



Katedra Farmakognozji i Molekularnych
Podstaw Fitoterapii
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. 22 5720953
e-mail: jakub.piwowarski@wum.edu.pl

Warszawa dnia 15 lipca 2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Natalii Marcińczyk

"Wpływ ekstraktu z kłącza *Potentilla erecta* na proces zakrzepowy i układ
hemostazy w modelu zwierzęcym"

Promotor: dr hab. n. farm. Michał Tomczyk

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Anna Gromotowicz-Popławska

Praca wykonana w Zakładzie Biofarmacji i Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w
Białymstoku

Rośliny lecznicze stosowane w tradycyjnej medycynie ludowej są cennym materiałem badawczym do prowadzenia poszukiwań nowych leków. Laureatka Nagrody Nobla w 2015 roku w dziedzinie medycyny i fizjologii Tu Youyou, badając rośliny stosowane w tradycyjnej medycynie chińskiej wyizolowała z ziela bylicy rocznej lakton seskwiterpenowy - artemizyninę, która jest skutecznym lekiem stosowanym obecnie przeciwko lekoopornym postaciom malarii. Mimo faktu, że wiele wykorzystywanych we współczesnej medycynie substancji leczniczych (tj. digoksyna, morfina, kolchicina, winkrystyna) zostało po raz pierwszy wyizolowanych z roślin, europejska medycyna ludowa z uwagi na rozwój medycyny opartej na lekach syntetycznych, w ostatnich dekadach straciła na znaczeniu. Zdarza się również, że poszukiwanie aktywnych farmakologicznie substancji w materiale roślinnym niesłusznie bywa uznawane za działanie para-naukowe. Tymczasem dynamiczny rozwój metod badawczych umożliwia obecnie w pełni naukowe i krytyczne podejście do roślin leczniczych oparte na najnowszych strategiach analitycznych oraz modelach oceny aktywności biologicznej, co w rezultacie daje szerokie możliwości odkrycia nowych leków.

W obszarze leku pochodzenia naturalnego można dostrzec wiele dysonansów i paradoksów, które znacznie utrudniają zarówno prace badawcze nad lekiem pochodzenia roślinnego jak i fitoterapię opartą na dowodach naukowych. Z jednej strony lekarze kwestionujący skuteczność leków pochodzenia roślinnego i tym samym unikający ich przepisywania, którzy, co znamienne, bardzo często nieświadomie zalecają stosowanie leków mających w swoim składzie przetwory roślinne bądź izolowane z roślin związki. Znajdujący się na drugim biegunie bezkrytyczni entuzjaści fitoterapii, którzy upatrują w leku roślinnym panaceum, nie zważając na naukowe podstawy farmakodynamiki, farmakokinetyki i toksykologii. Wśród naukowców zajmujących się lekiem roślinnym można natomiast często zaobserwować brak krytycznego podejścia do otrzymywanych wyników i nieracjonalne przypisywanie aktywności terapeutycznych w oparciu o tak niespecyficzne badania jak wymiatanie wolnych rodników czy ocena cytotoksyczności *in vitro* wobec komórek nowotworowych dla związków występujących w żywności funkcjonalnej. Ze strony pacjentów ogromnym problemem jest lawinowo rosnąca popularność suplementów diety opartych o przetwory roślinne o niekontrolowanym składzie i dowolnie przypisywanych właściwościach, których zasadniczo nawet nie tyle problemem jest brak aktywności, co częste zafałszowania oraz istotne ryzyko interakcji z przyjmowanymi przez nich lekami.

Powyższe zjawiska tworzą otoczenie w znaczący sposób utrudniające opartą na Popperowskiej zasadzie falsyfikacji pracę naukową nad poszukiwaniem nowych aktywnych związków czy ich mieszanin, które potwierdziłyby lub podważyłyby przypisywaną tradycyjnie skuteczność poszczególnych surowców roślinnych w konkretnych jednostkach chorobowych oraz stały się podstawą do opracowania nowych leków. Dlatego, choć znacznie utrudnione, bardzo ważne jest prowadzenie rzetelnych prac badawczych nad surowcami roślinnymi, które uwzględniają zarówno kontrolę jakości badanego surowca i jego przetworów oraz operują modelami badawczymi pozwalającymi na rzetelną weryfikację postawionych hipotez. Przetawiona do recenzji dysertacja wpisuje się w bardzo aktualny nurt badań uwzględniających zarówno analizę fitochemiczną roślinnych surowców leczniczych jak i ocenę ich aktywności biologicznych na modelu *in vivo* w kontekście konkretnych zagadnień terapeutycznych.

Przedstawiona rozprawa doktorska zgodnie z przepisami Ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.) została złożona do oceny w formie monografii. O znaczeniu i jakości badań przeprowadzonych w ramach rozprawy świadczy ich częściowe opublikowanie w formie dwóch artykułów oryginalnych w recenzowanych czasopismach naukowych z listy JCR: *Frontiers in Pharmacology* oraz *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. W obu artykułach Doktorantka występuje jako pierwsza Autorka. Według zadeklarowanych udziałów w pierwszym artykule odpowiedzialna była za przeprowadzenie eksperymentów, analizę danych oraz napisanie manuskryptu. W ramach drugiego artykułu zaprojektowała badanie, wykonała eksperymenty, analizowała dane oraz napisała manuskrypt. Świadczy to o wiodącej roli Doktorantki w opublikowanych pracach. Wyniki badań zostały ponadto zaprezentowane na pięciu konferencjach krajowych i zagranicznych z dziedziny kardiologii, farmakologii i leku roślinnego. Na szczególną uwagę, zasługuje fakt, że część badań została sfinansowana ze źródeł zewnętrznych w ramach projektu Preludium 14 „Wpływ ekstraktu z kłącza *Potentilla erecta* na hemostazę w cukrzycy typu 1” (nr projektu: 2017/27/N/NZ7/02335), którego mgr Marcińczyk była kierowniczką.

Wstęp do pracy stanowi przegląd literatury dotyczący układu hemostazy w warunkach fizjologicznych oraz specyficznie w przebiegu cukrzycy typu I. Następnie Autorka po krótko omawia badany surowiec- kłącze pięciornika pod kątem zastosowania i aktywności biologicznych. Następne części wstępu poświęcone są dwóm grupom związków dominujących w badanym ekstrakcie- elagotanimom i procyanidynom oraz badaniom dotyczącym ich metabolizmu i aktywności biologicznych zorientowanych na układ hemostazy. Niestety badania dotyczące składu surowca zostały przez Autorkę podsumowane jednym zdaniem i tak istotne informacje jak konkretne związki dotychczas wykryte w surowcu oraz zawartość poszczególnych grup związków nie zostały uwzględnione. Zdaję sobie sprawę, że zaplanowane badania są nieco obok wskazań do stosowania badanego surowca i ich kierunek, co słuszne, wynika z charakteru konkretnych związków w nim stwierdzonych, jednak zarówno monografia farmakopealna jak i monografia EMA powinny zostać uwzględnione we wstępie.

Pani mgr Marcińczyk mając na uwadze dotychczasowe badania nad profilem aktywności związków zawartych w ekstrakcie z kłącza pięciornika kurze ziele postawiła sobie za cel zbadanie działania doustnie podawanego ekstraktu w układzie hemostazy u zwierząt zdrowych i z cukrzycą. Doktorantka wykorzystwała do tego celu szeroki panel metod służących określeniu wpływu na poszczególne elementy układu hemostazy: płytki krwi, układ krzepnięcia, układ fibrynolizy oraz funkcje śródbłonna. Biorąc pod uwagę informacje odnośnie tradycyjnego zastosowania kłącza pięciornika, dane na temat aktywności biologicznych występujących w jego kłączu związków dostępne w literaturze oraz potrzebę opracowania nowych strategii profilaktycznych związanych z prewencją wystąpienia powikłań zakrzepowo- zatorowych, postawiony cel jest wysoce uzasadniony. O ile ogólny cel prowadzonych badań jest jasno sformułowany i spójny z zaplanowanymi eksperymentami, o tyle brakuje mi precyzyjnie postawionych szczegółowych hipotez badawczych, których weryfikacja byłaby bezpośrednim odwołaniem do otrzymanych wyników i wysnutych wniosków. Hipotezy te można co prawda częściowo wydedukować z omówienia wyników, jednak ich postawienie na

początku pracy znacznie ułatwiłoby podążanie za rozumowaniem Autorki i weryfikację osiągniętych rezultatów.

W celu osiągnięcia postawionego celu badawczego Doktorantka wykorzystwała metody z zakresu fitochemii- przygotowanie ekstraktu, analiza LC-MS; badań aktywności farmakologicznej- przeprowadzone badania *in vivo* i *ex vivo* na szczurach i myszach uwzględniające wpływ badanego ekstraktu na: zakrzepicę tętniczą indukowaną prądem elektrycznym, zakrzepicę żylną, ciśnienie skurczowe i rozkurczowe, czas krwawienia, zakrzepicę indukowaną FeCl_3 , zakrzepicę indukowaną laserem. W swojej pracy Doktorantka wykorzystywała również techniki biologii molekularnej i oznaczenia biochemiczne do oceny wpływu wyciągu na sekrecję P-selektyny, ekspresję czynnika tkankowego, agregację płytek krwi indukowanej kolagenem, dynamiczną generację tromboksanu w krwi pełnej, aktywność prokoagulacyjną płytek krwi, parametry koagulologiczne w osoczu, gęstość sieci fibryny w skrzepie powstałym z osocza, czas lizy skrzepu euglobulin w osoczu, stężenie i aktywność t-PA, PAI-1, plazminogenu w osoczu, stężenie NO_2^- i NO_3^- , 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{TNF}\alpha$, bradykininy, morfologię. W mojej ocenie metody zostały dobrane prawidłowo i świadczą o opanowaniu przez Doktorantkę szeregu nowoczesnych technik badawczych, szczególnie z zakresu badań na zwierzętach i umiejętności ich doboru i wykorzystania do weryfikacji stawianych hipotez. Ciekawym zabiegiem jest uwzględnienie w niektórych oznaczeniach zarówno myszy jak i szczurów, co pozwala na weryfikację wyników i pewne uniezależnienie poczynionych obserwacji od specyfiki gatunkowej. Ze strony fitochemicznej pozostaje pewien niedosyt, gdyż ogranicza się ona jedynie do podania czasów retencji i wartości m/z jonów pseudomolekularnych oraz fragmentacyjnych połączonych z bardzo krótkim ich omówieniem. Autorka nie podała również na jakiej podstawie identyfikowane były związki. Biorąc pod uwagę zastosowany spektrometr masowy z pomiarem czasu przelotu, zastanawia niska dokładność z jaką zostały podane wartości m/z. Mnie jako recenzentowi zdecydowanie brakuje załączonego chromatogramu, czy to UV czy MS, który pozwoliłby lepiej ocenić profil występujących związków oraz oszacować proporcje pomiędzy oznaczonymi związkami. Autorka sama dostrzega jednak te ograniczenia w pracy i ustosunkowuje się do nich po przeprowadzonej dyskusji. Zdaję sobie sprawę, że jest to praca skupiona głównie na badaniach *in vivo*, jednak biorąc pod uwagę fakt, że *Tormentillae rhizoma* jest surowcem farmakopealnym, celowe byłoby przeprowadzenie jego podstawowej standaryzacji w oparciu o monografię, mimo, że surowiec został dostarczony przez rzetelnego producenta. Znacznie ułatwiłoby to zestawianie wyników otrzymanych w przyszłości przez chcącą kontynuować podjęty temat Doktorantkę lub przez inne zespoły badawcze. Do metodologii badań *in vivo* mam tylko jedno zastrzeżenie dotyczące braku opisu metody użytej do określenia liczebności badanych grup zwierząt. Rangę otrzymanych wyników znacznie podniosłoby uwzględnienie oznaczenia metabolitów garbników produkowanych przez mikrobiotę jelitową w osoczu lub moczu zwierząt, z czego jednak Doktorantka zdaje sobie sprawę poruszając to zagadnienie zarówno we wstępie jak i w dyskusji.

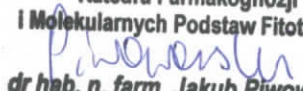
Wyniki badań *in vivo* zostały przedstawione w sposób klarowny i po krótko omówione. Doktorantka wykazała, że wyciąg zmieniał aktywność układu hemostazy zarówno u zdrowych myszy i szczurów jak i u myszy i szczurów z indukowaną cukrzycą, przy czym aktywność wyciągu była silniej zaznaczona u zwierząt z wywołaną cukrzycą. Jak pokazały badania fizjologiczne i biochemiczne obserwowane efekty zależały od wielotorowego wpływu ekstraktu z kłącza pięciornika kurze ziele na

układ hemostazy i dotyczyły modulowania aktywności płytek krwi, układu krzepnięcia i fibrynolizy, ściany naczyń oraz dynamiki i zakresu formowania zakrzepu *in vivo*. Otrzymane wyniki nie pozwoliły jednak jednoznacznie potwierdzić, ani zaprzeczyć stawianej hipotezie dotyczącej przeciwwzakrzepowego działania związków występujących w badanym surowcu. Mimo swojej niespójności- brak jednoznacznych dowodów wskazujących ani na działanie przeciwwzakrzepowe ani prokoagulacyjne otrzymane wyniki implikują jednak, że podawanie wyciągu wywołuje pewne istotne zmiany w funkcjonowaniu układu krzepnięcia u badanych zwierząt. Doktorantka dostrzega ten potencjał i stwierdza, że konieczne są dalsze badania, które pomogą wyjaśnić zasadność stosowania badanego surowca w pierwotnej i wtórnej profilaktyce incydentów zakrzepowo-zatorowych. Niestety nie zostały przez doktorantkę poruszone aspekty toksykologiczne otrzymanych wyników. Obserwowane na niektórych modelach działanie prokoagulacyjne może mieć szczególne znaczenie jako przeciwwskazanie lub działanie niepożądane istotne dla osób z podwyższonym ryzykiem wystąpienia incydentów zatorowo-zakrzepowych przyjmujących doustnie kłącze pięciornika w celu wspomagania leczenia biegunki lub stanów zapalnych jelit.

Przedstawiona do oceny praca stanowi bardzo ważny wkład w rozumienie aktywności biologicznej doustnie przyjmowanego ekstraktu z kłącza pięciornika. Mimo, że hipotezy badawcze nie zostały jednoznacznie potwierdzone, przedłożona do oceny praca doktorska stanowi bardzo cenny wkład w rozumienie efektów biologicznych doustnie przyjmowanych surowców roślinnych i ich przetworów, gdyż przetwory z kłącza pięciornika są przyjmowane przez pacjentów, a dotychczas ich wpływ na proces krzepnięcia i układ hemostazy oraz jego mechanizmy nie zostały określone.

Podsumowując, jednoznacznie stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska mgr farm. Natalii Marcińczyk jest niezwykle wartościowa zarówno z naukowego jak i z klinicznego punktu widzenia. Wnoszę tym samym do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr farm. Natalii Marcińczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauk farmaceutycznych.

Katedra Farmakognozji
i Molekularnych Podstaw Fitoterapii


dr hab. n. farm. Jakub Piwowski

dr hab. n. farm. Jakub Piwowski