



RPW/16624/2022
Data: 2022-08-25
UMB

Department of Biopharmacy
Medical University of Lublin
ul. Chodzki 4a
20-093 Lublin, POLAND

<http://www.biopharmacy.umlub.pl>

Lublin, 14 sierpnia 2022

Recenzja pracy doktorskiej mgr Sinemyiz Atalay Ekiner pt. *“Protective Effects of Cannabidiol on Skin Keratinocytes in an Oxidative Microcellular Environment Induced by UVA/B Radiation or Exposure to Hydrogen Peroxide”*

Jednym z motorów ewolucji organizmów żywych jest rozwój mechanizmów adaptacyjnych w odpowiedzi na różne stresory. We wczesnych warunkach biotycznych powierzchnia Ziemi była wyeksponowana na promieniowanie ultrafioletowe o szerokim zakresie i ten potencjalnie destrukcyjny stresor zdefiniował chemię życia, jaką znamy: wszystkie aminokwasy, kwasy nukleinowe, węglowodany czy fosfolipidy to cząsteczki o zaskakująco wysokiej fotostabilności w świetle UV [Szabla R, Zdrowowicz M, Spisz P, Green NJ, Stadlbauer P, Kruse H, Šponer J, Rak J. *Nat Commun.* 2021;12:3018]. Wkrótce po tym, gdy życie zaczęło wzbogacać atmosferę Ziemi w wolny tlen, ilość promieniowania ultrafioletowego docierającego do powierzchni znacząco spadła i ten fotochemiczny stresor miał już odtąd mniejsze znaczenie. Niemniej jednak nigdy nie wygasł całkowicie: ekspozycja na promieniowanie UV i wolny tlen nadal może wywierać szkodliwy wpływ na organizmy biologiczne, w tym ludzi. Takim przykładem może być praktyka dermatologiczna, gdzie powszechnie stosowane czynniki takie jak UV lub H_2O_2 indukują powstawanie stresu oksydacyjnego i mechanizmy prozapalne w komórkach skóry. Istnieje w związku z tym zapotrzebowanie na nowe substancje o odpowiednich właściwościach cytoprotekcyjnych, które można wykorzystać w celu ochrony komórek skóry przed uszkodzeniami metabolicznymi spowodowane tymi stresorami.

Praca doktorska mgr Sinemyiz Atalay Ekiner jest próbą rozwiązania tego ostatniego zagadnienia. Jego głównym celem jest scharakteryzowanie wpływu kannabidiolu (CBD), niepsychoaktywnego fitokannabinoidu, na metabolizm keratynocytów w warunkach mikrośrodowiska oksydacyjnego wywołanego ekspozycją na H_2O_2 lub promieniowanie UV. Efekty CBD zostały ocenione w odniesieniu do wewnątrzkomórkowej homeostazy redoks i związane z metabolizmem komórkowym objawiającym się zmianami w profilach fosfolipidowych i białkowych błony komórkowej. Trzon pracy stanowi pięć publikacji poświęconych temu zagadnieniu, które łączą się w znakomicie zaprojektowany monotematyczny cykl opisujący zdefiniowany problem badawczy. Pierwsza publikacja „*Antioxidative and Anti-inflammatory Properties of Cannabidiol*” autorstwa Sinemyiz Atalay, Iwony Jarockiej – Karpowicz i Elżbiety Skrzydlewskiej (P1) jest artykułem przeglądowym



opisującym chemię CBD i jego głównych pochodnych, biologiczne działanie CBD oraz jego potencjał terapeutyczny udokumentowany w badaniach klinicznych i przedklinicznych; szczególną uwagę zwrócono na właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne CBD i jego pochodnych. W kolejnym artykule zatytułowanym „*Cannabidiol protects keratinocyte cell membranes following exposure to UVB and hydrogen peroxide*” S. Atalay, I. Dobrzyńska, A. Gęgotek, E. Skrzydlewska (P2) opisuje, że CBD jest w stanie penetrować keratynocyty i gromadzi się w błonie komórkowej oraz zmniejsza przesunięcie równowagi redoks wywołane przez UV lub H_2O_2 , co wpływa na integralność błony komórkowej. Analizy lipidomu (poziomy m.in. wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, kwasu sialowego i innych lipidowych produktów peroksydacji) wykonano kombinacją metod bioanalitycznych LC-MS. Ponadto, autorzy wykazali, że CBD zapobiega indukowanej przez UVB/ H_2O_2 redukcji wielkości keratynocytów, potencjału zeta i aktywności transporterów ABC. Głównymi celem kolejnego artykułu „*Protective effects of cannabidiol on the membrane proteins of skin keratinocytes exposed to hydrogen peroxide via participation in the proteostasis network*” autorstwa Sinemyiz Atalay, Agnieszki Gęgotek, Pedro Domingues, Elżbiety Skrzydlewskiej (P3) było badanie zmian profilu proteomu indukowanego przez H_2O_2 oraz ocena w jaki sposób CBD może odwrócić zaobserwowane niekorzystne zmiany. Analiza sieci interakcji międzybiałkowych wykazała, że najistotniejsze zmiany dotyczyły białek pełniących ważną rolę w aktywowaniu proteasomów, w procesach fałdowania czy biosyntezy białek oraz regulacji równowagi białek zaangażowanych w przeżywalność komórek. Autorzy doszli do wniosku, że połączenie CBD może przynieść korzyść w klinicznym zastosowaniu H_2O_2 poprzez zapobieganie jego prooksydacyjnym i prozapalnym skutkom poprzez udział CBD w błonowych procesach sygnalizacji molekularnej. „*Protective Effects of Cannabidiol on the Membrane Proteome of UV-Irradiated Keratinocytes*” autorstwa Sinemyiz Atalay, Agnieszki Gęgotek i Elżbiety Skrzydlewskiej (P4) to publikacja, w której porównano krótko- i długoterminowy wpływ zastosowania CBD na profil proteomiczny błon biologicznych keratynocytów napromieniowanych promieniami UVB. Autorzy scharakteryzowali indukowane przez UVB modyfikacje białek błonowych, w szczególności addukty z produktami peroksydacji lipidów, które mogą zmieniać fałdowanie oraz funkcję białek błonowych, procesy te mogą nawet wpływać na modulację szlaków wewnątrzkomórkowych oraz komunikację międzykomórkową. Obecność CBD znacznie obniżyła poziomy tych adduktów białkowych, było szczególnie widoczne wśród białek związanych z proliferacją i apoptozą komórek. Co więcej, CBD znacząco zwiększyło ekspresję białek zaangażowanych w translację i proliferację, reakcje prozapalne oraz utrzymanie równowagi redoks, których obniżenie zaobserwowano po ekspozycji na UVB. Długotrwałe (48 h) stosowanie CBD zmniejszyło nasilenie odpowiedzi antyoksydacyjnej i sugeruje działanie proapoptotyczne. Autorzy doszli do wniosku, że fitokannabinoidy wyzwalaają komórkowe mechanizmy ochronne poprzez degradację zmodyfikowanych białek lub apoptozę patologicznie zmienionych komórek. Ostatni artykuł zatytułowany „*Therapeutic application of cannabidiol on UVA and UVB irradiated rat skin*” (P5) został opublikowany w JPBA przez Sinemyiz Atalay, Agnieszkę Gęgotek, Artura Wrońskiego, Pedro Domingues i Elżbietę Skrzydlewską. Celem



tego badania była ocena wpływu CBD na metabolizm keratynocytów skóry *in vivo* u szczurów z niedoborem odporności (RH-FOXN1RNU) narażonych na promieniowanie UVA i UVB. Wyniki uzyskane za pomocą kombinacji SDS-PAGE/nanoHPLC/QexactiveOrbiTrap pokazują, że ekspozycja skóry szczura na promieniowanie ultrafioletowe oraz działanie CBD w istotny sposób modyfikowały ekspresję białek zaangażowanych w regulację procesów prozapalnych, równowagi redoks i apoptozy. Artykuł wymienia szereg białek o zmodyfikowanych poziomach ekspresji (autorzy sugerują, że najważniejsze to Nrf2 oraz dysmutaza ponadtlenkowa), podczas gdy kannabidiol wydaje się odwracać większość tych zmian. Autorzy doszli do wniosku, że CBD utrzymuje proteostazę keratynocytów i może zostać zasugerowany jako środek zapobiegający indukowanym przez UV zmianom metabolicznym w keratynocytach naskórka.

Prezentowany zbiór pięciu artykułów obejmuje zatem systematyczne badanie sygnatur biochemicznych; zmian proteomicznych i lipidowych wywołanych promieniowaniem ultrafioletowym lub nadtlenkiem wodoru na keratynocytach skóry i określa, w jaki sposób jednoczesne podawanie CBD może przeciwdziałać tym zmianom. Badania są doskonałym przykładem dobrze zaprojektowanego i dobrze udokumentowanego projektu, który kompleksowo podejmuje temat z wykorzystaniem całej gamy metod bioanalitycznych, m.in. spektroskopii EPR, nano-HPLC QorbiTrap dla LC-MS. Wszystkie pięć artykułów zostało opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych uznanych dziedzinie: *Antioxidants (Basel)* – P1 (2019) i P4 (2021), *Redox Biology* – P2 (2020) i P3 (2021) oraz *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* – P5 (2021). Warto podkreślić, że P3, P4 i P5 zostały dodatkowo uzupełnione tabelaryzowanymi informacjami zawierającymi wykazy konkretnych białek i innych markerów których poziomy zostały zmienione w odpowiedzi na ekspozycję na UV, H₂O₂ lub CBD. Sinemyiz Atalay Ekiner jest pierwszym autorem wszystkich publikacji, nie pozostawia to wątpliwości co do wiodącej roli doktorantki w projektowaniu badań, realizacji kluczowych eksperymentów, interpretacji wyników i edycji manuskryptu; wszyscy pozostali współautorzy zgodnie podkreślają ten fakt w deklaracjach dołączonych do każdej z publikacji. Artykuł P5 jest dodatkowo poprzedzony kopią decyzji Lokalnej Komisji Etyki w sprawie zgody na eksperymenty z udziałem szczurów – do badania wpływu światła UV na keratynocyty *in vivo*. Zgodnie z tym dokumentem doktorantka nie była bezpośrednio zaangażowana w wykonanie tych eksperymentów.

Dodatkowej uwagi wymaga warstwa redakcyjna pracy doktorskiej. Autorka przedstawia bardzo obrazowy komentarz do prezentowanego zbioru artykułów z jasnym i wyraźnym wprowadzeniem w kluczowe procesy komórkowe wywołane stresorami oksydacyjnymi, określeniem celu i zarysem całej pracy doktorskiej, po czym następuje podsumowanie i główne wnioski całości pracy doktorskiej. Świadczy to o głębokim zrozumieniu złożoności problemu badawczego i dostrzeżeniu perspektywy szerszej niż ta prezentowana w pojedynczych publikacjach. Chciałem podkreślić, że praca doktorska Sinemyiz Atalay Ekiner należy do najlepszych, jakie miałem okazję recenzować; przedstawia bardzo interesujące i nowatorskie w swoim charakterze badania zebrane w solidnym



zestawie publikacji naukowych. Wszystkie artykuły zostały wcześniej poddane procedurom recenzji *peer-review* z zachowaniem wysokich standardów czasopism naukowych; Trudno było mi w związku z tym zidentyfikować jakąś istotną i godną uwagi słabość pracy doktorskiej.

Podsumowując, jednoznacznie pozytywnie oceniam wartość badawczą i nowość naukową pracy doktorskiej Sinemyiz Atalay Ekiner. Spełnia najwyższe standardy badań biomedycznych, a także świadczy o doskonałej wiedzy kandydatki z zakresu molekularnej toksykologii i nowoczesnej bioanalitiky. W opinii recenzenta rozprawa doktorska pt. „*Protective Effects of Cannabidiol on Skin Keratinocytes in an Oxidative Microcellular Environment Induced by UVA/B Radiation or Exposure to Hydrogen Peroxide*” jest jasno przedstawiona, odpowiednio zaprojektowana i udokumentowana, dotyczy ważnego i aktualnego zagadnienia wpływu CBD na biochemiczne sygnatury keratynocytów po ekspozycji na najczęstsze stresory oksydacyjne. W ten sposób spełnia wszelkie wymogi merytoryczne i formalne stawiane rozprawom doktorskim przez odpowiednie akty prawne oraz normy zwyczajowe środowiska reprezentującego obszar nauk farmaceutycznych. W związku z tym zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o z wnioskiem o dopuszczenie mgr Sinemyiz Atalay Ekiner do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto mając na uwadze wysoką wartość naukową i nowatorstwo przedstawionych wyników oraz fakt, że całość badań została wcześniej opublikowana w uznanych i recenzowanych czasopismach, stawiam wniosek o wyróżnienie pracy, jeżeli tylko jest to zgodne z wewnętrznymi regulacjami Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Z poważaniem,

Prof. dr hab. Krzysztof Józwiak