



Wrocław, 7. listopada 2020 r.

RECENZIA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pod tytułem

„Wybrane związki z roślin należących do rodziny Asteraceae: ocena aktywności biologicznej i mechanizmów działania”

przedłożonej

Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
przez panią mgr **Barbarę Gierlikowską**

miejsce realizacji rozprawy – **Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii**

promotor - **Prof. Dr hab. Anna K. Kiss**

Uwagi ogólne na temat problematyki podjętej w rozprawie

Oceniana rozprawa doktorska, złożona w toku postępowania o nadanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych, podejmuje problematykę wpływu roślinnych substancji leczniczych na kluczowe na poziomie komórkowym parametry stanów zapalnych o podłożu infekcyjnym.

Zakażenia mikroorganizmami leżą u podstaw najpowszechniejszych schorzeń dnia codziennego, czyli chorób górnych dróg oddechowych. Nawet przy wirusowej ich etiologii, towarzyszące im osłabienie zdolności obronnych organizmu ułatwia wtórną patogenezę bakteriom, co z kolei skłania do nadużywania antybiotyków w celu osiągnięcia szybkiego efektu terapii. Jednocześnie, jednymi z najczęściej stosowanych objawowo leków OTC są NLPZ, często w kombinacji z niezupełnie bezpiecznymi substancjami ułatwiającymi oddychanie (fenylefryna, fenyramina, pseudoefedryna) i przeciwkaszlowymi (dextrometorfan). W obydwu aspektach, leki naturalne mogą stanowić skuteczną i bezpieczniejszą alternatywę (nie mam tu oczywiście na myśli wyciągów z ziela przęśli) i są równie często zalecane. Aliści, nierozwiązana pozostaje kwestia zwalczania patogennych mikroorganizmów, a jak pisze Autorka, "...jedną z głównych przyczyn narastania antybiotykooporności jest nadużywanie antybiotyków, zwłaszcza w wirusowych zakażeniach układu oddechowego. Istnieje więc pilna potrzeba lokalnego i globalnego przeciwdziałania zjawisku narastającej oporności, któremu ma służyć m.in. racjonalizacja antybiotykoterapii, jak również poszukiwania nowych substancji o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwzapalnej."

Decyzja o skorzystaniu z poprzednio scharakteryzowanych ekstraktów i uzyskanych czystych substancji pozwoliła na skupienie się na badaniach biologicznych, których zakres wykracza poza typową pracę z bioaktywności roślin leczniczych. Wybór roślin z rodziny Asteraceae jest także racjonalny, gdyż ten liczny takson obejmuje z jednej strony powszechnie znane surowce, a z drugiej strony charakteryzuje się bogactwem mało przebadanych związków o unikatowych strukturach. Między innymi, typowo występujące w złożonych laktony seskwiterpenowe, należą do najbardziej zróżnicowanych strukturalnie klas fitochemicznych, wykazując jednocześnie dobrze udokumentowany wpływ na fizjologię komórek innych organizmów. Wybrane do badań gatunki są lub były wykorzystywane w ziołolecznictwie tradycyjnym, a niektóre – jak rodzaj *Grindelia* (wywodzący się z tradycyjnej medycyny pierwszych ludów Ameryki)

dostarczają popularnych na rynku europejskim i północnoamerykańskim specyfików stosowanych właśnie w stanach chorobowych górnych dróg oddechowych. Mimo tradycyjnej wiedzy i popularności, wiele aspektów działania leczniczego, a szczególnie istotnych aspektów przeciwdziałania negatywnym skutkom infekcyjnych stanów zapalnych pozostaje niewyjaśnionych. Dzięki podjętej tematyce, rozprawa pani mgr Barbary Gierlikowskiej staje się ważnym wkładem w rozwiązanie problemów mechanizmów działania uznanych ziół leczniczych, a jednocześnie wskazuje nowe kierunki badawcze.

Oceniana rozprawa była realizowana w zespole, który ma bogate doświadczenie w oczyszczaniu z matryc roślinnych rozmaitych klas fitochemicznych, ich identyfikacji oraz oceny oddziaływania z komórkami zwierzęcymi na poziomie biochemicznym i molekularnym. W wyniku poprzednich badań nagromadzona została ogromna wiedza i kompetencje, które stanowią doskonały punkt wyjścia do realizacji kolejnych tematów wzbogacających możliwości odkrywania nowych właściwości roślinnych metabolitów biologicznie czynnych. Jest to niezbędną podstawą do kontynuacji badań farmakologicznych i klinicznych oraz do skutecznego opracowania nowych i udoskonalania znanych leków naturalnych. W związku z tym, problematyka badań niniejszej rozprawy jest bardzo aktualna i potrzebna, wpisuje się w światowe trendy nowoczesnej biologii farmaceutycznej oraz powinna dostarczyć wartościowych informacji niezbędnych do racjonalnego zaplanowania i kontynuacji badań właściwości farmakologicznych na modelach *in vivo* oraz wprowadzenia do stosowania nowych roślinnych preparatów leczniczych.

Ocena celu pracy i metodologii badań służącej do rozwiązania podjętych problemów

W ocenianej rozprawie, autorka podjęła się ambitnego zadania, polegającego na kompleksowym przebadaniu kilku surowców i wyizolowanych z nich związków pod względem oddziaływania na kilku poziomach immunologicznej odpowiedzi na infekcję bakteryjną. Począwszy od rutynowego sprawdzenia cytotoksyczności wobec pierwotnej hodowli neutrofilii, poprzez ekspresję białek i wydzielanie prozapalnych mediatorów, aż po oddziaływanie z wybranymi kluczowymi punktami sygnałów komórkowych. Oprócz umiejętności otrzymywania, prowadzenia i przygotowania próbek z kultur komórek oraz izolacji frakcji subkomórkowych, wymagało to zastosowania kilku specjalistycznych technik, takich jak cytometria przepływowa, mikroskopia immunofluorescencyjna, elektroforeza i immunoblotting. Ciekawym uzupełnieniem tych badań było wprowadzenie eksperymentu wykorzystującego fagocytozę cząstek lateksowych oraz wyznakowanych fluorochromem bakterii, co umożliwiło wnikliwą analizę funkcji fagocytarnych u makrofagów pod wpływem jednego z seskwiterpenów. To ostatnie zagadnienie jest w moim przekonaniu zbyt rzadko ujmowane w badaniach immunomodulującego wpływu produktów naturalnych, więc prace doktorantki powinny przyczynić się do większego zainteresowania tym zjawiskiem. Podsumowując, Autorka wykorzystwała rozległy i nowoczesny warsztat badawczy biologii komórki, udowadniając w ten sposób swoje szerokie kompetencje, skrupulatność i zdolności opanowania szerokiego wachlarza metod *in vitro*.

Techniczna i edytorska ocena oraz uwagi do układu rozprawy

Ogółem, praca w formie typowego wydruku obejmuje 103 strony. W pracy zamieszczone są ilustracje w liczbie 9 oraz 10 tabel. Praca napisana jest językiem fachowym i zwięzłym. Zwraca uwagę oszczędne użycie zawitych form gramatycznych, co przypomina styl naukowy języka angielskiego. Autorka posiada umiejętność prostego formułowania myśli i wyjaśniania przebiegu wykonywanych czynności. Pomyłki się zdarzają, ale nie są liczne – w postaci np. zdania zaczynającego się „By określić potencjał...” (str. 8). Zdarza się także żargon, np. „przenoszono do eppendorfów”.

Praca podzielona została na niezbyt obszerną część wstępną, zatytułowaną „Część teoretyczna”, w której Autorka omawia zagadnienia infekcji górnych dróg oddechowych, stanów zapalnych oraz

odpowiedzi immunologicznej. Rozważania te zostały zilustrowane kolorowym schematem anatomii dróg oddechowych. Następnie, na 4 stronach opisane zostały zastosowania wybranych ziół i ziołowych preparatów leczniczych w łagodzeniu objawów i leczeniu infekcji bakteryjnych górnych dróg oddechowych. W osobnych sekcjach ze śródtytułami, z niezupełnie zrozumiałych przyczyn, wyodrębniono kilka kategorii farmakologicznych, jak np. działanie przeciwzapalne i immunomodulujące, antyseptyczne, wykrztuśnicze, spazmolityczne, osłaniające. Problem w tym, że w opisach konkretnych ziół i substancji roślinnych, te aktywności się nakładają i powtarzają (najczęściej spazmolityczne wywoływane przez flawonoidy). Wymienienie wśród surowców spazmolitycznych tylko *Chelidonium majus* jest nadmiernie arbitralne, szczególnie w kontekście astmy oskrzelowej, która nawet nie jest „schorzeniem górnych dróg oddechowych”.

W następnym rozdziale, pod tytułem „Cel pracy”, Autorka wyjaśnia cel ogólny, którym ma być uzasadnienie stosowania wybranych surowców roślinnych w leczeniu chorób układu oddechowego, poprzez opisanie mechanizmów działania ekstraktów i związków na modelach komórkowych *in vitro*. Na prostym schemacie (ryc. 3) jest przedstawiony zamysł Autorki sukcesywnego zawężania i pogłębiania badań wychodząc od szeroko sformułowanego celu, aż do wytypowania najaktywniejszej substancji do dokładnego zbadania.

Następnie, Autorka wymienia kilkanaście celów szczegółowych, które są w zasadzie zadaniami badawczymi, do wykonania w ramach realizacji celu ogólnego. Zbędne wydaje się rozpoczęcie tego rozdziału od powtórzenia oczywistych informacji o patogenezie stanów zapalnych, które zostały już omówione w tzw. Części teoretycznej.

Kolejne rozdziały, odnoszą się już konkretnie do wykonywanych doświadczeń: Materiały i Metody (rozdz. 3), Wyniki (rozdz. 4), Dyskusja (rozdz. 5) oraz Wnioski (rozdz. 6).

W rozdziale Materiały i Metody, opisane są po kolei: źródło materiału roślinnego i czystych substancji, wzorcowe szczepy bakterii, użyte do badań działania antybakteryjnego, a także scharakteryzowane modele komórkowe – neutrofile krwi obwodowej, HUMVEC, THP-1 oraz warunki ich hodowli. Następny podrozdział to lista wykorzystanych odczynników i podłoży hodowlanych – są one wymienione w kolejności chyba przypadkowej, a w każdym razie według niejasnego klucza – lepszym byłby jednak układ alfabetyczny.

Bardzo dokładny jest następujący później opis metodyki doświadczeń bioaktywności – cytotoksyczności, ekspresji białek CD, wydzielania cząsteczek prozapalnych, wpływu na wybrane szlaki sygnałowe komórkowe, apoptozy, adhezji, fagocytozy, a na koniec także hamującego proliferację bakterii. Cały rozdział Materiały i Metody, liczący 26 stron, jest najobszerniejszą częścią rozprawy, ale dzięki temu procedury eksperymentalne są opisane tak dokładnie, że mogą stanowić podstawę do ewentualnego powtarzania i weryfikacji badań. Podkreślić trzeba, że pod względem zakresu badań bioaktywności, szczególnie na modelach komórkowych, rozprawa jest wybitnie bogata i wielostronna.

Opis wyników jest także bardzo wyczerpujący, z wartościami zmierzonymi podanymi w sześciu tabelach, prawidłowo i jasno podpisanych. Jednak w tabelach przechodzących na kolejną stronę, dobrze byłoby powtórzyć tytuł tabeli i wiersz z tytułami kolumn. Tabela 7 niepotrzebnie przechodzi na następną stronę, bo bez problemu zmieściłaby się. Podobnie legenda do tabeli 9, przeskoczyła na górę kolejnej strony.

Pozytywnie oceniam pomysł, aby tytuły podrozdziałów sformułować w stylu wniosków – np. „Eupatoriopikryna hamuje aktywność kinaz ...” zamiast suchego „Wpływ eupatoriopikryny na aktywność kinaz ...” itp. Z kolei, ilustracyjny materiał w rozdziale wyniki jest dawnowany dość ascetycznie, bowiem zamieszczono tylko 4 ryciny w samych „Wynikach”, w oszczędnym stylu typowym dla gotowych artykułów w czasopiśmie. W rozprawie doktorskiej nie ma jednak takich ograniczeń, więc dodanie, nawet w formie załącznika, większej liczby wydruków z FC, czy atrakcyjnych wizualnie mikrofotografii fluorescencyjnych, np. na wyższych powiększeniach, nie zaszkodziłoby.

W obszernej Dyskusji, autorka posłużyła się dwoma własnymi rysunkami, dla zilustrowania

wpływu eupatoriopikryny na prozapalne i przeciwbakteryjne funkcje komórek układu odpornościowego, którą to inicjatywę należy mocno pochwalić.

Wnioski są sformułowane w postaci sześciu głównych tez, dobrze popartych wynikami oraz dodatkowo wyjaśnionych pod każdym z sześciu punktów. Merytorycznie, byłoby zrzęczniejsze dać wnioski nr 4 i 5 na koniec, z jednoczesną zamianą kolejności. Oprócz typowo znajdowanych w rozprawach doktorskich Wniosków, Autorka sporządziła też osobny rozdział – Elementy nowości, w którym podejmuje próbę podkreślenia tych aspektów pracy, które nie były wcześniej znane i opublikowane.

W pracy zaprezentowano też publikacje, w których zawarto część badań tej rozprawy. Są to prace w najbardziej renomowanych czasopismach naukowych z zakresu fitochemii i fitoterapii – J Nat Prod i J Ethnopharmacol. Jedna publikacja, częściowo wykorzystana w rozprawie ukazała się w J Supercrit Fluids, bowiem obejmowała oryginalną metodę ekstrakcji spilantolu z *Acmella oleracea*, oraz jego działanie przeciwzapalne *in vitro*. W publikacjach tych zwracają uwagę zespoły autorów z ośrodków naukowych w Polsce i kilku krajach Europy. Świadczy to o umiejętności autorki odnajdywania się we współpracy międzynarodowej i krajowej, oraz łączenia rozmaitych aspektów badawczych.

W spisie literatury odnajdujemy 202 pozycje, moim zdaniem za dużo, jak na zakres pracy i jej tematykę. Część pozycji, takich jak 201, czy liczne prace ogólne o procesach zapalnych można było pominąć. Na końcu, znajduje się Aneks (niepotrzebnie numerowany jako rozdział 10) z fotografią okazu zielnikowego *E. cannabina* oraz wzorami chemicznymi badanych związków. Aneks powinien być na samym końcu, po spisach tabel i rycin.

Pozostałe uwagi krytyczne do układu i treści pracy

W odniesieniu do części pracy, które nie są praktycznym wkładem autorki, mam dwie dość istotne uwagi krytyczne:

1. Tytuł pracy jest bardzo ogólnikowy, określenie „wybrane związki” budzi wątpliwości, co do kryteriów wyboru, a w sytuacji gdy wszystkie, z wyjątkiem spilantolu są terpenoidami, może lepiej byłoby w ogóle wyłączyć spilantol z rozprawy, tym bardziej, że nie działał spektakularnie. Tak samo bioaktywność, która ograniczała się do przeciwzapalnej/immunomodulującej i fagocytarnej. Bardziej prostolinijny i konkretny mógłby być np. taki: Aktywność przeciwzapalna i badania mechanizmów działania wyciągów i terpenoidów z wybranych roślin leczniczych rodziny Asteraceae.

2. W pracy brakuje wyraźnego uzasadnienia dla mocno rozbudowanego opisu medycznej strony schorzeń górnych dróg oddechowych. Poświęcenie praktycznie całej części teoretycznej na charakterystykę patofizjologiczną infekcji i reakcji odpornościowych nie odzwierciedla, ani nie zapowiada faktycznego zakresu badań, skądinąd oryginalnych i wnoszących wiele do nauki. W wyniku lektury tej części, nie można domyślić się intencji Autorki, co do problemu badawczego, który w zasadzie formułuje i rozwiązuje ona dopiero na etapie dyskusji. Brakuje natomiast we Wstępie wyczerpującej charakterystyki badanych roślin oraz ich składników.

Mam jeszcze nieco drobnych uwag do angielskiego streszczenia:

I. helenium common name in English isn't great Oman (it would rather refer to an Arab Peninsula Sultanate). It's simply 'Elecampane'. *G. squarrosa* is rather 'curlycup gumweed' (check for example <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=GRSQ>). Further, 25-100 µg/mL isn't a 'wide' concentration range. I'd rather say it's narrow for a typical bioassay.

Wymienione braki, nieścisłości i omyłki mają w większości charakter terminologiczny, techniczny lub edytorski, więc nie obniżają wysokiej wartości merytorycznej tej rozprawy. Powinny być jednak uwzględnione w przygotowaniu do obrony oraz przyszłych publikacjach autorki.

Uwagi merytoryczne do eksperymentalnej części rozprawy

Część eksperymentalna, na którą składają się wymienione powyżej rozdziały, jest najobszerniejsza, stanowiąc objętościowo niemal 2/3 całości i jest to w rozprawach tego typu bardzo pozytywna cecha.

W charakterystyce materiału badawczego (tabela 2) brakuje bliższych informacji o surowcach zakupionych na rynku, w jakiej formie był surowiec, jakie opakowanie, data produkcji/ważności, nr serii, oraz czy była przeprowadzona jakaś weryfikacja tożsamości i czystości materiału? Nie można także w tym rozdziale odnaleźć procedury sporządzania ekstraktów – jedyną informacją jest o użytym rozpuszczalniku (60% etanol). Tak samo, niewystarczające są informacje o szczepach bakterii, skąd kupione/pozyskane i co to są za numery szczepów klinicznych?

Podając warunki wirowania powinno się także sprecyzować przyspieszenie (g), a nie tylko prędkość obrotową wirówki).

Rzetelne opisy metod testowania bioaktywności i oddziaływania z sygnałami komórkowymi już powyżej pochwalilem. Niemniej, przy metodzie 3.4.5 Wydzielanie elastazy, nie widać sposobu gwarantującego, że oznaczane jest hamowanie właśnie 'wydzielania' a nie również aktywności enzymu. A wiele produktów naturalnych hamuje właśnie aktywność enzymatyczną elastazy. Jako kontrolę wykluczającą ten mechanizm, należałoby przeprowadzić próbę hamowania wolnego enzymu w odpowiednim układzie bezkomórkowym.

W podrozdziałach 3.4.9 i 3.4.10 podano dodawane ilości aneksyny, PI i TNF- α w mikrolitrach, zmuszając czytelnika do przeliczania, na przykład z ostatecznego stężenia (10 ng/mL) TNF- α . Ponadto dla ścisłości, należałoby jednak napisać „stymulowano 10 μ L roztworu TNF- α ”, a nie „10 μ L TNF- α ”.

Podrozdział 3.4.11: nie opisano w jaki sposób przeliczano „ilość” bakterii z gęstości optycznej (λ). Ponadto, co Autorka miała na myśli pisząc „cząstka patogenu”? W podrozdziale 3.4.12, w opisie znakowania gronkowca należy uzupełnić nazwę „kwasu karboksylowego”. W podrozdziale 3.4.16, nie jest wyjaśnione jak stwierdzano, czy bakterie rosną? Poza tym, z wyników zrozumiałem, że nie wyznaczano MIC, więc po co w ogóle ten opis? W tym miejscu miałbym wątpliwość co do testu krążkowo-dyfuzyjnego – mianowicie czy zastosowane stężenia nie były za niskie (1 μ M w porównaniu z 50 μ M klarytromycyny)?

W podrozdziale 4.4 Wyników, mam wątpliwości czy apoptozę można nazwać mechanizmem molekularnym – jest to raczej mechanizm komórkowy, a mówić można o mechanizmach molekularnych apoptozy (np. ekspresja odpowiednich białek sygnałowych czy hydrolitycznych). Same molekularne mechanizmy apoptozy nie były jednak w pracy badane. W tabeli 7 trochę niepokojące są wysokie wartości błędów w proporcji komórek żywych dla klarytromycyny i eupatoriopikryny w 0.25 μ M (odpowiednio 49.8 \pm 14.3 i 42.4 \pm 18.0). W charakterystyce linii THP-1, niejasne jest jaki związek ma dla przeprowadzonych badań posiadanie markerów uprawniających do badań nad mechanizmami zewnątrzkomórkowego zabijania patogenów?

Do dyskusji, przeprowadzonej wyczerpująco i uwzględniającej wiele aspektów praktycznych mam jedno zastrzeżenie, nie licząc znowu zbędnego moim zdaniem powtarzania oczywistości o przebiegu stanu zapalnego w infekcjach układu oddechowego i roli fitoterapii, które bardziej pasują do Wstępu. Chodzi o powierzchowne potraktowanie mechanizmów molekularnych stwierdzonych wielokierunkowych działań badanych wyciągów i terpenoidów, szczególnie eupatoriopikryny. Oczywiście jest, że na obecnym etapie badań byłyby to raczej hipotezy, ale warto byłoby choćby porównać badane związki do innych produktów naturalnych o podobnym działaniu, czy nie wiadomo o nich więcej, np. w jaki sposób oddziałują z białkami, czy błonami. Nie można też wykluczyć działania pośredniego i plejotropowego. Najciekawsze wydaje się zastanowienie się, jak prosty związek o niskiej masie cząsteczkowej może wywierać tak specyficzny efekt jak pobudzanie fagocytozy. Z pewnością pogłębione refleksje, wychodzące poza stwierdzenia o takim czy innym działaniu, sprzyjałyby inspirującemu efektowi tej świetnej i kompleksowej metodycznie i technicznie dysertacji.

Najważniejsze osiągnięcia eksperymentalnej części pracy doktorskiej

- Udowodnienie, że eupatoriopikryna pobudza makrofagi do fagocytozy, prowadząc do efektywnego zabijania gronkowca złocistego;
- Wykazanie modulującego wpływu eupatoriopikryny na ekspresję białek powierzchniowych, degranulację, wydzielanie mediatorów prozapalnych, aktywację kaskady sygnalizacyjnej aktywowanej mitogenami MAPK i translokację podjednostki p65 oraz apoptozę) i prozapalne funkcje komórek śródbłonka (ekspresja białek powierzchniowych i adhezję neutrofilii do śródbłonka
- Odkrycie wpływu alantolaktonu, kwasu grindeliowego i spilantolu na prozapalne funkcje neutrofilii, w tym ekspresję białek powierzchniowych uczestniczących w migracji i adhezji do śródbłonka naczyniowego

Wnioski końcowe

Wszystkie wyszczególnione powyżej uwagi krytyczne i niedoskonałości, mają jednak charakter marginalny i są łatwe do usunięcia albo wyjaśnienia. Nie zmieniają faktu, iż od strony wartości naukowej praca jest znakomita. Dobrze zaplanowane, przeprowadzone i wnikliwie zinterpretowane eksperymenty przynoszą dużo informacji wzbogacających wiedzę o możliwości wykorzystania kilku surowców roślinnych jako źródeł substancji leczniczych o działaniu przeciwzapalnym i wzmacniającym odporność nieswoistą.

Załączona lista publikacji pozwala zauważyć także umiejętność publikowania wyników oraz pracy zespołowej, będących podstawą funkcjonowania w świecie nauki. Mimo moich zastrzeżeń, co do rozłożenia akcentów w części teoretycznej i dyskusji, Autorka udowadnia gruntowną wiedzę, a wręcz fascynację procesami zapalnymi i reakcjami immunologicznymi na infekcje bakteryjne.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska, autorstwa pani mgr Barbary Gierlikowskiej, w pełni kwalifikuje się do przyjęcia przez Radę Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, zgodnie z wymogami odpowiednich przepisów (w tym aktualnej ustawy 'Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce'), określających warunki stawiane rozprawom doktorskim na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. **Dlatego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie pani mgr Barbary Gierlikowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.**

Wrocław, 7. listopada 2020 r.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA BIOLOGII I BOTANIKI FARMACEUTYCZNEJ


prof.dr hab. Adam Matkowski