



Do Pani Dziekan

Prof. UJ Dr. hab. Joanny Zalewskiej-Golosz

Wydział Biologii UJ

Ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

Prof. Dr. hab. Michael Giersig

Foreign member of Polish Academy of Sciences

Head of Department:

Theory of Continuous Media and Nanostructures  
Institute of Fundamental Technological Research  
Polish Academy of Science  
Pawńskiego St. 5B; 02-106 Warsaw, Poland

e-mail: mgiersig@ippt.pan.pl  
phone: (+48) 22 826 12 81 ext. 410  
mobile: +49 15754999168  
<https://www.ippt.pan.pl>

**Recenzja pracy doktorskiej Pana mgr inż. Kristiana Mokrzyńskiego  
zatytułowanej**

**„Badanie fotoreaktywności naturalnych melanin oraz ich potencjału fototoksycznego w układach modelowych i komórkach in vitro”**

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pana mgr Krystiana Mokrzyńskiego zatytułowana „Badanie fotoreaktywności naturalnych melanin oraz ich potencjału fototoksycznego w układach modelowych i komórkach in vitro” została wykonana na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii na Uniwersytecie Jagiellońskim a promotorami pracy są prof. Dr hab. Witold Korytowski i dr Michał Sarna.

Rozprawa doktorska ma formę klasycznej pracy pisemnej podzielonej na opis części teoretycznej, eksperymentalnej oraz dyskusji i podsumowania z wnioskami końcowymi. Podjęte przed doktoranta prace badawcze stanowią istotny wkład w prace nad wykorzystaniem naturalnych pigmentów w ochronie zdrowia i mają ogromny potencjał aplikacyjny.

Celem pracy doktorskiej Pana mgr Krystiana Mokrzyńskiego było wyizolowanie naturalnych pigmentów z włosów od osób o różnym fototypie, charakteryzacja fizykochemiczna pobranych pigmentów, określenie własności przeciwutleniających, określenie fotodegradacji oraz badania fototoksyczności i fotoprotekcji pigmentów. Podany w doktoracie cel badań jest bardzo czytelny i odnosi się do obecnego stanu wiedzy, a lektura pracy pozwala stwierdzić, że cele szczegółowe składające się na cel główny zostały z sukcesem osiągnięte.

Na dorobek publikacyjny składają się dwa pierwszo-autorskie artykuły naukowe, które zostały zaprezentowane na czterech konferencjach naukowych, a doktorant jest także współautorem dziesięciu prac badawczych o tematyce pokrewnej do tematyki przedłożonej pracy doktorskiej.

Część teoretyczna pracy doktorskiej została podzielona na sześć podrozdziałów, składająca się ze spójnego opisu melanin – począwszy od ich biosyntezy, charakterystyki fizykochemicznej, roli w organizmie człowieka, fotoreaktywności oraz reakcji melanin pod wpływem światła. Opis wskazuje, że Doktorant posiada bardzo dobrą wiedzę teoretyczną w zadanej problematyce badawczej. Dokonano rozeznania stanu wiedzy w realizowanej tematyce badawczej opierając się o istotne publikacje naukowe, a zdecydowana



większość zacytowanych prac pochodzi z ostatnich kilku lat. Część teoretyczna jest napisana zwięźle i nie zawiera błędów merytorycznych.

Część eksperymentalna rozpoczyna się od spisu odczynników i opisu stosowanych technik badawczych przechodząc płynnie do opisu wyników badań. Doktorant szczegółowo opisał izolację naturalnych melanin z pozyskanych ludzkich włosów od osobników posiadających różny fototyp opierając się w klasyfikacji na dane dotyczące wrażliwości na rumień słoneczny oraz zdolność do opalania ostatecznie pobierając próbki od dawców z czterech z sześciu fototypów. W opisanie wykazano prostotę metody izolacji naturalnych pigmentów wskazując na zawartość mieszanin eumelanin i feomelanin w pobranych próbkach.

Po izolacji pigmentów przebadano próbki pod kątem badania właściwości paramagnetycznych. W tym celu użyto spektroskopię EPR. Otrzymano widma ukazujące różnice pomiędzy pobranymi melanosomami, nanoagregatami melaniny oraz melaninami syntetycznymi. Wykazano, że melanosomy fototypu I są typowe dla feomelaniny, a próbki dla nanoagregatów są zbliżone dla uwodnionej feomelaniny. W przypadku fototypu II szerokość sygnału jest także zbliżona do feomelanin, podczas gdy melanosomy pozyskane od osobników posiadających fototyp V są zbliżone do eumelanin. Wyniki badań z użyciem spektroskopii EPR są spójne z wynikami badań własności optycznych pigmentów, gdzie próbki dla fototypu V wykazują nieznacznie wyższą absorpcję w zakresie promieniowania ultrafioletowego w określonym zakresie (tu 300-400 nm).

Promień hydrodynamiczny cząstek pigmentów badano za pomocą metody Dynamicznego Rozpraszania Światła. Wynik badań wskazują, że barwnik z melanosomów i nanoagregaty melanin posiadają największy rozmiar dla fototypu V, nawet 110 nm i maleją odpowiednio dla fototypów I, III i II. Wyniki są klarowne, jednak brakuje odchylenia standardowego, pomimo że w opisie metody wskazano pomiary z potwierzzeniami dla nawet 16 przebiegów. W dyskusji wyników Doktorant jednoznacznie wskazuje na zawartość nanoagregatów, jednak praca nie pokazuje obrazowania próbek. Pomocne byłoby pokazanie wyników badań z użyciem mikroskopii SEM, TEM lub AFM celem porównania wyników badań z użyciem DLS. Opis wyników badań jedynie odnosi się do wyników badań literaturowych. W przypadku badań własności optycznych wskazano znaczący wzrost absorpcji dla melanosomów III i V co wiąże się z większą ilością pigmentu w próbkach.

Kolejno, poddano badaniu fotogenerację reaktywnych form tlenu naturalnych melanin, w tym fotokonsumpcję tlenu, foto produkcję anionorodnika ponadtlenkowego i tlenu singletowego wskazując na najwyższe wartości konsumpcji tlenu przez melanocyty fototypu III, a dopiero kolejnych fototypów II, I i V. Jednak, uzyskane wartości różnią się od próbek dla nanoagregatów melaniny, gdzie fotokonsumpcja tlenu jest najwyższa dla II fototypu dla nanoagregatów, podobnie jak powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego.

W przypadku zdolności do fotogenerowania tlenu singletowego, nanoagregaty melanin dla fototypu I są o wiele wyższe niż dla melanosomów dla V fototypów. Wyniki badań mogą zostać powiązane z preparatyką próbek. Wiąże się to także z blaknięciem barwników i tym samym zmianą właściwości paramagnetycznych pod wpływem obecności tlenu singletowego. Wskazano, że najsilniejszą konsumpcję tlenu wykazują pigmenty bogate w eumelaniny. Co więcej, barwnik ten wykazuje także największą zdolność do konsumpcji anionorodnika ponadtlenkowego. Tlen singletowy jest najefektywniej produkowany przez naturalne melaniny, przy czym największe wydajności uzyskano dla nanoagregatów melaniny. Wyniki badań dobrze korelują z wynikami własności przeciwutleniających z użyciem rodnika DHHH, wskazując, że najefektywniejsze są pigmenty bogate w eumelaniny. Naturalne barwniki melaninowe chronią organizm przez szkodliwym działaniem promieniowania ultrafioletowego jednocześnie mogą ulegać szeregom

M4

reakcji pod wpływem światła. W badaniach Doktorant wykazał, że w zależności od fototypu proces degradacji melanin może zachodzić w różnym tempie. Poddano badaniu melanin naturalnych w obecności symulowanego światła słonecznego na komórkach sprawdzając cytotoksyczność pigmentów. W tym celu badano aktywność mitochondrialną komórek HaCaT jako model jednowarstwowego naskórka w oparciu o testy MTT badających aktywność NAD(P)H-zależnych oksydoreduktaz i dehydrogenaz mitochondrialnych bezpośrednio po naświetleniu oraz po 24 godzinach od naświetlenia. Wyniki badań pokazują, że obecność melanosomów fototypów jasnych I-III zmniejsza żywotność komórek HaCaT, gdzie największa toksyczność zmierzona została dla typu II co może wynikać ze zdolności do degradacji wewnątrzkomórkowych przeciwutleniaczy i reduktorów. Wyniki badań zostały porównane i dobrze korelują z wynikami opisanymi w literaturze z ostatnich lat.

W kwestii opisu wyników badań, część eksperymentalna została poddana dyskusji na 34 stronach i kolejno zwięźle podsumowana i opatrzona wnioskami końcowymi.

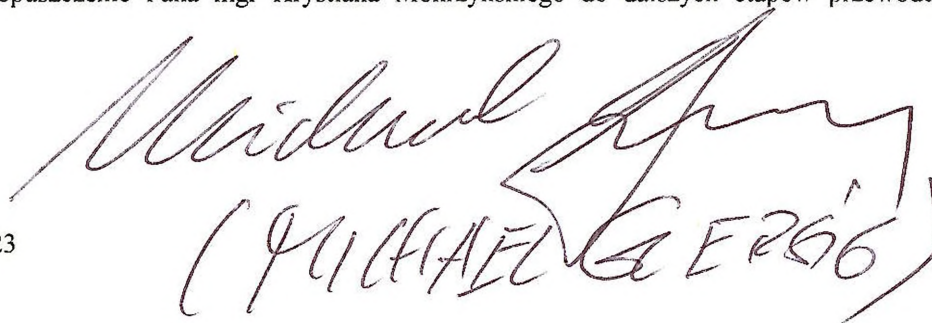
Rozprawa doktorska mgr Krystiana Mokrzyńskiego jest zredagowana logicznie i przejrzysto. Praca jest napisana poprawną polszczyzną i nie zawiera błędów merytorycznych ani wątpliwych interpretacji wyników. Rysunki zamieszczone w pracy ubogacają treść i spełniają zamierzony cel.

Praca zawiera drobne błędy edytorskie np. pusta strona np. str. 133, brak skrótu w wykazie skrótów na początku pracy np. CD na stronie 24, powtórzenia np. tęczówka na str. 19, , brak numeracji równań, kropki zamiast przecinków jako separator np. str. 40, 103 itd., spacja przed znakiem % np. na str. 103, itd., brak spójności w zapisie jednostek – część zapisów jest z zapisem potęg np. Ms-1 a część ze znakiem ilorazu np. J/cm<sup>2</sup>, zapis mieszany występuje w całej pracy, brak wskazania względem jakiej elektrody mierzony był potencjał redoks na stronie 34, dodatkowe spacje pomiędzy ostatnim słowem a kropką. Jednak, pomimo licznych błędów edytorskich praca nie traci na wartości merytorycznej.

Przedłożona praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemów naukowych dotyczących poznania procesów fotodegradacji oraz fototoksyczności pigmentów naturalnych o znaczeniu biologicznym, pozwalając na zastosowanie melanin w ochronie zdrowia.

Podsumowując, uważam, że przedłożona praca doktorska jest wkładem naukowym na bardzo dobrym międzynarodowym poziomie. Postawiony cel badawczy został przekonująco osiągnięty. W niniejszej pracy doktorant zaprezentował, umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i wykazał się profesjonalnym zaangażowaniem w prace eksperymentalne. Praca doktorska przygotowana przez mgr Krystiana Mokrzyńskiego spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z poz.zm.).

Zatem, wnoszę o dopuszczenie Pana mgr Krystiana Mokrzyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Warszawa, 20.11.2023

MB