



**Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie**
ul. W. Chodźki 1, 20-093 Lublin
Kierownik: dr hab. n. med. Alina M. Olender
tel./fax: 81 44-86-400, e-mail: mikrobiologia.lekarska@umlub.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Bartłomieja Micota

pt. „ Infekcyjne zapalenie wsierdza (IZW) – analiza biomedyczna *in vitro* potencjalnych cech terapeutycznych ekstraktu z *Leonurus cardiaca* L.”

„Infective endocarditis (IE) – biomedical *in vitro* analysis of the potential therapeutic properties of *Leonurus cardiaca* L. extract”

wykonanej w ramach Stacjonarnych Studiów Doktoranckich w Pracowni Biologii Zakazów Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Beaty Sadowskiej, prof. nadzw. UŁ

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma formę cyklu opublikowanych pięciu publikacji wraz z omówieniem celu naukowego i uzyskanych wyników, streszczenia w języku polskim i angielskim, dorobku naukowego doktoranta, kopii publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i oświadczeń współautorów o udziale w publikacjach ujętych w rozprawie.

Zbiór publikacji, które składają się na rozprawę doktorską obejmuje ten sam obszar badawczy tworząc spójną tematycznie rozprawę. Sumaryczna wartość wskaźników bibliometrycznych publikacji zawartych w doktoracie wynosi: 7,056 Impact Factor i 90 punktów MNiSW. Suma całego dorobku naukowego Doktoranta (14,187 IF i 183 MNiSW) potwierdza jego duże zaangażowanie na polu naukowym.

We Wprowadzeniu rozprawy Doktorant zawarł charakterystykę patomechanizmów odpowiedzialnych za infekcyjne zapalenie wsierdza (IZW) ze szczególnym uwzględnieniem roli powstających wegetacji bakteryjnych, analizując cechy drobnoustrojów predysponujących do ich tworzenia w IZW. Autor

wskazał na możliwości zastosowania naturalnych związków i złożonych preparatów pochodzenia naturalnego w bezpośrednim lub pośrednim ograniczeniu wegetacji bakteryjnej (szczególnie gronkowcowej) po przez ich szerokie działanie np.: antyoksydacyjne, przeciwzapalne czy przeciwbakteryjne, mające korzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy. Koncepcja zastosowania środków leczniczych wywodzących się z naturalnych preparatów roślinnych jest ciekawą i ważną drogą badawczą w poszukiwaniu nowych możliwości profilaktycznych i terapeutycznych w zakresie działania przeciwinfekcyjnego z pozytywnym wpływem na aktywność przeciwapagacyjną i korzystnym wpływem na śródbłonek naczyń. Jest to ważny aspekt nurtu nowych badań podjętych przez Doktoranta.

Celem badawczym rozprawy była ocena „*in vitro*” aktywności biologicznej ekstraktu uzyskanego z serdecznika pospolitego *Leonurus cardiaca* L. (LCE) zawierającego dużo polifenoli oraz możliwość potencjalnego ich zastosowania w profilaktyce i/lub wspomaganiu leczenia infekcyjnego zapalenia wsierdza o podłożu gronkowcowym. Realizacja celu pracy obejmowała dwa kierunki badań. Pierwszy dotyczył analizy aktywności ekstraktu wobec *Staphylococcus aureus*, najczęściej powodującego IZW i obejmował ocenę wpływu na żywotność, adhezję, tworzenie biofilmu oraz ekspresję ważnych czynników wirulencji *S. aureus*. Natomiast drugim kierunkiem badań, dotyczącym możliwości zastosowania LCE, była analiza wpływu ekstraktu na komórki eukariotyczne uczestniczące w powstawaniu patologicznych zmian podczas IZW. Doktorant badał działanie LCE na płytki krwi i układ homeostazy, analizując m.in. poziom aktywacji tych komórek w zakresie ich agregacji, adhezji do fibrynogenu oraz ekspresji receptorów powierzchniowych, a także po działaniu ekstraktem analizował żywotność i aktywność sekrecyjną komórek śródbłonka naczyniowego wykorzystując linie komórek HUVC.

Pierwsza praca z cyklu obejmującego rozprawę doktorską - „Antimicrobial/anti-biofilm activity of expired blood platelets and their released products” (Postepy Hig Med. Dosw; 2013, 67:321-325), zawierała badania, które umożliwiły uzyskanie istotnych wniosków wskazujących, że płytki krwi są źródłem niskocząsteczkowych białek PMPs wykazujących aktywność wobec gronkowców i to zarówno w hodowli planktonicznej jak i tworzących biofilm. Potwierdziło to ich rolę w nieswoistych mechanizmach odpornościowych. Również ważną i ciekawą obserwacją Doktoranta było stwierdzenie obniżenia wartości MIC antybiotyków podczas równoczesnego ich stosowanych z LCE, co wskazuje na synergiczne działanie przeciwdrobnoustrojowe i potencjalnie stwarza możliwości zastosowania tych obserwacji w terapii.

W drugiej publikacji o charakterze pracy przeglądowej „Rola płytek krwi w zakażeniach” (Postepy Hig Med Dosw; 2015, 69:624-632), zostały przedstawione główne mechanizmy o charakterze indukcyjnym

i supresorowym odpowiedzi przeciwdrobnoustrojowej związanej z udziałem płytek krwi, ich zdolnością do oddziaływania z różnymi komórkami eukariotycznymi i drobnoustrojami. Nie stwierdzono jednak wpływu ekstraktu na zwiększenie uwalniania przez płytki krwi peptydów bójczych – PMPs, ani zwiększonej wrażliwość *S. aureus* na te komórki. Proces ten ma bardzo duże znaczenie w rozwoju infekcyjnego zapalenia wsierdza i sprzyja powstawaniu „wegetacji”. Dlatego, tak jak podkreśla Doktorant, poszukiwanie nowych substancji, które mogłyby mieć zastosowanie w ograniczeniu aktywacji płytek krwi i komórek śródbłonna z równoczesnym działaniem wspomagającym leczenie przeciwdrobnoustrojowe ma ogromne znaczenie. Podjęcie badań nad wykorzystaniem w tym zakresie ekstraktu *L. cardiaca* L. jest nową obiecującą możliwością zastosowania preparatu pochodzenia roślinnego, który przy niskim działaniu cytotoksycznym może mieć zastosowanie terapeutyczne.

W kolejnej pracy „*Leonurus cardiaca* L. herb – derived extract and ursolic acid as factors affecting the adhesion capacity of *Staphylococcus aureus* in the context of infective endocarditis” (Acta Biochim Pol; 2014, 61(2):385-388) została przeprowadzona ocena ekstrahowanych wyciągów z ziela serdecznika pospolitego oraz jego działania na *S. aureus*. Analiza składu chemicznego (HPLC-PDA) i dokładne określenie zawartości związków polifenolowych wobec kwasu ursolowego, czystego związku polifenolowego było wykorzystane do oznaczenia minimalnego stężenia hamującego wzrost *S. aureus*. W ocenie działania preparatu zastosowano dawki subinhibicyjne, które potencjalnie mogłyby odpowiadać stężeniu *in vivo*. Analizę przeprowadzono na dobrze przemyślanym modelu doświadczalnym z użyciem referencyjnego szczepu *S. aureus* NCTC 8325 określając wpływ preparatów na adhezję gronkowca do powierzchni abiotycznej, pokrytej białkami z grupy ECM oraz tworzenie biofilmu. Stwierdzono działanie hamujące badanych preparatów, przy czym aktywność kwasu ursolowego była zdecydowanie wyższa niż ekstraktu. Wyniki badań potwierdzają obniżenie kolonizacji tkanek i biomateriałów przez *S. aureus*, co wskazuje na potencjalną możliwość zastosowania preparatów w ograniczeniu rozwoju IZW.

Zaplanowane badania dotyczące aktywności przeciwdrobnoustrojowe ekstraktu uzyskanego z serdecznika pospolitego *Leonurus cardiaca* L. były konsekwentnie realizowane przez Doktoranta, a ich wyniki opublikowane w pracy „Is it true that plant-derived polyphenols are always beneficial for the human? *In vitro* study on *Leonurus cardiaca* extract properties in the context of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections” (J Med Microbiol; 2016, 65(10): 1171-1181). Przedstawiony szeroki zakres badań dotyczący wpływu ekstraktu z ziela serdecznika pospolitego na czynniki wirulencji *S. aureus*, które mają istotny wpływ na rozwój *in vivo* IZW wskazał na działanie hamujące ekstraktu w szerokim zakresie stężeń ważnych procesów warunkujących rozwój IZW z udziałem *S. aureus* takich jak: produkcja i uwalnianie α -toksyny, ekspresja na powierzchni gronkowców SpA, wydzielanie koagulazy. Doktorant opracował autorską metodę badania wpływu LCE na agregację bakterii w plazmie

ludzkiej na podstawie spektrofotometrycznej oceny, wykazując 30% hamowanie tworzenia agregatów *S. aureus* pod wpływem LCE. Przeprowadził też bardzo ciekawe badania dotyczące wpływu LCE na większą podatność gronkowców na czynniki bójcze naturalnych mechanizmów odpornościowych. Przedstawione w publikacji badania wskazują na obniżenie ekspresji czynników wirulencji *S. aureus* pod wpływem LCE, a wyniki kolejnych rozszerzonych badań w tym zakresie, potwierdziły właściwości ograniczające rozwój IZW przez fitopreparaty bogate w związki polifenolowe.

Ważnym kolejnym aspektem kontynuowanych badań, zawartych w pracy „The immunomodulatory potential of *Leonurus cardiaca* extract in relation to endothelial cells and platelets” (Innate Immun; 2017, 23(3): 285-295) była analiza wpływu LCE na komórki śródbłonna naczyniowego (linia komórkowa HUVEC) oraz płytki krwi izolowane ze świeżej ludzkiej krwi obwodowej uzyskanej od zdrowych dawców (za zgodą Uczelnianej Komisji ds. Bioetyki Badań Naukowych). Wyniki tych interesujących badań wykazały brak działania cytotoksycznego i indukcji apoptozy przez ekstrakt uzyskany z serdecznika pospolitego na badane komórki eukariotyczne. Równie interesujące były wyniki dotyczące indukcji wytwarzania tlenu azotu przez komórki HUVEC, biorąc pod uwagę jego mechanizm działania, co potwierdza potencjalne działanie ochronne LCE na układ sercowo-naczyniowy. Istotne też było wykrycie aktywacji płytek krwi z udziałem cyklooksygenaz. Duża wnikliwość Doktoranta w badaniu procesów związanych z działaniem LCE w kontekście ekspresji płytkowych receptorów powierzchniowych, ich wybór i zaprojektowanie badań, uwzględniające znaczenie tych procesów w narastaniu „wegetacji” i patogenezie IZW, jest ważnym etapem w zakresie kontynuacji prowadzonych badań, których opracowanie Doktorant przygotowuje w kolejnej publikacji.

Przedstawione końcowe wnioski uzyskane z badań zawartych w rozprawie doktorskiej są bardzo dobrze sformułowane, trafne i adekwatne do uzyskanych wyników. Do pracy została dołączona bogata literatura uzupełniająca. Na wysoki poziom rozprawy zapewne miał również wpływ uzyskany przez Doktoranta Grant Narodowego Centrum Nauki, z którego finansowane były badania (nr UMO-2013/09/N/NZ6/00826), którego był kierownikiem.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Bartłomieja Micota jest na bardzo wysokim poziomie, wskazuje na świetne przygotowanie teoretyczne i praktyczne Doktoranta. W szerokim zakresie przedstawił on dokładną charakterystykę wykonanych badań zawartych w obejmującej cykl pięciu publikacji rozprawie doktorskiej. Należy również podkreślić nowatorstwo i trafność wyboru tematu, który w aspekcie poszukiwania nowych opcji terapeutycznych IZW ma ogromne znaczenie. Ważne jest również duże zaangażowanie Doktoranta w kontynuowanie tematu badawczego, czego potwierdzeniem jest zapowiedź wykonanych dalszych badań przygotowywanych do druku, kolejnych w tym zakresie tematycznym.

Stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Bartłomieja Micota pt. „ Infekcyjne zapalenie wsierdzia (IZW) – analiza biomedyczna in vitro potencjalnych cech terapeutycznych ekstraktu z *Leonurus cardiaca* L.” spełnia wszystkie ustawowe wymagania i kryteria stawiane tego typu rozprawom.

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Bartłomieja Micota do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy, ze względu na jej nowatorski charakter, szeroki zakres przeprowadzonych badań i ich wysokie walory poznawcze.

Lublin 30.10.2017

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Dr hab.n.med. Alina Białogorzata Olender