UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Zakład Biotechnologii
15-089 Białystok, ul. Kilińskiego 1
Tel. (85) 748-57-01, FAX (85) 879-57-18
Anna.Bielawska@umb.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm. Anna Bielawska **Białystok, 14. 04. 2022**

Ocena pracy doktorskiej mgr Justyny Popiół pt. "Badania nad nowymi związkami o aktywności fotoprotekcyjnej w grupach pochodnych ksantonu i 5-arylidenohydantoiny"

Ludzkość od wieków chroniła się przed słońcem i jego skutkami, ale dopiero w połowie ubiegłego wieku Austriak Franz Greiter, Amerykanin Benjamin Green i Francuz Eugène Schueller opracowali nowoczesny filtr przeciwsłoneczny. Podczas gdy Schueller wprowadził „Ambre Solaire" w 1936 r., produkty Greiter's i Green's stały się dostępne na rynku odpowiednio w 1946 i 1956 r. W ciągu następnych dziesięcioleci niezwykłe postępy w biologii skóry, fotobiologii i epidemiologii nowotworów skóry doprowadziły do lepszego zrozumienia roli różnych długości fal w fotokarcynogenezie, fotostarzeniu i fotodermatozach. Jednym z ważnych odkryć było to, że zarówno promienie UVB, jak i UVA mogą uszkadzać ludzką skórę, w wyniku czego opracowano filtry przeciwsłoneczne o szerokim spektrum działania, które zapewniają ochronę przed promieniowaniem UVB i UVA.
W związku z tym należy pamiętać o stosowaniu kosmetyków zawierających filtry UV, chroniących organizm ludzki przed szkodliwym działaniem promieni słonecznych. Obecnie na rynku kosmetycznym dostępne są preparaty zawierające dwa rodzaje filtrów UV: filtry chemiczne, pochłaniające promieniowanie UV i zamieniające je w energię cieplną oraz filtry fizyczne, których odpowiednio rozdrobnione cząstki odbijają promieniowanie. Do receptury preparatów fotoprotekcyjnych, oprócz syntetycznych filtrów UV, coraz częściej wprowadza się składniki pochodzenia naturalnego, które posiadają zdolność pochłaniania promieniowania UV. Ważną rolę odgrywają również wtórne substancje promieniochronne, tj. przeciwutleniacze. Stosuje się je w celu neutralizacji wolnych rodników, powstających pod wpływem promieniowania UV, czego wynikiem jest ograniczenie uszkodzeń skóry. Poważne

problemy pojawiły się wraz z doniesieniami naukowymi dotyczącymi niekorzystnego działania obecnie stosowanych filtrów UV na organizm ludzki jak i na środowisko.

Filtry przeciwsłoneczne zostały początkowo opracowane w celu ochrony przed oparzeniami słonecznymi, czyli ostrymi uszkodzeniami wynikającymi z ekspozycji na światło słoneczne. Gdy zrozumiano związek między ekspozycją na słońce a nowotworami skóry, stosowanie filtrów przeciwsłonecznych stało się również ważną częścią ogólnej strategii zapobiegania nowotworom skóry. Znaczenie stosowania filtrów przeciwsłonecznych w zapobieganiu nowotworom skóry, zwłaszcza rakowi płaskonabłonkowemu, jest jednoznaczne, o czym świadczą liczne badania. Filtry przeciwsłoneczne również skutecznie w zapewniają ochronę przed dyspigmetacją wywołaną promieniowaniem UV, fotostarzeniem i fotodermatozą. Fotoochrona i stosowanie filtrów przeciwsłonecznych są zatem promowane w kampaniach na rzecz zdrowia publicznego jako część zdrowych zachowań związanych z ekspozycją na słońce. Wraz z nadejściem globalnego ocieplenia i związanym z tym wzrostem liczby bardzo słonecznych, długotrwałych okresów pogodowych na całym świecie, rozwój ten prawdopodobnie będzie kontynuowany, co sprawi, że fotoochrona i regularne stosowanie filtrów przeciwsłonecznych będzie jeszcze ważniejsze i coraz powszechniejsze. Jednak ostatnie lata przyniosły również wzrost kontrowersji dotyczących bezpieczeństwa i skuteczności filtrów przeciwsłonecznych. Szczególnie wraz z nadejściem ery Internetu i mediów społecznościowych konsumenci są regularnie bombardowani informacjami, które nie zawsze są uzasadnione naukowo. Stwarza to ryzyko, że część populacji może zakwestionować rzeczywistą potrzebę stosowania filtrów przeciwsłonecznych i zakwestionować ich bezpieczeństwo. W przypadku braku jasnego przekazu, konsumenci mogą zdecydować o zaprzestaniu stosowania preparatów zawierających filtry przeciwsłoneczne, co prowadzi do wzrostu liczby osób, które nie są odpowiednio chronione przed narażeniem na promieniowanie słoneczne. W związku z tym środowiska naukowe w ramach swojej roli społecznej są obligowane do udzielenia opartych na dowodach odpowiedzi na pytania związane z filtrami przeciwsłonecznymi oraz zalecać odpowiednie środki fotoochronne. Ponadto nowoczesne filtry przeciwsłoneczne podlegają stałemu postępowi technologicznemu w zakresie ich skuteczności i bezpieczeństwa. Rzetelne badania powinny także wskazać na słabości i ograniczenia obecnie stosowanych filtrów przeciwsłonecznych.

W świetle przytoczonych faktów wybór tematu pracy doktorskiej mgr Justyny Popiół pt. "Badania nad nowymi związkami o aktywności fotoprotekcyjnej w grupach pochodnych ksantonu i 5-arylidenohydantoiny" jest istotny, aktualny i interesujący, o dużych walorach aplikacyjnych i praktycznych. Układ przedstawionej do recenzji pracy jest typowy dla

rozpraw doktorskich, z podziałem na rozdziały: wprowadzenie, założenia i cel pracy, badania własne, podsumowanie i wnioski, część doświadczalną, literaturę, wykaz zastosowanych skrótów i symboli, wykaz tabel, wykaz rycin, streszczenie w języku polskim i angielskim. Rozprawa doktorska mgr Justyny Popiół liczy 156 stron tekstu, w których zawartych jest 31 rycin i 24 tabel. Tabele i rysunki umieszczono w tekście, co znacznie ułatwia korzystanie z nich w czasie czytania. Doktorantka posługuje się piękną polszczyzną, precyzyjnym, zwięzłym językiem naukowym, swobodnie poruszając się w terminologii omawianych zagadnień, co powoduje, że dysertację czyta się przewybornie. Zwraca uwagę wielka staranność graficzna i edytorska pracy. Piśmiennictwo liczy 233 pozycje literaturowe z ostatnich lat i jest właściwie dobrane i cytowane.

We wstępie pracy Doktorantka perfekcyjnie wprowadza czytelnika w tematykę dysertacji prezentując informacje szeroko naświetlające zakres tematyczny podjętych badań. W rozdziałach tych Autorka omawia zagadnienia dotyczące organicznych filtrów UV, ich fotostabilności, działania fototoksycznego oraz fotoalergicznego. Jeden z rozdziałów wstępu poświęcony jest bezpieczeństwu stosowania organicznych filtrów UV. Ostatnio pojawia się dużo publikacji naukowych dotyczących niekorzystnego działania filtów UV, ich wpływie na układ endokrynny, czy też działaniu cytotoksycznym. Autorka dysertacji przytacza szereg badań literaturowych wskazujących na wpływ stosowanych filtrów UV na pojawienie się zaburzeń endokrynologicznych oraz rozrodczych u ludzi. Kremy stosujemy na duże powierzchnie skóry, umożliwiając bardziej intensywne wchłanianie filtrów UV do krążenia ogólnego. Pojawia się ponadto wiele doniesień na temat negatywnego wpływu filtrów UV na środowisko i bardzo złej kondycji naturalnych ekosystemów. W ostatnich latach przykłada się szczególną uwagę do oceny bezpieczeństwa zarówno znanych składników kosmetyków jak i innowacyjnych substancji, kandydatów do zastosowania w preparatach, aby zapewnić właściwe bezpieczeństwo użytkownikom kosmetyków jak i środowisku naturalnemu.

Celem pracy doktorskiej mgr Justyny Popiół pt. "Badania nad nowymi związkami o aktywności fotoprotekcyjnej w grupach pochodnych ksantonu i 5-arylidenohydantoiny" było zaprojektowanie i synteza bądź resynteza związków w grupach pochodnych ksantonu i 5-arylidenohydantoiny o wysokiej skuteczności absorpcji promieniowania UV, jako potencjalnych i bezpiecznych substancji promieniochronnych.

Praca doktorska obejmuje projektowanie i syntezę kilkudziesięciu nowych pochodnych ksantonu i (*Z*)-5-arylidenohydantoiny. Otrzymane związki **1–17** łączą w sobie ugrupowanie ksantonu oraz resztę kwasu (*E*)-cynamonowego. Zaprojektowane struktury oprócz dwóch chromoforów zawierają także liczne auksochromy położone zarówno w pierścieniu

fenylowym, jak i w układzie ksantonu. Pochodne ksantonu od wielu lat są przedmiotem wielokierunkowych badań prowadzonych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM pod kierunkiem znakomitego światowej sławy naukowca prof. dr hab. Henryka Marony, następnie kontynuowane przez wybitne naukowczynie: Prof. Elżbietę Pękalę i promotorkę recenzowanej rozprawy doktorskiej – dr hab. Agnieszkę Gunia-Krzyżak. Wiele z tych związków cechuje korzystny profil aktywności biologiczno-farmakologicznej, w tym m.in. działanie antyoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnowotworowe, przeciwpadaczkowe i przeciwzapalne.

Kolejne związki **18** – **30** zaprojektowano w oparciu o strukturę 3-benzylidenokamfory, w której fragment kamfory został zastąpiony resztą hydantoiny. Zmiany strukturalne miały na celu poprawę profilu bezpieczeństwa finalnych związków. Modyfikacje strukturalne polegające na wprowadzeniu podstawników zarówno do reszty hydantoiny, jak i pierścienia fenylowego oraz wydłużenie linkera poprzez wprowadzenie grupy allilowej miały na celu modyfikację właściwości fizykochemicznych oraz fotoprotekcyjnych związków. Wszystkie uzyskane związki poddano szczegółowym badaniom fizykochemicznym. Obejmowały one oznaczenie temperatury topnienia oraz ocenę lipofilowości. Strukturę związków potwierdzono za pomocą spektroskopii protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego ^{1}H NMR. Celem ustalenia czystości związków wykonano chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (LC-MS). Dla wybranych związków przeprowadzono także badania krystalograficzne. Wszystkie związki poddano przesiewowym badaniom absorpcji promieniowania ultrafioletowego w roztworach. Na podkreślenie zasługuje fakt, że badane substancje pochłaniają promieniowanie w zakresie 290 – 400 nm tj. UVB i UVA, a właściwości absorpcyjne niektórych z nich przewyższały komercyjnie stosowane filtry UV, co do zakresu oraz intensywności absorpcji. W kolejnym kroku dokonano oceny skuteczności fotoprotekcyjnego działania w warunkach przyszłego zastosowania wybranych, najbardziej obiecujących (*E*)-cynamoilowych pochodnych ksantonu oraz wszystkich otrzymanych pochodnych (*Z*)-5-arylidenohydantoniy w oparciu o zmodyfikowaną europejską normę EN ISO 24443:2012. W celu uzyskania odpowiednich do badań formulacji, zbadano rozpuszczalność uzyskanych związków w rozpuszczalnikach stosowanych w produktach kosmetycznych. Interesujące wyniki uzyskano dla formulacji zawierającej związek **9** w stężeniu 12,5%, gdzie wartość współczynnika SPF *in vitro* wyniosła 19,69 ± 0,46 i była najwyższa z grupy badanych związków, natomiast wartość wskaźnika ochrony UVA wyniosła

12,64 ± 0,32. Formulacja zawierająca związek **9** charakteryzowała się także wysokimi wartościami krytycznej długości fali (381 nm) oraz stosunku UVA/UVB (0,830).

Dodatkowo dla wybranych, najbardziej obiecujących (*E*)-cynamoilowych pochodnych ksantonu oraz wszystkich otrzymanych pochodnych (*Z*)-5- arylidenohydantony dokonano badań fotostabilności z wykorzystaniem symulatora światła słonecznego. Związki były badane zarówno w roztworach metanolowych, jak i w formie półstałych kompozycji o działaniu promieniochronnym. W przesiewowych badaniach absorpcji promieniowania UV wykazano, że wszystkie otrzymane substancje pochłaniają promieniowanie w zakresie 290 – 400 nm. W badaniach wykazano, że związki **8**, **9** oraz **16** w roztworach metanolowych ulegają fotoreakcjom, zaś analiza LC-MS potwierdziła, że najprawdopodobniej główną reakcją jest fotoizomeryzacja *trans-cis*.

Ocena fototrwałości półstałych kompozycji promieniochronnych zawierających związki **8** oraz **9** wykazała, że związek **9** można uznać za fotostabilny filtr UV. Związek **8** cechował się niższą fotostabilnością, co pozwala wnioskować o korzystnym wpływie dodatkowej grupy metoksylowej (zw. **9**) w położeniu 2 pierścienia fenylowego na fotostabilność.

Badania roztworów metanolowych w grupie pochodnych (*Z*)-5-arylidenohydntony wykazały, że diestrowe pochodne (**23** – **30**) charakteryzują się wysoką fototrwałością, natomiast niską fototwałość zarówno w roztworach, jak i formulacjach wykazywały związki zawierające podstawnik (*E*)-3-fenyloprop-2-en-1-yilidenowy (**28** – **30**).

Celem kolejnego badania była ocena bezpieczeństwa wybranych związków. Badania te zostały zaplanowane bardzo szeroko i budzą szczery podziw recenzentki. Badania *in vitro* zostały perfekcyjnie przeprowadzone pod znakomitym kierownictwem Prof. dr hab. Elżbiety Pękali. Zakres ich był bardzo szeroki i obejmował ocenę cytotoksyczności, aktywności estrogenowej, mutagennej oraz stabilności metabolicznej otrzymanych związków. Badanie cytotoksyczności przy użyciu soli tetrazolowej MTT przeprowadzono na wielu liniach komórkowych: fibroblastach skóry ludzkiej BJ, keratynocytach linii HaCaT, pierwotnych ludzkich melanocytach skórnych, komórkach nowotworu wątrobowo-komórkowego HepG2, komórkach ludzkiej neuroblastomy SH-SY5Y oraz na mysich astrocytach C8-D1A. Wykazano, że z grupy pochodnych (*E*)-cynamoilowych ksantonu (związki 9 oraz 16) oraz wszystkie pochodne (*Z*)-5-arylidenohydantoiny (związki 20 – 22, 24, 28, 29) w zakresie zastosowanych stężeń cechują się wysokim profilem bezpieczeństwa względem keratynocytów, fibroblastów skóry ludzkiej, komórek nowotworu wątrobowo-komórkowego oraz komórek ludzkiej neuroblastomy. Związki 9 i 16 wykazywały mniejszą cytotoksyczność w porównaniu do referencyjnych filtrów UV (EHMC i OCT).

Oceniono mutagenność zsyntetyzowanych związków stosując mikropłytkowy test Amesa wykorzystujący zmodyfikowane genetycznie szczepy bakterii, które są pozbawione zdolności syntezy histydyny (*Salmonella typhimurium*) lub tryptofanu (*Escherichia coli*). Związki **8**, **9**, **24** i **29** nie wykazywały mutagenności. Obecnie podczas prac nad nowymi surowcami kosmetycznymi uwzględniane są badania metabolizmu. Ksenobiotyki, w tym składniki kosmetyków mogą przedostać się do krążenia ogólnego, a wobec tego być mogą być poddane ekspozycji na enzymy wątrobowe. Stąd w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej związki **8** i **9** z grupy (*E*)-cynamoilowych pochodnych ksantonu oraz związki **20 – 22**, **24** i **29** z grupy pochodnych (*Z*)-5-arylidenohydantoiny poddano badaniom stabilności metabolicznej w modelu mysich oraz ludzkich mikrosomów wątrobowych. W przypadku (*E*)-cynamoilowych pochodnych ksantonu (zw. **8** i **9**) wykazano, że metabolitem dominującym w ścieżce rozpadu jest 6-hydroksy-9- okso-9*H*-ksanteno-2-karbaldehyd będący produktem *O*-dealkilacji. Reakcja ta stanowiła także główny kierunek przemian metabolicznych analogów (*Z*)-5-arylidenohydantoiny zawierających grupę alkoksylową w pierścieniu fenylowym (zw. **20 – 22**, **24** i **29**).

Wyniki badań są bardzo obiecujące, w obu badanych grupach związków, zarówno wśród pochodnych ksantonu, jak i hydantoiny zidentyfikowano skuteczne i bezpieczne filtry UV. Uzyskane rezultaty badań powinny stać się inspiracją do opracowania formulacji o optymalnym stężeniu substancji aktywnej, jak i optymalizacji struktur zbadanych związków.

Szczególnie korzystnym aspektem dotyczącym receptury kosmetyków ochrony przeciwsłonecznej jest coraz bardziej popularne stosowanie naturalnych składników promieniochronnych, takich jak oleje i ekstrakty roślinne, które wykazują wiele pozytywnych działań na skórę. Efektywnie działają także naturalne przeciwutleniacze, które są niezbędnymi składnikami nie tylko preparatów kosmetycznych, ale i naszej diety. Czy Doktorantka rozważa tego typu receptury?

Warto przy tym dodać, że metody stosowane przy oznaczaniu SPF w Europie, w USA oraz np. w Australii/Nowej Zelandii różnią się w niektórych punktach. Uniemożliwia to bezpośrednie porównywanie produktów na podstawie wartości SPF podawanych na opakowaniach. Standard FDA zazwyczaj daje wyższy wskaźnik SPF w porównaniu z ISO 24444:2010 – SPF. W przeciwieństwie do standardów COLIPA, przepisy FDA nie wymagają także, aby ochrona przed promieniowaniem UVA stanowiła co najmniej jedną trzecią poziomu ochrony przed UVB. Możliwa jest również sytuacja odwrotna, gdy produkty zgodne z europejską normą ISO 24444:2010 – SPF nie spełniają amerykańskich standardów FDA. Oznacza to, że każdy produkt przeznaczony do ochrony przeciwsłonecznej, który odpowiada

wymogom FDA lub ISO 24444:2010 – SPF przed wprowadzeniem na drugi z rynków wymaga przeprowadzenia obowiązujących tam badań. Od niedawna podejmowane są również działania na rzecz ujednolicenia przepisów regulujących oznaczanie SPF.

Praca doktorska skłania do zadania następujących pytań:

1. Czy Doktorantka rozważa wejście ze swoimi formulacjami na rynki pozaeuropejskie?
2. Czy została podjęta współpraca z podmiotami gospodarczymi?
3. Czy uzyskane związki podlegają ochronie patentowej?
4. Czy Doktorantka widzi potrzebę dalszej modyfikacji stwarzającej szansę na jeszcze lepsze produkty najbardziej obiecujących związków?

Wyniki badań przedstawione w doktoracie zostały opublikowane w trzech publikacjach o bardzo wysokim współczynniku oddziaływania IF, wynoszącym łącznie 17,422. Zdaniem recenzentki pożądane byłoby umieszczenie tych trzech publikacji w rozprawie doktorskiej. Pragnę również podkreślić, że Doktorantka zdobyła grant badawczy dla młodych naukowców nr K/DSC/004314, pt. „Synteza, badania właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej pochodnych ksantonu i kwasu cynamonowego o potencjalnym zastosowaniu w kosmetyce". Mgr Justyna Popiół była również wykonawcą grantu NCN pt. „Nowoczesna fotoprotekcja – opracowanie skutecznych i bezpiecznych filtrów UV w grupach pochodnych arylidenohydantoiny i kwasu cynamonowego" nr 2016/21/B/NZ7/01756 oraz realizowała projekt „Inkubator Innowacyjności 4.0 w ramach realizacji prac przedwdrożeniowych pt. „Pochodne ksantonu i ich zastosowanie jako substancje promieniochronne w produktach kosmetycznych"

Reasumując przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Justyny Popiół pt. "Badania nad nowymi związkami o aktywności fotoprotekcyjnej w grupach pochodnych ksantonu i 5-arylidenohydantoiny" cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość praktyczną uzyskanych wyników oraz wartościowe badania własne dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Doktorantkę. Praca pięknie wpisuje się we współpracę nauki z przemysłem. Rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, uważam za niezwykle interesującą oraz nowatorską o dużym potencjale praktycznym. Stanowi ona samodzielny dorobek naukowy, jest na najwyższym światowym poziomie

i w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Art. 13 ust. 1 z dn. 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym z późniejszymi poprawkami z 2014r. (Dz.U. Poz. 1852). Ze względu na te walory, pragnę rekomendować rozprawę doktorską mgr Justyny Popiół do wyróżnienia. Z ogromną przyjemnością mam zaszczyt przedstawić wniosek

Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medium Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Justynę Popiół do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakład Biotechnologii
prof. dr hab. Anna Bielawska