



Warszawa, dnia 10 lutego 2019r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**Zatytułowanej: „Ocena aktywności przeciwnowotworowej i przeciwinfekcyjnej składników olejku eterycznego z *Citrus hystrix* D.C.”**

**Mgr. Magdaleny Kulig**

**Wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. farm. Irmy Podolak oraz promotora pomocniczego dr n. farm. Agnieszki Galanty**

Olejki eteryczne stanowią ważną grupę mieszanin lotnych związków pochodzenia naturalnego. Szereg olejków eterycznych ma swoje monografie w Farmakopei Europejskiej i są szeroko stosowane w leczeniu, zwłaszcza w aromaterapii oraz zewnętrznie przeciwbakteryjnie, przeciwbólowo, przeciwświądowo czy przeciwzapalnie. Mają one także szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym czy spożywczym. Olejki eteryczne z owoców cytrusowych, charakteryzują się ciekawym zapachem związanym z obecnością D-limonenu, a także wykazują szereg aktywności biologicznych, w tym aktywność przeciwdrobnoustrojową. Olejek eteryczny pozyskiwany z *Citrus hystrix*, jest stosunkowo mniej przebadany pod względem aktywności biologicznej, a jednocześnie jest stosowany w kosmetykach.

W tym świetle, badania nad składem, a przede wszystkim nad działaniem olejku i jego głównych składników w kierunku chorób skóry jest jak najbardziej uzasadnione.

Głównymi celami pracy były:

- a) ocena składu jakościowego, ilościowego oraz trwałości olejku eterycznego z owocu zewnętrznej *Citrus hystrix*



- b) ocena aktywności antyproliferacyjnej i cytotoksycznej olejku, jego głównych składników oraz mieszanin wobec komórek nowotworowych i prawidłowych skóry
- c) ocena aktywności mikrobiologicznej na wybrane szczepy dermatofitów, grzybów pleśniowych, drożdży i bakterii odpowiedzialnych za infekcje skórne
- d) ocena wpływu na aktywność izolowanych enzymów mogących mieć wpływ na stan zapalny i kondycje skóry

Zaplanowane przez Doktorantkę cele badawcze zostały wykonane i zinterpretowane prawidłowo. Praca jest napisana klarownie, część teoretyczna jest bardzo wyczerpująca i stanowi dobre wprowadzenie do badań własnych. Część eksperymentalna jest jasno opisana, nie mam żadnych uwag jeśli chodzi o kompletność informacji i możliwość odtworzenia eksperymentów. Opis wyników, a następnie ich dyskusja dobrze się uzupełniają. Dyskusja jest wyczerpująca a wyniki krytycznie zanalizowane. Podsumowanie zawiera być może zbyt wiele punktów ale za to wnioski są jasne i uzasadnione, uwypuklają walory poznawcze pracy.

Pierwszy założony cel pracy pozwolił na ocenę składu chemicznego olejku oraz potwierdził jego trwałość w czasie wykonywania eksperymentów. Jest to bardzo ważny element badania aktywności mieszanin związków jakimi są ekstrakty czy olejki eteryczne. Różnice w składzie chemicznym olejków uzyskanych z tej samej rośliny pozwalają na zrozumienie różnic w aktywności biologicznej. Ten problem Doktorantka poruszyła i bardzo dobrze omówiła w dyskusji wyników. Pani Magdalena Kulig bazując na danych o składzie mogła, w sposób racjonalny, wybrać do dalszych badań główne składniki olejku oraz mieszaniny głównych składników. Co ważne, Doktorantka potwierdziła brak obecności furanokumaryn, które mogą wywoływać podrażnienia skóry pod wpływem światła UV. Kolejnym etapem badań była ocena aktywności antyproliferacyjnej i cytotoksycznej olejku, jego głównych składników oraz mieszanin, wobec komórek nowotworowych i prawidłowych skóry. W tym miejscu muszę podkreślić ogrom pracy, który został wykonany przez Doktorantkę oraz jej dobre przygotowanie praktyczne i teoretyczne do badań na komórkach.



Do niewątpliwych zalet tej części pracy należy wytypowanie kilku różnych linii komórkowych czerniaka skóry, zastosowanie różnych testów oceny wpływu na proliferację oraz żywotność/cytotoksyczność, a także przeanalizowanie różnych czasów inkubacji z badanym olejkiem/ mieszaniną związków czy jednorodnymi związkami. Ważnym aspektem pracy było także zbadanie wpływu tychże składników na prawidłowe komórki skóry (badania takie były wykonane dla olejku z naowocni *Citrus hystrix* po raz pierwszy). Tu należy podkreślić, iż zastosowanie w badaniach mieszanin w stosunku 1:1:1 oraz w stosunku w jakim występują w badanym olejku, wnosi wiele nowych informacji i potwierdza wyższość (i celowość) stosowania nawet bardzo złożonych mieszanin niż pojedynczych związków. Ciekawą obserwacją poczynioną przez Doktorantkę, była silniejsza aktywność antyproliferacyjna niż cytotoksyczna olejku wobec komórek nowotworowych. Tu ciekawą kontynuacją badań byłaby ocena wpływu na apoptozę badanych komórek. Wydaje się także interesujące zbadanie w przyszłości połączenia powyższego olejku ze związkami stosowanymi w chemioterapii (np. fluorouracyl), które są stosowane zewnątrznie w raku podstawnocomórkowy skóry czy w stanach przedrakowy skóry. Ciekawym aspektem, na który zwróciła uwagę Doktorantka w dyskusji wyników, jest potencjalne wykorzystanie olejku z naowocni *Citrus hystrix* w zaburzeniach prawidłowego funkcjonowania skóry związanymi z nadmierną proliferacją.

Dalsze badania Doktorantki skupiły się na ocenie aktywności mikrobiologicznej wobec wybranych szczepów dermatofitów, grzybów pleśniowych, drożdży i bakterii odpowiedzialnych za infekcje skórne. Co stanowi bardzo cenne uzupełnienie poprzednich badań w kierunku zastosowania powyższego olejku w schorzeniach skóry. Szkoda, że Pani Magdalena Kulig nie wykonała także analizy pojedynczych związków, ale rozumiem iż wtedy praca doktorska byłaby ogromnych rozmiarów. Jednocześnie uzyskane wyniki zachęcają do dalszych badań także w połączeniu z antybiotykoterapią.

Ostatnim z celów dysertacji była ocena wpływu na aktywność izolowanych enzymów mogących mieć wpływ na stan zapalny i kondycję skóry. Badania powyższe były niewątpliwie uzasadnione, a wyniki obiecujące, ale pozostawiły pewien niedosyt. Bardzo

---



cenne było zbadanie czy olejek i jego składniki mają potencjał prozapalny w stosunku do komórek keratynocytów w porównaniu z kontrolą pozytywną jaką był lipopolisacharyd (LPS). Ciekawe i ważne było zaobserwowanie braku potencjału pro-zapalnego olejku, w odróżnieniu do pojedynczych związków i ich mieszanin. Ponownie Doktorantka potwierdziła wyższość i zasadność stosowania złożonych naturalnych mieszanin. Natomiast dużo ciekawsze niż zastosowanie bardzo zgrubnego testu denaturacji albuminy, byłoby zbadanie czy olejek i jego składniki mają zdolność do hamowania działania pro-zapalnego LPS-u na linii komórkowej HaCaT, na której oceniano efekt prozapalny. Bardzo ciekawe było zbadanie wpływu na aktywność tyrozynazy, co przy braku toksyczności względem melanocytów, wskazuje na spory potencjał do wykorzystania w kosmetologii.

W tym miejscu chciałabym też pochwalić dyskusję wyników, która jest interesująca, klarowna, a co najważniejsze krytyczna w stosunku do uzyskanych wyników. Uważam, iż zaprezentowana praca jest ciekawa naukowo i wnosi sporo elementów nowości. Ponadto, część wyników uzyskanych w toku pracy została opublikowanych.

Tu jako recenzentka muszę wskazać na pewien mankament powyższej pracy, a mianowicie na brak kontroli pozytywnej w badaniach na liniach komórkowych. Autorka w dyskusji odnosi się do aktywności związków stosowanych w leczeniu, ale to za mało. Ta sama uwaga odnosi się do badań mikrobiologicznych. Autorka podaje dane literaturowe dotyczące wrażliwości szczepów na dane antybiotyki, niemniej jednak wskazane byłoby zastosowanie antybiotyków referencyjnych w badaniu własnym. Ponadto może to utrudnić publikację wyników w dobrych czasopiśmie naukowych.

Kolejne uwagi mam odnośnie przedstawiania wyników badania żywotności, proliferacji i cytotoxycności. Różne formy graficzne, chociaż są atrakcyjniejsze dla oka, nieco utrudniają porównanie i analizę wyników. Nie jestem też przekonana czy łączne przedstawianie wyników z dwóch różnych testów, nawet jak są bardzo zbliżone, jest uprawnione. Brak jest także wyliczeń  $IC_{50}$  dla testów proliferacji. Brakuje mi także wskazania, które różnice w działaniu są znamienne statystycznie. Na przykład wydaje się iż sam olejek jest mniej toksyczny niż mieszanina jednorodnych związków w stosunku do



# WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

---

## Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii

komórek prawidłowych skóry, ale brak jest informacji czy ta różnica jest znamienna statystycznie. Warto byłoby też skomentować dlaczego olejek hamuje proliferację komórek HaCaT (czy ten efekt jest statycznie znamienny w porównaniu do innych komórek prawidłowych?). Oczywiście powyższe uwagi nie umniejszają mojej pozytywnej oceny pracy.

Reasumując, jednoznacznie stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja mgr. Magdaleny Kulig spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę tym samym do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie o dopuszczenie mgr. Magdaleny Kulig do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. farm. Anna K. Kiss

KIEROWNIK  
Katedry Farmakognozji  
i Molekularnych Podstaw Fitoterapii  
*AKISS*  
Prof. dr hab. n. farm. Anna K. Kiss

Prof. dr hab. inż. Andrzej K. Kozłowski  
Instytut Inżynierii i Techniki  
Katedra Inżynierii i Techniki