

Łódź, dnia 15 lipca 2020

dr hab. n. farm. Magdalena Jasińska-Stroschein

Zakład Biofarmacji, Katedra Biofarmacji

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr farm. Natalia Marcińczyk

**pt. „Wpływ ekstraktu z kłącza *Potentilla erecta*
na proces zakrzepowy i układ hemostazy w modelu zwierzęcym”**

Przedstawiona do recenzji praca wykonana pod kierunkiem Pana dr hab. n. farm. Michała Tomczyka (promotor pomocniczy: dr n. farm. Anna Gromotowicz-Popławska) w Zakładzie Biofarmacji i Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku dotyczy oceny wpływu ekstraktu z kłącza pięciornika kurze ziele (*Potentilla erecta*) – PER, na układ hemostazy i proces zakrzepowy. Przesłankę do prowadzonych badań stanowiły wcześniejsze doniesienia potwierdzające właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne ekstraktu – istotne w aspekcie działania przeciwwakrzepowego z uwagi na udział mediatorów stanu zapalnego (IL-6, TNF α), czy metabolitów kwasu arachidonowego. Była nią także wieloletnia tradycja miejscowego stosowania preparatów zawierających w swoim składzie płynny wyciąg z kłącza pięciornika m in. w celu złagodzenia zmian ropnych i stanów zapalnych skóry, a wykorzystujące działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i ściągające.

Poszukiwanie nowych substancji dla zastosowania w profilaktyce i leczeniu powikłań zatorowo-zakrzepowych stanowi istotny problem kliniczny. Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa (ŻChZZ), pod postacią zakrzepicy żył głębokich kończyn dolnych i jej najgroźniejszego powikłania – zatorowości płucnej, jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów z powodów sercowo-naczyniowych, której można też zapobiec poprzez przestrzeganie zaleceń profilaktyki. Wybór tematyki pracy uważam za ważny i celowy zarówno w punktu widzenia badawczego jak i praktyki klinicznej. Potwierdza go także brak doniesień ukazujących kompleksowe działanie wyciągu na poszczególne elementy układu hemostazy.

Dokonując oceny formalnej rozprawy należy stwierdzić, że licząca 111 strony dysertacja posiada układ typowy, na który składają się kolejno: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Piśmiennictwo, Spis rycin i tabel. Właściwą część pracy poprzedza strona tytułowa, dorobek naukowy Doktorantki, szczegółowy

spis treści oraz wykaz skrótów zestawiony w porządku alfabetycznym. Całość pracy uzupełnia 8 tabel i 30 rycin.

We wstępie do rozprawy Doktorantka opisała procesy hemostazy, przypomniawszy powszechnie znany kaskadowy model krzepnięcia krwi z dwoma szlakami: zewnątrzpochodnym i wewnątrzpochodnym, jak i obecnie funkcjonujący komórkowy model krzepnięcia. W kontekście zapewnienia równowagi hemostatycznej, kolejny podrozdział poświęciła roli śródbłonna naczyniowego z kluczowym udziałem tlenku azotu (NO), prostacykliny (PGI₂) i ektoenzymów, czy też tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA) – w aspekcie regulacji fibrynolizy. Dalej zwróciła uwagę na rolę hiperglikemii i przewlekłego stanu zapalnego w przebiegu cukrzycy 2, a zwłaszcza typu 1 – jako czynników zwiększających ryzyko wystąpienia powikłań zakrzepowo-zatorowych. Uzasadniając dobór modelu badawczego (model zwierzęcy cukrzycy typu 1 indukowanej streptozotocyną) Doktorantka szczegółowo opisała wpływ hiperglikemii na zachwianie równowagi oksydo-redukcyjnej i stres oksydacyjny – przyczyniające się do upośledzenia funkcjonowania układu hemostazy, a także funkcję układu krzepnięcia i fibrynolizy w przebiegu cukrzycy typu 1. Zwróciła uwagę na pewne cechy modelu, które mogą odpowiadać za zniesienie spodziewanego działania przeciwwakrzepowego ekstraktu, jak nasilenie generacji fibryny, czy zwiększona aktywność płytek krwi. W ostatnich podrozdziałach Doktorantka skupiła się na podsumowaniu dotychczasowej wiedzy o aktywności biologicznej ekstraktu z pięciornika kurze ziele uwarunkowanej obecnością dużej ilości związków polifenolowych, garbników pochodnych kwasu elagowego, proantocyjanidyn oraz triterpenów. Opisała szeroko wyniki dotychczasowych badań *in vitro* i *in vivo* oceniających wpływ elagotanin i procyanidyn na układ hemostazy, w tym ich działanie przeciwwakrzepowe – badane w zwierzęcym modelu zakrzepicy żyłnej i tętniczej.

Po lekturze liczącego 22 strony Wstępu do rozprawy należy podkreślić, że Doktorantka dobrze orientuje się w szerokim zakresie podjętych zagadnień i zna najnowsze piśmiennictwo, o czym świadczy odniesienie się do 162 prac innych badaczy. Można w nim też znaleźć wstępne przesłanki do podjęcia się całościowej oceny działania ekstraktu w układzie hemostazy u zwierząt zdrowych i z wyindukowaną cukrzycą, jakkolwiek szczegółowe uzasadnienie odnajdziemy w pierwszych akapitach Dyskusji. W tej części rozprawy Doktorantka odniosła się do wcześniejszych badań własnych, które wprawdzie wykazały, że ekstrakt z kłącza pięciornika kurze ziele zmniejsza tętniczy proces zakrzepowy i zakrzepicę u zdrowych szczurów i myszy – w mechanizmie zależnym od hamowania aktywności płytek krwi, ale też nieznacznie nasila aktywację osoczkowego układu krzepnięcia. W tym miejscu Doktorantka przedstawiła szczegółowe cele badawcze, które dotyczyły odpowiedzi na pytania o działanie przeciwwakrzepowe składników ekstraktu w warunkach nasilonej aktywności układu krzepnięcia (model cukrzycy streptozotocynowej), jak i o mechanizmy aktywacji układu krzepnięcia, oraz fibrynolizy.

Do realizacji tak postawionych celów Doktorantka zaplanowała szeroki panel metod służących kompleksowemu przebadaniu – w kontekście aktywności biologicznej ekstraktu z kłącza *Potentilla erecta* – poszczególnych elementów układu hemostazy: wpływu PER na płytki krwi, układ krzepnięcia, fibrynolizy i śródbłonek. Metodykę badań przedstawiono szczegółowo na 15 stronach dysertacji. Cennym uzupełnieniem tej części pracy jest podrozdział 14 (Podsumowanie metod) wraz z Tabelą 2. Zebranie informacji dotyczących badanej składowej układu hemostazy, zastosowanej metody, ocenianych parametrów a wreszcie wybranego modelu zwierzęcego, pozwala zorientować się w przebiegu bardzo szeroko zaplanowanych eksperymentów.

W szczegółowym ujęciu, po otrzymaniu ekstraktu i jego jakościowej analizie z wykorzystaniem rutynowo stosowanej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową (LC-MS), Doktorantka zaplanowała szereg doświadczeń z wykorzystaniem eksperymentalnych modeli zwierzęcych (normoglikemia, hiperglikemia, mysz rasy C57BL6, szczur rasy Wistar). Cele szczegółowe dotyczyły oceny procesu zakrzepowego (zakrzepica tętnicza i żylna), hemostazy pierwotnej (czas krwawienia), wybranych parametrów hemodynamicznych (ciśnienie skurczowe i rozkurczowe), sekrecji płytkowej, aktywacji płytek krwi, generacji tromboksanu, aktywności prokoagulacyjnej płytek krwi, aktywności układu krzepnięcia, funkcji naczyń, aktywności układu fibrynolizy, czy parametrów stanu zapalnego i morfologii krwi.

W badaniach z zakresu farmakologii eksperymentalnej często wykorzystuje się modele zwierzęce służące ocenie skuteczności terapeutycznej substancji. Stanowią one użyteczne narzędzie w poszukiwaniu nowych szlaków sygnałowych i wyjaśnianiu mechanizmów leżących u podstaw rozwoju chorób. Modele zwierzęce niejednokrotnie oparte na procedurach inwazyjnych pozwalają na prowadzenie badań w sposób, który byłby niemożliwy u ludzi. Oczekuje się jednak aby przyczyna i fenotyp schorzenia były odwzorowaniem przebiegu procesu chorobowego u ludzi, a także powtarzalności uzyskiwanych wyników, czy dobrego profilu bezpieczeństwa (brak toksyczności, pogorszenia przeżywalności). Doktorantka w swojej dysertacji wykorzystała dość często stosowany eksperymentalny model cukrzycy, tzw. streptozotocynowej, indukowanej przez podanie streptozotocyny – antybiotyku będącego inhibitorem replikacji DNA w różnych komórkach, w tym w komórkach β trzustki. W zależności od gatunku zwierzęcia, dawki, czy czasu i drogi podania związku można uzyskać postać ciężkiej cukrzycy (poziom glukozy we krwi przekraczający 200–300 mg/dl) – w tym przypadku STZ podaje się w dawce 50–65 mg/kg mc. dożylnie dorosłym szczurom. Dla wywołania łagodnej cukrzycy streptozotocynowej (glikemia poniżej 200–300 mg/dl) zwierzęta po urodzeniu otrzymują iniekcję podskórną związku w dawce 100 mg/kg m.c., co pozwala na późniejsze uzyskanie poziomów glukozy we krwi 120–200 mg/dl, dzięki znacznej zdolności regeneracyjnej komórek β trzustki w okresie noworodkowym. Podobne zróżnicowanie tego modelu obserwuje się w przypadku drugiego gatunku: myszy. Doktorantka wybrała pierwsze z podanych wyżej rozwiązań, kwalifikując do badania zwierzęta z hiperglikemią powyżej 300 mg/dl (szczur) oraz powyżej 150

mg/dl (mysz), z okresem indukcji trwającym odpowiednio pięć i cztery tygodnie. Opisywana toksyczność ostra streptozotocyny podawanej w dawce 50–65 mg/kg mc. – o nie do końca poznanym mechanizmie – jest skorelowana z wiekiem zwierzęcia i może powodować śmiertelność u ponad 90% osobników – otrzymujących iniekcję STZ w 18 tygodniu życia. Wykorzystanie do badania zwierząt młodych, np. 6–11 tygodniowych szczurów pozwala na znaczną redukcję śmiertelności. Podanie informacji na temat przeżywalności zwierząt jak i odsetka zaindukowanych osobników – byłoby pewnym uzupełnieniem opisu metodyki w aspekcie odtwarzalności modelu. Podobnie, jak wyjaśnienie dlaczego myszom normoglikemicznym podawano badany ekstrakt tylko przez dwa – zamiast 14 dni. A tylko z obowiązku recenzenta – prosiłabym o wskazanie, czy wszystkie z grup badanych zwierząt (normo-, hiperglikemiczne, otrzymujące wyciągi PER lub placebo) dotyczył ten sam czas obserwacji.

Doktorantka potwierdziła przydatność wybranego modelu zwierzęcego w realizacji celów badawczych; uzyskując m in. zwiększenie aktywności prokoagulacyjnej płytek krwi, nasilenie zewnątrzpochodnego układu krzepnięcia, zaburzenie fibrynolizy ($\downarrow$ t-PA, $\uparrow$ PAI-1), rozwój stanu zapalnego ($\uparrow$ TNF-alfa) czy upośledzenie funkcji naczyń.

Wydaje się, że w części opisującej metody statystyczne pominięto informację o zastosowanym teście dla porównań poszczególnych parametrów (zmiennych) w przypadku więcej niż dwie grupy, a z takim układem badawczym mamy głównie do czynienia w rozprawie. Z kolei do porównań masy ciała i stężenia glukozy we krwi myszy lub szczurów normo- i hiperglikemicznych, na początku i po upływie 14-dniowego okresu podawania PER (Tabela 5 i 6), Doktorantka prawdopodobnie zastosowała jeden z testów dedykowanych porównaniom prób powiązanych, co wydaje się, że pominięto w opisie przeprowadzonych analiz statystycznych. Trzeba przy tym zaznaczyć, że dla przedstawienia wyników pracy Doktorantka właściwie dobrała statystyki opisowe; wielu badaczy wyniki analiz testami nieparametrycznymi – opisuje średnią wraz z odchyleniem standardowym.

Do realizacji postawionych celów Pani mgr Marcińczyk opanowała szereg technik badawczych; należy w tym miejscu w pełni podkreślić i docenić ogromny wysiłek Doktorantki przy prowadzeniu tak szeroko zaplanowanych badań. Metody i techniki operacyjne zostały opisane w sposób umożliwiający ich powtórzenie. Z uwagi na schematy oparte na wielokrotnym podawaniu ekstraktów, oraz liczbę ocenianych parametrów w badaniach *in vivo* i *ex vivo*, realizowane eksperymenty były czasochłonne. Wymagały one ponadto nabycia umiejętności posługiwania się technikami inwazyjnymi, jak i stosowania szeregu procedur analitycznych, przy wykorzystaniu wysokospecjalistycznej aparatury. Niezwykle wysoko oceniam rangę i interdyscyplinarność pracy naukowej podjętej przez Doktorantkę w ramach współpracy dwóch zespołów badawczych – Zakładu Biofarmacji, kierowanego przez Panią Prof. dr hab. Ewę Chabielską oraz Zakładu Farmakognozji, kierowanego przez Pana dr hab. Michała Tomczyka.

Wyniki badań zostały przedstawione dokładnie i przejrzysto, w formie opisowej i graficznej na blisko trzydziestu rycinach i zdjęciach z mikroskopu konfokalnego. Pomocnym dla czytającego jest podsumowanie wyników zebrane w Tabeli 8 oraz na Rycinie 30, zbierającej kompleksowe działanie PER w układzie hemostazy.

Doktorantce udało się potwierdzić w otrzymanym ekstrakcie PER obecność elagotanin: pedunculaginy, agrimoniny i lewigatyny, oligomerycznych procyjanidyn, jak również procyjanidyny B3 i procyjanidyny C2. Nie przeprowadzono dalszej, ilościowej analizy składu PER oraz nie określono proporcji zidentyfikowanych w PER składników, co może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań.

Z przeprowadzonych badań wynika, że ekstrakt z kłącza pięciornika kurze ziele wpływa wielotorowo na układ hemostazy, zwłaszcza w warunkach indukowanej hiperglikemii. U zwierząt normoglikemicznych ekstrakt hamował proces zakrzepowy poprzez osłabienie aktywacji płytek krwi w mechanizmie zależnym od hamowania przemian kwasu arachidonowego oraz nasilał aktywność układu krzepnięcia ingerując w szlak kinin. W warunkach hiperglikemii, badany ekstrakt podawany przewlekłe w ilościach 100, 200 lub 400 mg/kg m.c. hamował aktywność płytek krwi oraz poprawiał funkcję naczynia krwionośnego, ale jednocześnie nasilał aktywność układu krzepnięcia – w mechanizmie wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia oraz hamował fibrynolizę.

Istotną część ocenianej dysertacji stanowi bardzo dobre omówienie wyników. Doktorantka dokonała go rzeczowo z zachowaniem podziału na poszczególne etapy badań, co służy lepszemu podsumowaniu rezultatów licznych eksperymentów. Lektura Dyskusji pozwala docenić umiejętność logicznej oceny, krytycznej interpretacji i próby wyjaśnienia mechanizmów obserwowanych zjawisk w ciągu przyczynowo-skutkowym. Tę konfrontację otrzymanych wyników z wynikami wcześniejszych badań własnych i innych badaczy podsumowują trzy ogólne wnioski – adekwatnie do postawionych celów badawczych.

Wartość recenzowanej pracy wspiera ponadto fakt opublikowania uzyskanych wyników w recenzowanych czasopismach anglojęzycznych o łącznej wartości współczynnika oddziaływania *Impact Factor* = 5,881; w obydwu publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Powyższe publikacje znalazły się też wśród literatury cytowanej w dysertacji, obok trzech innych prac autorstwa promotora lub promotora pomocniczego niniejszej pracy – Pana dr hab. n. farm. Michała Tomczyka i Pani dr n. farm. Anny Gromotowicz-Popławskiej. Wyniki badań będących przedmiotem rozprawy były też prezentowane podczas zjazdów w kraju i zagranicą.

Bibliografia obejmuje 191 pozycji literaturowych. Są one właściwie dobrane i umiejętnie cytowane w rozprawie. W znakomitej większości są to anglojęzyczne prace naukowe, a co trzecia z nich pochodzi z ostatnich 5 lat.

Na wyróżnienie zasługują także układ ocenianej pracy, jej forma językowa i graficzna.

Podsumowując, rozprawa stanowi podjęcie istotnego z punktu praktyki klinicznej problemu naukowego, kompetentnie i rzetelnie analizowanego w kolejnych etapach badawczych. Otrzymane wyniki opisują po raz pierwszy wpływ PER na układ hemostazy, stąd recenzowana praca stanowi oryginalne osiągnięcie Autorki. Dalsze badania pozwalające powiązać ilościowy skład ekstraktu z obserwowanym wpływem na hemostazę dają nadzieję na ujawnienie potencjału terapeutycznego ekstraktu, co w przyszłości zaowocowałoby próbami klinicznymi. Oceniana dysertacja świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia pracy naukowej. Udowadnia, że Doktorantka wykazuje umiejętność samodzielnego analizowania tekstów naukowych, planowania i przeprowadzania eksperymentów oraz krytycznej interpretacji otrzymanych wyników.

Należy także podkreślić fakt pozyskania przez Panią mgr Marcińczyk na rzecz prowadzonych badań eksperymentalnych grantu NCN w ramach konkursu PRELUDIUM 14 (Opiekun projektu: Prof. dr hab. Ewa Chabielska)

W świetle wyżej przedstawionej wysokiej oceny, na którą nie wpłynęły drobne uwagi, stwierdzam, że praca autorstwa Pani mgr farm. Natalia Marcińczyk pt. „Wpływ ekstraktu z kłącza *Potentilla erecta* na proces zakrzepowy i układ hemostazy w modelu zwierzęcym”, w pełni odpowiada warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim.

Wnoszę tym samym do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Natalia Marcińczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy, wagę i obszerność tematu zrealizowanego w ocenianej pracy, wnioskuję o rozważenie możliwości wyróżnienia dysertacji.

ADIUNKT
Zakładu Biofarmacji
Katedry Biofarmacji
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Magdalena Jasińska-Stroschein
Dr hab. n. farm. Magdalena Jasińska-Stroschein