

Prof. dr hab. Monika Wujec

Lublin, 24.09.2019

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Wyszkwowskiej-Kolatko wykonanej w Zakładzie
Biochemii Farmaceutycznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego
Collegium Medicum w Krakowie

Ostatnie dziesięciolecie to czas bardzo intensywnego rozwoju branży kosmetycznej w Polsce. Wartość polskiego rynku kosmetycznego w 2016 roku wyniosła 16 mld zł, podczas gdy w 2002 roku było to zaledwie 9 mld zł. Polska jest szóstym rynkiem kosmetyków w Europie i rośnie najszybciej. Prognozowana wartość rynku kosmetycznego w Polsce w 2021 roku wynosi 20 mld zł. Rynek kosmetyków naturalnych rośnie szybciej niż cały rynek kosmetyczny. Ponad 30 proc. konsumentów oczekuje, że kosmetyki będą robione tylko z wykorzystaniem substancji naturalnych. Wynika stąd ciągła potrzeba poszukiwania nowych, skutecznych związków pochodzenia naturalnego. Obserwując ilość publikacji dotyczących badań nad surowcami roślinnymi, ich składem i działaniem można przypuszczać, że wszystko zostało już opisane. Nic bardziej mylnego. Dzięki ciągłemu rozwojowi metod analitycznych istnieje możliwość dogłębnej analizy znanych już surowców i nie dziwi fakt pojawiania się starych-nowych roślin jako rezerwuaru związków biologicznie aktywnych. Świat roślin jest niezwykle bogaty, niestety zbyt lekkomyślne wykorzystywanie surowców roślinnych może prowadzić do całkowitego zniszczenia arealu gatunków rzadkich. Należy poszukiwać w takich przypadkach możliwości pozyskiwania surowca ze źródeł innych niż naturalne.

Ten kierunek leży w moim odczuciu u podstaw przedstawionej do oceny pracy doktorskiej.

Rozprawa mgr Magdaleny Wyszkwowskiej-Kolatko opracowana jest w sposób klasyczny. Zawiera wstęp, założenia i cel pracy, opis stosowanych metod i materiałów, omówienie wyników, dyskusję, podsumowanie i wnioski końcowe.

W części wprowadzającej autorka przedstawia charakterystykę wąkroty azjatyckiej, która to jest bohaterką wszystkich wykonanych badań oraz przegląd literatury na temat właściwości

biologicznych wyciągów wykorzystywanych w preparatach kosmetycznych i dermatologicznych jak również głównych składników *Centella asiatica*.

Jako główny cel pracy mgr Magdalena Wyszowska-Kolatko wskazuje ocenę aktywności biologicznej surowca naturalnego w postaci wodnych wyciągów z rośliny *Centella asiatica*. Ponadto, badaniom poddano 2 saponiny: azjatykozyd i madekasozyd, opisane jako główne składniki aktywne wąkroty azjatyckiej. Do badań użyto wyciągi z rośliny pochodzącej ze stanowiska szklarniowego oraz z hodowli *in vitro*. W tym miejscu nasuwa się pytanie: czy wynika to z ograniczonej dostępności wąkroty azjatyckiej ze stanowisk naturalnych czy też jest to celowe działanie, mające na celu stwierdzenie w jakim stopniu hodowla jest w stanie zaspokoić potrzeby rynku kosmetycznego na dany surowiec roślinny? Wiadomym jest, iż stresowanie roślin możliwe w warunkach hodowlanych często powoduje zwiększenie ilości poszczególnych związków chemicznych w ekstraktach. Znane są przypadki wykorzystywania tego typu procedur celem otrzymania roślin o pożądanych właściwościach. Można tutaj chociażby wspomnieć badania nad wpływem strontu na produkcję fitoestrogenów w różnych gatunkach soi.

W założeniach pracy Autorka wskazuje na konieczność stosowania alternatywnych metod badania składników kosmetyków wobec zakazu testowania ich na zwierzętach. Stąd cele badawcze realizowano stosując metody alternatywne *in vitro*.

Zbadano wpływ wodnych wyciągów oraz azjatykozydu i madekasozydu na żywotność sześciu linii komórkowych: 3 linii komórek prawidłowych (fibroblasty i keratynocyty skóry ludzkiej i astrocyty) oraz 3 linii komórek nowotworowych (czerniak skóry A375, czerniak skóry przerzut z płuca WM793 i nowotwór wątroby HepG2). Dobór tych właśnie linii komórkowych jest zasadny i daje możliwość stwierdzenia selektywności działania badanych wyciągów. Testowane wyciągi oraz 2 saponiny były bezpieczne w stosunku do fibroblastów, a co więcej stymulowały proliferację fibroblastów, szczególnie wyciąg rośliny szklarniowej, co jest efektem niezwykle pożądanym w kosmetykach. Kolejno określono wpływ wyciągów i saponin na aktywność migracyjną keratynocytów w teście zarastania rany *in vitro*. Stwierdzono iż zdecydowanie lepszą aktywnością charakteryzował się wyciąg z rośliny szklarniowej, ale tylko w stężeniach niższych tj. 100µg/ml. Linia astrocytów posłużyła Doktorantce do badania właściwości glioprotekcyjnych wyciągów z wąkroty azjatyckiej. Znaczące podniesienie żywotności astrocytów indukowanych doksorubicyną zaobserwowano po preinkubacji komórek zarówno wyciągami, jak i azjakozydem i madekasozydem. Spośród

linii komórek nowotworowych najbardziej wrażliwą na badane wyciągi okazała się linia czerniaka skóry przerzut z płuca WM793. Oba testowane wyciągi działały selektywnie cytotoksycznie w stosunku do komórek tej linii i komórek prawidłowych. Kolejnym przeprowadzonym badaniem była ocena aktywności antyoksydacyjnej, istotnej dla działania przeciwstarzeniowego kosmetyków. Wykonano trzy testy: test DPPH, test FRAP oraz test ROS-Glo H₂O₂. Stwierdzono, iż oba testowane wyciągi wodne były obdarzone zdolnością dezaktywacji wolnego rodnika tlenowego jednak w zdecydowanie mniejszym stopniu niż substancja referencyjna. Także wyciąg z rośliny pozyskanej z hodowli *in vitro* charakteryzował się silniejszą zdolnością do redukcji reaktywnych form tlenu. Zbadano również aktywność mutagenną w teście Ames przy zastosowaniu dwóch różnych szczepów *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały, iż żaden z wyciągów nie był obdarzony aktywnością mutagenną. Oszacowano aktywność fotoprotekcyjną wyciągów z *Centella asiatica* oraz azjatykozydu i madekasozydu. Udowodniono, iż oba wyciągi wodne całkowicie absorbują promieniowanie UV w zakresie promieniowania UVB i UVA2 oraz częściowo UVA1, co daje możliwość zastosowania ich jako bezpieczne (brak działania mutagennego) filtry przeciwsłoneczne. Cera dojrzała jest przede wszystkim mało elastyczna, sucha, szara, pomarszczona i zmęczona, często również pojawiają się na niej przebarwienia. Chcąc uzupełnić panel badań nad wyciągami mogącymi być składnikiem kosmetyku przeciwstarzeniowego Doktorantka zbadła wpływ wyciągów i saponin na aktywność tyrozynazy. Żaden z testowanych wyciągów ani też azjatykozyd i madekasozyd nie blokowały powstawania melaniny.

Podsumowując, jako że wążkrota azjatycka jest rośliną wykorzystywaną głównie w przemyśle kosmetycznym prezentowane badania są skoncentrowane przede wszystkim na ocenie właściwości istotnych z punktu widzenia kosmetologa. Oczywiście to nie jest cały potencjał tego surowca roślinnego - wiele badań zostało już wykonanych, ale sądzę, że dużo jeszcze można zrobić. Chciałabym w tym miejscu podzielić się spostrzeżeniem iż w mojej opinii byłoby bardzo ciekawe porównanie aktywności uzyskanych przez Doktorantkę wyciągów z właściwościami wyciągu z rośliny pozyskanej ze stanowiska naturalnego.

Doktorantka włożyła wiele pracy w przygotowanie rozprawy doktorskiej. Jest ona bardzo obszerna. Liczy 176 stron. Oparta jest na 143 pozycjach literaturowych. Napisana jest bardzo przejrzysto, a odniesienia w tekście do rysunków i tabel są przy takiej liczbie wykonanych badań ogromną pomocą. Przeczytawszy podziękowania na początku pracy stwierdziłam, iż

mgr Magdalena Wyszowska-Kolatko uczestniczyła w większości opisanych badań. Jest to godne podziwu a jednocześnie bardzo dobrze rokujące na przyszłość dla Doktorantki, czy to w aspekcie kariery naukowej czy też właścicielki firmy kosmetycznej.

Kończąc, chciałabym zwrócić uwagę na pewne sformułowanie, które było dla mnie niezrozumiałe. Mianowicie:

na stronie 140 doktorantka pisze : „(...)efekt działania samego madekasozydu był silniejszy niż w przypadku całego ekstraktu..... Wynik ten wskazuje i potwierdza synergizm działania różnych składników...” Będę prosiła Autorkę podczas publicznej obrony o doprecyzowanie powyższego stwierdzenia.

Reasumując, rozprawę doktorską oceniam wysoko przede wszystkim z uwagi na wartość praktyczną uzyskanych wyników, spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wobec tego mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Wyszowskiej-Kolatko do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz nadanie jej tytułu doktora nauk farmaceutycznych.

Kierownik
Katedry Zakładu Chemii Organicznej

Prof. dr hab. Monika Wujec