

dr hab. Beata Grobelna, prof. UG  
Kierownik Pracowni Chemii i Analityki Kosmetyków

Gdańsk, 15.02.2016 r.

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Igielskiej-Kalwat

zatytułowanej:

*„Badania wpływu form kosmetycznych na biodostępność wybranych karotenoidów”*

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Joanny Igielskiej-Kalwat pt. „Badania wpływu form kosmetycznych na biodostępność wybranych karotenoidów” poświęcona jest opracowaniu i otrzymaniu nowych formułacji kosmetycznych, zawierających trzy wybrane karotenoidy oraz zbadaniu ich właściwości. Jest to zagadnienie ważne zarówno z aplikacyjnego, jak i poznawczego punktu widzenia. Rozwój nowoczesnej kosmologii przyczynił się do wzrostu świadomości i zainteresowania naturalnymi produktami kosmetycznymi, zawierającymi w swoim składzie związki biologicznie aktywne, a do nich można również zaliczyć karotenoidy – prekursorzy witaminy A. Otrzymanie nowych receptur oraz ich pełna charakterystyka, zarówno pod kątem właściwości fizykochemicznych jak i aplikacyjnych w pełni uzasadniają podjęcie tego typu badań przez Doktorantkę, które ponadto dobrze wpisują się w nurt badań interdyscyplinarnych, prowadzonych pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Izabeli Nowak.

Rozprawa doktorska została napisana bardzo starannie i przejrzyście. Jest to opracowanie zwarte o czytelnej szacie graficznej. Język, którego używa Autorka w dysertacji, wskazuje na jej dużą wiedzę i obeznanie w zakresie prowadzonych badań, a co za tym idzie na dużą dojrzałość naukową. W tekście przedstawionej do recenzji pracy zdarzyły się drobne błędy literowe, ale nie wpływają one istotnie na jej jakość. Układ rozprawy doktorskiej jest powszechnie przyjęty dla tego rodzaju prac i zawiera następujące części: wstęp (2 strony), część literaturowa (49 stron), cel pracy (1 strona), część doświadczalna (27 stron), wyniki badań i ich dyskusja (90 stron), wnioski (3 strony) oraz streszczenia (w wersji polskiej i angielskiej). Integralną część rozprawy doktorskiej stanowią załączniki (7) oraz spis dorobku Doktorantki. Dysertacja liczy 242 strony, zawiera 82 tabele i 101 rysunków. Poparta jest 353 odnośnikami literaturowymi, które ściśle są powiązane z badaną tematyką.

W części literaturowej po krótkim wprowadzeniu Autorka opisała szczegółowo budowę skóry, jej funkcje oraz przyczyny i teorie starzenia się, zarówno w wyniku działania promieniowania UV jak i wolnych rodników.

Po przeczytaniu tej części rozprawy nasuwa się pytanie, dlaczego w opisie teorii starzenia się skóry podczas omawiania teorii ograniczonej liczby podziałów komórki, Doktorantka wymieniła tylko kosmetyk firmy Dr Eris (Telomeric), który wpływa na poziom telomerazy w skórze, a tym samym zapobiega procesowi starzenia. Czy znane są inne produkty kosmetyczne o podobnym działaniu? Ponadto, czy Autorka może powiedzieć jaki aktywnie czynny związek został wykorzystany w tym produkcie?

W dalszej części pracy, Doktorantka przeszła do krótkiego omówienia antyoksydantów, w tym mechanizmu działania karotenoidów jako antyoksydantów. Następnie przedstawiła w sposób bardzo interesujący karotenoidy: począwszy od budowy i podziału karotenoidów poprzez biosyntezę do właściwości oraz zastosowania przede wszystkim w przemyśle kosmetycznym.

W kolejnym rozdziale Autorka zajęła się opisem badań *in vivo* formułacji kosmetycznych. Bardzo szczegółowo przedstawiła zarówno testy stosowane w ocenie dermatologicznej jak i metody instrumentalne oraz badanie biodostępności z zastosowaniem metody zdzierania. Część literaturową zamyka opis stabilności emulsji oraz metod badania składu produktów kosmetycznych.

Materiał przedstawiony w części literaturowej powinien być pomocny w dyskusji wyników badań własnych. Dlatego, podsumowując tę część rozprawy doktorskiej uważam, że wprowadza ona dobrze czytelnika w tematykę realizowanych przez Doktorantkę badań.

Pani mgr Joanna Igielska-Kalwat postawiła sobie za cel otrzymanie oraz przetestowanie oryginalnego produktu kosmetycznego, zawierającego karotenoidy. W tym celu zaplanowała szereg następujących zadań badawczych, dotyczących zarówno opracowania nowych formułacji kosmetycznych, jak i analizy jakościowej i ilościowej karotenoidów w produktach komercyjnych oraz przygotowanych samodzielnie. Najciekawszym zadaniem było zaproponowanie procedury umożliwiającej określenie biodostępności, wykorzystując metodę zdzierania. Analizując zaplanowane zadania badawcze proszę o wyjaśnienie jaka jest różnica pomiędzy zadaniem nr 2 (oznaczenie zdolności antyoksydacyjnej produktów kosmetycznych zawierających karotenoidy) a zadaniem nr 6 (badanie zdolności wygaszania wolnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu przez samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne typu O/W, W/O, O/W na zimno oraz komercyjne zawierające karotenoidy).

Na kolejnych stronach rozprawy doktorskiej, w rozdziale IV pt. „Część doświadczalna”, Doktorantka przedstawiła swoje własne dokonania w realizacji wyznaczonego celu. Ten fragment pracy zawiera bardzo szczegółowe procedury przygotowania formułacji kosmetycznych oraz opisy zróżnicowanych metod pomiarowych. Nie tylko w celu określenia właściwości fizykochemicznych otrzymanych emulsji, ale również zawartości karotenoidów i ich właściwości antyoksydacyjnych w wybranych produktach kosmetycznych.

Czytając tę część pracy, nasuwa się kilka następujących pytań oraz uwag.

1. Autorka nie przedstawiła informacji na temat wyboru produktów komercyjnych. Jakie było kryterium wyboru (cena, produkty naturalne, dostępność, preparaty na dzień)?
2. Czy wykonywano pomiary TEWL w pomieszczeniu o stałej wilgotności? Ile osób przebywało w pomieszczeniu, podczas wykonywania pomiaru?
3. Rozdział 5.10.2. – Po jakim czasie po naniesieniu kremu został wykonany pomiar TEWL? Czy dla wszystkich probantów ten czas był jednakowy? Określenie „Pomiary TEWL przeprowadzone były na polu aplikacyjnym chwilę przed i po posmarowaniu prawego przedramienia...” jest nieprecyzyjne. Proszę podać dokładniej w jakim czasie to nastąpiło.
4. Czy istnieje konieczność powtarzania w pracy zdjęcia TRUE testu (rys. 35)? Został on wcześniej przedstawiony na rysunku 15.
5. Uważam, że ponumerowanie wzorów, ułatwiłoby poruszanie się po tekście, szczególnie wówczas, gdy konieczne jest odwołanie się do fragmentu sprzed kilku stron.

Rozdział zatytułowany „Wyniki badań i ich dyskusja” zawiera zwięzły, przejrzysty i dobrze zilustrowany, czytelnymi rysunkami i wykresami, opis uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań. Opisywane w tej części rozprawy doktorskiej badania charakteryzują się głęboko przemyślaną strategią postępowania. W tym miejscu chciałabym podkreślić dużą dociekliwość naukową Pani mgr Joanny Igielskiej-Kalwat oraz chęć bardzo dokładnego i wszechstronnego opisu otrzymanych wyników. Należy również podkreślić ogrom pracy włożony w przeprowadzeniu badań, a w szczególności zmuśnej procedury opracowania badań *in vivo*.

Doktorantka otrzymała trzy typy emulsji, domieszkowane trzema różnymi karotenoidami oraz trzy układy kontrolne, co łącznie dało 12 formułacji kosmetycznych. Różnorodne techniki badawcze pozwoliły wszechstronnie zbadać ich właściwości fizykochemiczne (lepkość, pH, współczynnik refrakcji). Następnie Doktorantka dobrała metodę oznaczenia zawartości karotenoidów ( $\beta$ -karoten, likopen) w badanych przez siebie produktach komercyjnych z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii

cieczowej. W tej części również przedstawiła badanie stabilności  $\beta$ -karotenu i likopenu w samodzielnie przygotowanych recepturach. Badania potwierdzają duży spadek ilości zarówno  $\beta$ -karotenu jak i likopenu w zależności od czasu przechowywania oraz od rodzaju emulsji. Najbardziej drastyczny spadek jest obserwowany w emulsjach przechowywanych w temperaturze 45°C. Doktorantka również zbadała właściwości antyoksydacyjne, poprzez pomiar zdolności wygaszania wolnego rodnika DPPH<sup>•</sup> przez karotenoidy, zawarte w kremach komercyjnych oraz w samodzielnie przygotowanych formułacjach. W wypadku samodzielnie przygotowanych produktów kosmetycznych zawierających karotenoidy można zaobserwować największą wartość procentową inhibicji w odniesieniu do karotenoidów zawartych w emulsji typu O/W otrzymanych na zimno. Ostatnim ważnym badaniem, przed rozpoczęciem badań *in vivo* był pomiar stabilności samodzielnie przygotowanych emulsji, zawierających karotenoidy metodą wielokrotnego rozpraszania światła. Stanowi to ważny element w decyzji o zastosowaniu otrzymanych formułacji kosmetycznych w przemyśle. W wyniku przeprowadzonych badań Autorka zaobserwowała postępujące zjawisko flokulacji, świadczące o niewielkiej niestabilności, ale mieszczącej się w granicach normy.

Czytając ten fragment dysertacji nasuwa się kilka kolejnych pytań oraz uwag.

1. Zauważyłam brak zgodności pomiędzy danymi w tabeli nr 23, a ich późniejszym opisem, „Najwyższą wartością lepkości we wszystkich warunkach charakteryzowały się emulsje zawierające  $\beta$ -karoten, następnie likopen, natomiast najniższą preparaty z astaksantyną”.
2. Analizując dane w tabeli nr 25 zauważyłam wzrost pH dla emulsji O/W otrzymanych na zimno z  $\beta$ -karotenem, po przechowywaniu produktu w temperaturze pokojowej z dostępem światła oraz w temperaturze 45°C. Czym można wytłumaczyć wzrost pH?
3. Str. 109, w opisie odnoszącym się do wyników zawartości  $\beta$ -karotenu w wybranych produktach kosmetycznych pojawił się błąd. Autorka napisała że największą zawartością karotenoidu cechował się krem Bielenda 3,1 mg /100 g formułacji, a najmniejszą krem Ava Laboratorium 10.45 mg/ 100 g.
4. Martwi mnie fakt tak dużego ubytku karotenoidów podczas przechowywania otrzymanych emulsji. Jak można temu zaradzić (pomijając przechowywanie w ciemnych naczyniach i w lodówce)? Należy pamiętać, że bardzo często produkty kosmetyczne przechowywane są przez konsumentów w różnych warunkach.
5. Interesującym byłoby badanie stabilności po wykonaniu testu huśtawkowego. Czy Doktorantka podjęła takie próby badań?

6. W kontekście potencjalnego zastosowania formułacji kosmetycznych w przemyśle warto byłoby dokonać doboru odpowiedniego konserwanta. Czy Doktorantka podjęła takie próby?

Przechodząc do najciekawszej w mojej opinii części wyników, chciałabym podkreślić ogrom pracy jaki Doktorantka włożyła w profesjonalne przygotowanie do badań *in vivo*, które wymagały nie tylko wiedzy chemicznej, ale również z zakresu kosmetologii oraz dermatologii. W badaniu wykorzystano najbardziej stabilną emulsję O/W, wytworzoną na zimno, zawierającą  $\beta$ -karoten. Przy zastosowaniu specjalistycznej aparatury kosmetycznej, Autorka wykonała pomiary charakterystycznych parametrów skóry u 28 probantów takich jak nawilżenie, elastyczność, pomiar TEWL oraz ocenę działania drażniącego. Następnie, w dalszej części pracy, Doktorantka omówiła wyniki badania biodostępności  $\beta$ -karotenu, za pomocą zdzierania pasków adhezyjnych. Jestem pod dużym wrażeniem interpretacji otrzymanych wyników, pozwalających na precyzyjne określenie stężenia  $\beta$ -karotenu w warstwie rogowej naskórka. Wspaniale zaprezentowane wyniki oraz wykonana analiza statystyczna jednoznacznie wskazują na doskonale przygotowanie i wiedzę Doktorantki do przeprowadzenia tego typu badań.

Do tej części pracy mam dwie uwagi.

1. W ankiecie oraz na rysunku 83 wymieniono jako zabieg kosmetyczny peeling owocowy, myślę że sformułowanie peeling kwasami owocowymi albo peeling chemiczny brzmi stosowniej w odniesieniu do pracy o charakterze naukowym.
2. Zauważyłam brak zgodności pomiędzy rysunkiem 99 a jego opisem na stronie 171.

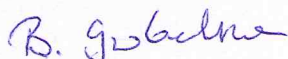
Rozprawę doktorską zamyka liczący 3 strony rozdział pt. „Wnioski”. Jest to zwarte i syntetyczne zestawienie największych osiągnięć, uzyskanych podczas realizacji pracy doktorskiej. Na końcu rozprawy, w rozdziale X, znajdują się załączniki takie jak: zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań pt. „Badanie *in vitro* oraz *in vivo* wpływu form kosmetycznych na biodostępność wybranych karotenoidów”, szczegółowe informacje oraz formularz zgody dla probantów. Ostatnim załącznikiem jest profesjonalnie przygotowana ankieta do badań *in vivo*.

Wspomniane w trakcie recenzji nieliczne drobne uwagi świadczą jedynie o dokładnym zapoznaniu się recenzenta z treścią rozprawy doktorskiej i nie mają wpływu na bardzo wysoką ocenę dysertacji.

Obiektywną miarą naukową wartości przedstawionej mi do recenzji dysertacji jest to, że zawarte w niej wyniki zostały już częściowo opublikowane w czterech czasopismach z tzw. listy ministerialnej części A, oraz w 3 czasopismach z listy ministerialnej części B. Ponadto, Doktorantka jest współautorką jednego rozdziału w monografii, 8 artykułów w materiałach konferencyjnych oraz 8 w czasopismach spoza listy

ministerialnej. Swoje osiągnięcia prezentowała na konferencjach zarówno w formie wystąpienia ustnego (5) oraz posteru (17).

Podsumowując mogę stwierdzić, że tematyka badawcza rozprawy doktorskiej zawiera wymagane elementy nowości naukowej, poruszane zagadnienia są ważne zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia, a treść pracy odpowiada tematowi określoneemu w tytule. Na szczególne uznanie zasługuje rzetelna dyskusja uzyskanych wyników w odniesieniu do prawidłowo dobranych pozycji literaturowych. Przedłożona mi do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane ustawą o tytule i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595) oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 22 września 2011 (Dz. U. nr 204, poz. 1200) a także zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Pozwala mi to wystąpić z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Joanny Igielskiej-Kalwat do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Beata Grobelna, prof. UG