczowym osiągnięciem dokonań badawczych Doktorantki było wykazanie, że zarówno A.4 jak i E.2 powodują wzrost przeżywalności i przyspieszenie migracji fibroblastów oraz wzrost biosyntezy DNA (model UV 24h – ochronne działanie) w sytuacji oddziaływania na nie promieniowania UV w dawce 25mJ/cm². Wykazano również hamujący wpływ A.4 i E.2 na aktywność metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 (za wyjątkiem E.2 w dawce 25 µg/ml), a także wzrost ilości komórek w fazie S cyklu komórkowego. Powyższe wyniki wskazują zatem na działanie zarówno ochronne jak i naprawcze w stosunku do fibroblastów poddanych działaniu promieniowania UV. Wyniki te potwierdzają potencjalne właściwości fotoprotekcyjne preparatów zawierających młody jęczmień i otwierają drogę do dalszych badań. Cennym uzupełnieniem przeprowadzonych przez Doktorantkę badań jest także ocena właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów poszerzona o zawartość pierwiastków Zn, Cu, Se, które odgrywają istotną rolę w zachowaniu równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej organizmu oraz określenie zawartości metali ciężkich (Cd, Pb, Hg). Badania tego typu, w odniesieniu do tego suplementu, nie zostały dotychczas przeprowadzone. Wykazały one, że badane ekstrakty z młodego jęczmienia charakteryzują się wysoką zawartością polifenoli, całkowitym statusem antyoksydacyjnym, są źródłem cynku, miedzi i selenu i niskim poziomem zanieczyszczeń metalami ciężkimi (Pb, Cd, Hg).

Na podkreślenie zasługuje również fakt, że wszystkie uzyskane w trakcie badań wyniki, poddano analizie statystycznej i oceniono istotność różnic pomiędzy poszczególnymi analizowanymi zmiennymi, stosując odpowiednie testy. Dobór metod analizy statystycznej wskazuje na dobrze opanowaną przez Doktorantkę umiejętność krytycznej analizy wyników badań, opartą na wnioskowaniu statystycznym. Podsumowaniem wyników badań, są wnioski, sformułowane prawidłowo, odzwierciedlają wyniki poszczególnych etapów badań i nie wykraczają poza ich zakres.

Podsumowanie

Uważam, że przedstawiona do oceny praca jest wartościowym opracowaniem, na który składają się: sposób przygotowania i opracowanie teoretyczne tematu, staranne zaplanowanie eksperymentu, przeprowadzenie badań w oparciu o nowoczesną metodykę oraz interpretacja uzyskanych wyników badań. Doktorantka wykazała dobre przygotowanie teoretyczne i praktyczne. Uzyskane wyniki badań mają zarówno wartości poznawcze jak i praktyczne i mogą stanowić podstawę do dalszych badań w tym zakresie. Stwierdzam, że mgr Krystyna Joanna Gromkowska-Kępka zrealizowała założone cele pracy, odpowiadając na wszystkie pytania badawcze. Pracę oceniam wysoko pod względem merytorycznym, zarówno biorąc pod uwagę rangę analizowanego problemu, jak i umiejętności związane z przygotowaniem i realizacją tak obszernych badań, a także interpretacją wyników badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje umiejętność wielopłaszczyznowego podejścia do

założonego problemu badawczego. Zawarte w recenzji uwagi mają charakter głównie redakcyjny i nie mają wpływu na ocenę końcową przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej.

W konkluzji stwierdzam, że rozprawa doktorską mgr K. J. Gromkowskiej-Kępka pt. „Ocena ochronnego działania ekstraktu młodego jęczmienia na fibroblasty skóry ludzkiej” , spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789).

W związku z powyższym wnoszę do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Krystyny J. Gromkowskiej-Kępka do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Proszę o rozważenie możliwości wyróżnienia pracy



Juliusz Przysławski