

Prof. dr hab. Bronisław Marciniak
marcinia@amu.edu.pl

Poznań, dnia 4 maja 2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Kroma

pt. "Możliwości zastosowania fitoekdysteroidów z ziela *Serratula coronata* w pielęgnacji skóry w zmianach łuszczycowych"

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Anny Kroma pt. "Możliwości zastosowania fitoekdysteroidów z ziela *Serratula coronata* w pielęgnacji skóry w zmianach łuszczycowych" wykonana została w Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. n. med. Justyny Gornowicz, promotora doktoratu. Promotorem pomocniczym była dr Ewa Pelant.

Praca dotyczy aktualnej i o dużym znaczeniu dla biologii i medycyny tematyki, a mianowicie skuteczności zastosowania wybranych związków aktywnych pochodzenia roślinnego w pielęgnacji skóry ze zmianami łuszczycowymi.

Praca doktorska prezentuje obszerny materiał eksperymentalny i stanowi zwarte opracowanie naukowe o dużym znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym. Została przedstawiona w formie tradycyjnej rozprawy i zawiera: wstęp, przegląd literaturowy stanowiący wprowadzenie do własnych badań, cel pracy, materiały i metody, prezentację wyników, dyskusję oraz wnioski, a także streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografię. Praca zawiera także bardzo

przydatny dla czytelnika wykaz skrótów oraz spisy rycin, tabel i wykresów a także 12 złączników z informacjami i wzorami dokumentacji niezbędnej do realizacji projektu badawczego. Została przedstawiona na 196 stronicach; zawiera 46 rycin, 7 wykresów oraz 31 tabel (w pracy przyjęto konwencje rozdzielania rycin od wykresów) oraz obszerny zestaw cytowanej literatury - 295 pozycji literaturowych. Doktorantka zamieściła także spis swoich współautorskich publikacji naukowych obejmujących lata 2012-2021.

Jedyna uwaga, którą chciałbym w tym miejscu przekazać, dotyczy języka rozprawy. Szkoda, że Doktorantka nie przedstawiła swojej pracy doktorskiej w języku angielskim. W mojej opinii przedstawianie prac doktorskich w języku angielskim w naukach przyrodniczych i ścisłych, a myślę, że także w naukach medycznych, powinno stawać się zwyczajem w Polsce, jak to ma miejsce w wielu europejskich, czołowych ośrodkach naukowych. Zamieszczenie obszernego streszczenia w języku polskim umożliwiłoby zapoznanie się z wynikami badań wszystkim zainteresowanym w kraju.

W części literaturowej Doktorantka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące przedmiotu rozprawy wraz z opisem i charakterystyką sierpnika koronowatego, omówieniem chromatograficznych metod separacji i analizy fitoekdysteroidów, opisem łuszczyc oraz pielęgnacji skóry łuszczycowej. Część ta została napisana w sposób poprawny, a prezentowany materiał został oparty na ponad stu siedemdziesięciu cytowanych publikacjach. Mgr Kroma ma niewątpliwie umiejętność jasnego prezentowania omawianych zagadnień. W mojej opinii prezentacja omawianych w części literaturowej zagadnień jest w zupełności wystarczającym wprowadzeniem w prezentowane dalej problemy badawcze. Szczególnie pozytywnie oceniam podrozdział 2.3.5.2 dotyczący fototerapii i fotochemioterapii, choć, co wynika z moich zainteresowań badawczych, oczekiwałem szerszej prezentacji tych zagadnień.

Głównym celem pracy, jak pisze Doktorantka w rozdziale 3. *Cel Pracy*, było „określenie skuteczności zastosowania frakcji ekdysonowej obecnej w ekstrakcie z ziela *Serratula coronata* w pielęgnacji skóry ze zmianami łuszczycowymi”.

Szczegółowe cele badawcze dotyczyły przeprowadzenia analizy fizykochemicznej uzyskanego ekstraktu, opracowania różnych formułacji kosmetycznych i oceny ich stabilności, oceny wpływu formułacji na stan skóry oraz stopnia przenikania przezskórnego 20-hydroksyekdysonu (głównego składnika frakcji ekdysonowej) wraz z oceną biobezpieczeństwa stosownych preparatów. Podjęte w rozprawie cele badań uważam za ambitne i w pełni uzasadnione naukowo, a ich realizacja została przedstawiona w dalszych rozdziałach rozprawy doktorskiej.

Na podkreślenie zasługuje rozdział 4 rozprawy „*Materiały i Metody*”, w którym Doktorantka zaprezentowała w sposób jasny i przejrzysty część doświadczalną doktoratu. Jak już wspomniałem, mgr Kroma ma umiejętność krótkiej i zwartej prezentacji badań. Rozdział ten składa się z dwóch części fitochemicznej, obejmującej przygotowanie ekstraktu z ziela *Serratula coronata* i analizy jego składu oraz części kosmetologicznej obejmującej preparatykę i analizę zastosowanych formułacji kosmetycznych wraz z badaniem ich wpływu na stan skóry z łuszczyką zwykłą. W pierwszej części została opisana procedura przygotowania ekstraktu oraz metody jego analizy (oznaczenie pH oraz analiza składu chemicznego za pomocą dwóch technik chromatografii cienkowarstwowej (TLC) i cieczowej (HPLC z detekcją MS). Doprowadziło to do identyfikacji takich fitoekdysteroidów jak 20-hydroksyekdyson, ajugasteron C oraz polipodyna B. Drugi podrozdział obejmował opis przygotowania formułacji, w tym z użyciem ekstraktu z ziela *Serratula coronata* oraz kwasu salicylowego, a także opis metod charakteryzujących badane preparaty (badania organoleptyczne, pH, lepkości, badania stabilności obecnych w preparatach fitoekdysteroidów). Przedstawiona została także procedura badań oznaczania ekdysteroidów zawartych w przygotowanych formułacjach za pomocą HPLC oraz opis badań przenikalności przez skórę wybranego ekdysteroidu 20-hydroksyekdysonu z zastosowaniem spektroskopii ramanowskiej. W dalszych częściach tego podrozdziału Doktorantka opisała badania czystości mikrobiologicznej formułacji zawierających ekstrakt z ziela *Serratula coronata*. Bardzo ważny dla praktyki

medycznej jest podrozdział 4.2.6 opisujący badania *in vivo* skuteczności działania formułacji kosmetycznych z udziałem starannie wyselekcjonowanych 70 osób z łuszczycą zwykłą. Podrozdział ten zakończony został opisem badań pomiarów parametrów biofizycznych skóry takich jak: stopień nawodnienia skóry, pH, przednaskórkowa utrata wody, intensywność rumienia/zaczerwienienia, poziom melaniny oraz struktura skóry wraz z zaprezentowaniem odpowiednich przyrządów do wykonania tych badań.

Moja specjalność naukowa nie upoważnia mnie do dogłębnej oceny zastosowanych metod i procedur badawczych w medycynie, jednakże jako chemik chciałabym podkreślić, że Doktorantka w swoich badaniach zastosowała poprawnie dobrane i nowoczesne metody analizy chemicznej, co w konsekwencji doprowadziło do osiągnięcia zamierzonych celów badawczych. Bardzo pozytywnie oceniam to, iż Doktorantka skorzystała z aparatury niedostępnej w Jej macierzystym Zakładzie i Katedrze, m. in. w innych jednostkach Uniwersytetu Medycznego, w Jagiellońskim Centrum Innowacji, a co mnie szczególnie cieszy w Centrum Zaawansowanych Technologii UAM.

Naturalną konsekwencją rozdziału 4 rozprawy „*Materiały i Metody*”, szczegółowo przedstawiającego metodykę i metody badawcze jest rozdział 5 *Prezentacja wyników*. Zaprezentowano w nim uzyskane wyniki w kolejności omówionych w rozdziale czwartym zagadnień, a mianowicie wyniki (1) dotyczące analizy fizykochemicznej uzyskanego ekstraktu z zieleń *Serratula coronata* oraz analizy formułacji kosmetycznych zawierających ekstrakt, (2) czystości mikrobiologicznej preparatów zawierających ekstrakt z zieleń *Serratula coronata* oraz kwasu salicylowego, (3) przenikalności 20-hydroksyekdysonu przez skórę, oraz (4) grupę wyników uzyskanych w oparciu o badania kliniczne z zastosowaniem otrzymanych formułacji, m.in. ocena stopnia nasilenia łuszczycy i zmian chorobowych, stanu skóry po wykonaniu testów płytkowych, stopnia odczuwanego przez pacjentów świądu, pomiar parametrów biofizycznych skóry (pH, zawartość wody w warstwie rogowej naskórka, przednaskórkowa utrata wody, indeks melaniny i rumienia) oraz wyniki badania struktury skóry za

pomocą analizatora NATI. Pozytywnie oceniam sposób prezentacji uzyskanych wyników zawarty w tym rozdziale.

Rozdział 6 rozprawy *Dyskusja* przedstawia omówienie uzyskanych wyników i jak pisze Autorka zawiera „próbę opracowania i przetestowania oryginalnego, naturalnego produktu kosmetycznego przeznaczonego do codziennej pielęgnacji skóry chorych na łuszczycę”. Doktorantka w sposób systematyczny przedstawia i analizuje uzyskane wyniki, począwszy od pozyskania ekstraktu z zieleń *Serratula coronata*, analizy jego składu chemicznego poprzez otrzymywanie odpowiednich formułacji kosmetycznych wraz ze szczegółową analizą ich właściwości fizykochemicznych i badaniami ich stabilności, a także czystości mikrobiologicznej. Jest to niezbędne do ich bezpiecznego stosowania. Szczegółowo omawia i analizuje wyniki uzyskane w oparciu o badania kliniczne z zastosowaniem otrzymanych formułacji. Rozdział ten oceniam bardzo pozytywnie, a w szczególności prezentowaną na str.138 dyskusję dotyczącą stabilności chemicznej i możliwych reakcji chemicznych odpowiedzialnych za degradację składników występujących w preparatach kosmetycznych .

Rozdział 7 zawiera wnioski wynikające z pracy doktorskiej, które przedstawione zostały w sposób jasny i precyzyjny, choć w mojej opinii zbyt skrótowy. Podobna ocena dotyczy rozdziału 8 *Streszczenie Pracy*, w którym Doktorantka podsumowała swoje własne osiągnięcia prezentowane w rozprawie.

Badania mgr Kroma zawarte w rozprawie doktorskiej, przyniosły niewątpliwie wiele nowych i oryginalnych wyników rozszerzających wiedzę dotyczącą fitoekdysteroidów z zieleń *Serratula coronata* i ich zastosowania w pielęgnacji skóry w zmianach łuszczycowych. Ważnym podkreślenia jest mulidyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań oraz umiejętne zastosowanie różnorodnych metod badawczych począwszy od analitycznych metod chemicznych po badania kliniczne.

Na zakończenie z obowiązku recenzenta chciałbym przedstawić kilka uwag krytycznych. Pierwsza, która nasunęła się w trakcie czytania rozprawy dotyczy

badania fotochemicznej stabilności trzech fitoekdysonów zawartych w formułacjach kosmetycznych. Badane związki absorbują w zakresie UV z maksimum absorpcji ok. 250 nm i praktycznie nie absorbują promieniowania w zakresie powyżej 360 nm. Jak wynika z danych literaturowych, związki te ulegają reakcjom fotochemicznym podczas wzbudzenia promieniowaniem w zakresie UV (patrz np. A. Hunyadi et al., *Anticancer Research*, 2012, 32, 1291 „Rapid, Laser-Induced Conversion of 20-Hydroxyecdysone and its Diacetone - Experimental Set-up of a System for Photochemical Transformation of Bioactive Substances” lub Harmatha et al., *Steroids* 2002, 67, 127 “Photochemical transformation of 20-hydroxyecdysone: production of monomeric and dimeric ecdysteroid analogues”). Z informacji przedstawionych na stronie 80 rozprawy nie można określić zakresu długości fali zastosowanego UV (podano jedynie zakres zastosowanego promieniowania widzialnego 590 nm). Zatem końcowy wniosek o stabilności fotochemicznej ww. związków w formułacjach kosmetycznych przedstawiony w rozprawie wymaga potwierdzenia w dodatkowych, szczegółowych badaniach fotochemicznych uwzględniających m. in. takie parametry jak natężenie promieniowania wzbudzającego, odpowiednio dobrane długości fali, czas naświetlania, oraz zastosowane stężenia.

Druga uwaga dotyczy drobnych pomyłek, w tym edytorskich, nie wpływających na jakość rozprawy, np. takich jak:

str. 80, wiersz 3 od dołu: 590 mm w miejsce 590 nm,

str. 80, wiersz 2 od dołu: 590 mm nie jest długością fali promieniowania UV,

str. 109, tabela 15: ilość cyfr znaczących w wynikach dotyczących lepkości powinna być zmniejszona,

str. 150, wiersz 2 od dołu: min zamiast m. in.

Jak wynika z przedstawionej oceny rozprawy, a także z załączonej aktywności naukowej, Doktorantka należy do grupy młodych naukowców umiających z powodzeniem prowadzić badania z zastosowaniem różnorodnych metod badawczych zarówno w badaniach klinicznych jak i chemicznych. Potrafi analizować uzyskane wyniki uwzględniając obszerną literaturę przedmiotu badań

leżącego na pograniczu chemii i medycyny. Jest już współautorem kilkunastu publikacji naukowych opublikowanych głównie w renomowanych, specjalistycznych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, co świadczy o Jej umiejętności pracy w zespole badawczym. Realizacja przez Doktorantkę dobrze zaplanowanych badań mających zarówno charakter badań podstawowych jak i aplikacyjnych, a także systematyczny Jej rozwój naukowy zasługują na pozytywną ocenę. Jestem przekonany, że wyniki badań zaprezentowane w rozprawie doktorskiej stanowią doskonały materiał do rozpowszechnienia w postaci dalszych publikacji i zgłoszeń patentowych.

Reasumując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Anny Kroma odpowiada swoim poziomem naukowym i metodycznym wymaganiom ustawowym i zwyczajowym stawianym pracom doktorskim. Upoważnia mnie to do postawienia wniosku o przyjęcie pracy i dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Bronisław Marciniak