

Recenzja rozprawy doktorskiej

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

1

wykonanej przez mgr Bartłomieja Micota

w Pracowni Biologii Zakażeń, Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi

pod kierunkiem dr hab. Beaty Sadowskiej, prof. nadz. UŁ

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Bartłomieja Micota dotyczy oceny wpływu ekstraktu uzyskanego z zieleńca serdecznika pospolitego (*Leonurus cardiaca* L.) na oddziaływanie komórek układu hemostazy (płytek krwi oraz komórek śródbłonna) i patogenów typu gronkowiec złocisty w kontekście profilaktyki i leczenia infekcyjnego zapalenia wsierdzia (IZW).

Infekcyjne zapalenie wsierdzia (IZW) choć nie występuje często to jednak obciążone jest bardzo poważnym rokowaniem i może prowadzić do rozwoju groźnych powikłań, a nawet zgonu chorego (śmiertelność wśród chorych z IZW jest ciągle wysoka). Przyjmuje się, że warunkiem rozwoju IZW jest przerwanie ciągłości śródbłonna naczyniowego lub aktywacja komórek śródbłonna w wyniku turbulentnego przepływu krwi czy toczącego się stanu zapalnego i obecności bakterii w łożysku naczyniowym. Konsekwencją zmian w obrębie śródbłonna jest aktywacja płytek krwi oraz osoczowego układu krzepnięcia i powstanie niewielkiej skrzepliny, która w obecności bakterii w układzie krążenia może być podłożem rozwoju IZW. Obecność patogenów, miejscowe zmiany w obrębie śródbłonna i wytworzenie skrzepliny prowadzą do uruchomienia kaskady aktywacji sąsiednich komórek śródbłonna, płytek krwi czy granulocytów i monocytów, a rezultatem tych procesów jest wydzielanie czynnika tkankowego, cytokin prozapalnych i rozrastanie się „wegetacji”, czyli zakrzepów składających się z agregatów płytkowo-leukocytarnych, mas bakterii i białek osocza.

Z tego względu, że IZW dotyczy nie tylko starszych, schorowanych osób, ale również młodych ludzi czy właściwie osób w każdym wieku cieszących się dobrym zdrowiem, problem IZW jest poważny. Błony śluzowe ludzkiego organizmu są skolonizowane przez wiele gatunków endogennej flory bakteryjnej. Bakterie te mogą dostawać się do układu krążenia w wyniku naruszenia ciągłości błon śluzowych, np. w trakcie zabiegów w obrębie jamy ustnej, przewodu pokarmowego, układu oddechowego czy moczowo-płciowego, ale także pod wpływem zwykłych codziennych czynności, tj. szczotkowania zębów czy gryzienia pokarmów. Dotychczasowa profilaktyka czy leczenie IZW opierają się na antybiotykoterapii, choć jednocześnie podkreśla się możliwość wystąpienia działań niepożądanych po podaniu antybiotyku oraz ryzyko rozwoju szczepów bakterii opornych na antybiotyki stosowane w leczeniu IZW. Zatem coraz częściej sięga się po alternatywne metody eradykacji trudnych

zakażeń, w tym przebiegających z udziałem biofilmu drobnoustrojów, takie jak fagoterapia, użycie jonów czy nanocząsteczek metali i in. Ważny trend stanowi próba zastosowania naturalnych związków o bezpośredniej lub pośredniej aktywności drobnoustrojowej pochodzenia bakteryjnego, zwierzęcego czy roślinnego. Preparaty pochodzenia roślinnego charakteryzują się wysoką aktywnością biologiczną i wykazują działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe i przeciwdrobnoustrojowe. W literaturze naukowej prowadzona jest także dyskusja na temat skuteczności stosowania leków przeciwplatek podczas antybiotykoterapii i leczenia IZW. Badacze podkreślają znaczenie hamowania aktywacji płytek preparatami przeciwplatekowymi, np. aspiryną, tiklopidyną, szczególnie dla osłabienia procesu „wegetacji” poprzez blokowanie oddziaływań płytka-płytko lub bakteria-płytko.

2

Celem badawczym pracy doktorskiej mgr Bartłomieja Micota była ocena *in vitro* aktywności biologicznej bogatego w polifenole ekstraktu z serdecznika pospolitego (*Leonurus cardiaca* L.) w kontekście jego potencjalnego zastosowania w profilaktyce i/lub wspomaganie leczenia infekcyjnego zapalenia wsierdza o podłożu gronkowcowym. Doktorant opisał dwa nurty badań ekstraktu, jeden w odniesieniu do gronkowców złocistych (*Staphylococcus aureus*) jako głównych czynników etiologicznych IZW, natomiast drugi wobec komórek układu hemostazy jakimi są płytki krwi i komórki śródbłonna zaangażowane w powstawanie zmian patologicznych IZW. Doktorant weryfikację postawionych hipotez badawczych przeprowadził w badaniach *in vitro*, których wyniki zostały opisane w publikacjach oryginalnych i podsumowane w rozprawie doktorskiej jako 4 dobrze sformułowane wnioski.

Rozprawa doktorska mgr Bartłomieja Micota została napisana w postaci wielostronicowego komentarza do zbioru 5 publikacji opublikowanych w latach 2013 – 2017 w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Doktorant jest pierwszym autorem w 2 pracach oryginalnych i jednej pracy przeglądowej, co definiuje Jego kluczowy wkład w ich powstanie. W pozostałych publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej Doktorant jest drugim autorem. Sumaryczna wartość IF prezentowanych prac wynosi 7,056, sumaryczna punktacja MNiSW wynosi 90. Praca obejmuje 91 stron maszynopisu, włączając w to streszczenie, literaturę uzupełniającą (26 pozycji bibliografii), a także listę własnego dorobku naukowego (nie wliczając prac zawartych w rozprawie doktorskiej są to 3 prace oryginalne, 6 prac przeglądowych, 16 komunikatów konferencyjnych, sumaryczna wartość IF wynosi 7,131, sumaryczna punktacja MNiSW wynosi 93), 41 stron zawierających kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, a także 7 stron oświadczeń współautorów powyższych publikacji zawierających deklarowany udział w przygotowaniu publikacji.

Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników rozpoczyna rozdział „Wprowadzenie”, w którym Doktorant przedstawia najważniejsze informacje związane z etiologią infekcyjnego zapalenia wsierdza, rolą płytek krwi i komórek śródbłonna, a także rodzajami patogenów odpowiedzialnych za powstawanie i rozwój tej choroby. Ponadto, w tym rozdziale Doktorant opisuje problemy związane z leczeniem i profilaktyką zapalenia wsierdza i wskazuje na konieczność poszukiwania nowych preparatów skutecznych dla eliminacji czynników etiologicznych zakażenia i wygaszania reakcji zapalnej. Rozdział napisany w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo, uzasadnia postawione cele badawcze

i jest dobrym wprowadzeniem do omówienia prac wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej.

Publikacje oryginalne zawarte w rozprawie doktorskiej koncentrują się na wzajemnych oddziaływaniach płytek krwi i gronkowców oraz na charakterystyce ekstraktu z ziela serdecznika pospolitego w kontekście właściwości przeciwbakteryjnych, przeciwplatekowych czy wspomagających funkcjonowanie śródbłonna naczyniowego. Bardzo dobrym uzupełnieniem opisu wyników zawartych w publikacjach oryginalnych jest praca przeglądowa na temat roli płytek krwi w zakażeniach. Publikacja opisuje mechanizmy oddziaływania płytek krwi z drobnoustrojami oraz podkreśla ich znaczenie w eliminacji zakażenia (przeciwdrobnoustrojowe właściwości płytek krwi). Płytki krwi, obok swej zasadniczej roli w krzepnięciu, zaangażowane są w wiele procesów w organizmie, choć wielu badaczy nie uznaje płytek za komórki (w procesie trombopoezy odrywane są jako fragmenty megakariocytów), a w piśmiennictwie naukowym zwykle stosuje się określenie płytki krwi (ang. *platelets*, PLT nie *platelet cells*, PLC). Przedstawiony przez Doktoranta opis najważniejszych wyników zawartych w publikacjach zebranych w rozprawie doktorskiej wskazuje na logiczny schemat postępowania w poszukiwaniu substancji o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwplatekowych jaką okazał się ekstrakt z ziela serdecznika pospolitego. W publikacji pt. „*Antimicrobial/anti-biofilm activity of expired blood platelets and their released products*” rozpoczynającej serię prac wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej, opisano przeciwdrobnoustrojowe właściwości płytek krwi oceniane w modelu zakażeń gronkowcowych *in vitro*. Celem tej pracy było sprawdzenie przeciwdrobnoustrojowych właściwości płytek krwi pochodzących z koncentratów platekowych przechowywanych przez 6 - 8 dni wobec gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*). Wykazano, że płytki krwi pomimo długiego przechowywania i niezależnie od pobudzenia ADP hamowały wzrost gronkowca w kulturze planktonowej prawie do 90%. Wynik tej obserwacji wydaje się być bardzo istotny z punktu widzenia właściwości przeciwbakteryjnych płytek krwi, i od razu nasuwa się pytanie o mechanizmy uzasadniające taki efekt. Gdyby obserwowany efekt był zależny od aktywacji ADP, która prowadzi do reakcji uwalniania zawartości granul wewnątrzplatekowych, można byłoby powiedzieć, że za aktywność przeciwbakteryjną w dużej części odpowiadają peptydy biobójcze płytek (tak jak zaobserwowano po zastosowaniu lizatów platekowych). Prawdopodobnym wyjaśnieniem może być opłaszczanie płytek krwi przez gronkowca przez co bakterie tracą być może zdolność do dalszego namnażania. Zatem w uzupełnieniu przeprowadzonych eksperymentów warto byłoby ocenić ilość agregatów platekowo-bakteryjnych. Znaczącą aktywność płytek obserwowano także wobec obniżania zdolności metabolicznej dojrzałego biofilmu gronkowców, gdzie efekt był zbliżony do tego dla płytek aktywowanych i lizatów platekowych. Istotną obserwacją z badań jest fakt, że długo przechowywane (6 -8 dni) płytki wykazują bardzo wysoką aktywność przeciwbakteryjną. Nasuwa się pytanie jakie wyniki byłby obserwowane w przypadku płytek świeżo izolowanych z krwi? Wydaje się prawdopodobne, że dla świeżo izolowanych płytek wykazano by zależność od aktywacji agonistami w odpowiedzi przeciwbakteryjnej. Przechowywane płytki krwi, również te w koncentratkach platekowych, ulegają spontanicznej aktywacji, która prowadzi do reakcji uwalniania i zużywania płytek, czego rezultatem jest osłabiona wrażliwość na działanie agonistów. Bardzo cenną obserwacją z przeprowadzonych badań jest wykazanie spadku wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów dla antybiotyków

(wankomycyny, oksacykliny) w obecności lizatu płytek krwi. Wyniki opisane w tej publikacji wskazują na znaczącą aktywność przeciwbakteryjną płytek krwi choć niefortunnie nie są podparte istotnością statystyczną (w publikacji nie znalazłam informacji o analizie statystycznej wyników).

W kolejnych publikacjach oryginalnych uwaga skoncentrowana jest na charakterystyce ekstraktu z ziela serdecznika pospolitego jako potencjalnego środka wspomagającego leczenie, np. infekcyjnego zapalenia wsierdza. Opisane wyniki badań wskazują na istotną aktywność przeciwbakteryjną ekstraktu z serdecznika, w tym także hamowanie tworzenia agregatów gronkowców w ludzkim osoczu krwi, zdolność do hamowania adhezji bakterii do powierzchni opłaszczonych białkami, np. kolagenem. Ponadto wykazano, że ekstrakt hamuje tempo i intensywność tworzenia fibryny, jednocześnie ograniczając przyleganie do niej drobnoustrojów. Równolegle, w części oznaczeń, działanie ekstraktu z serdecznika porównywano do efektów kwasu ursolowego, który według literatury występuje w ekstraktach z serdecznika. Istotne działanie przeciwbakteryjne kwasu ursolowego zostało potwierdzone w badaniach opisanych w prezentowanych przez Doktoranta publikacjach, jedynie brakuje potwierdzenia obecności tego związku w badanym ekstrakcie z serdecznika pospolitego. Spectrum aktywności ekstraktu z serdecznika, obok działania przeciwbakteryjnego, zostało rozszerzone do oceny aktywności przeciw płytkowej (ekstrakt hamował agregację płytek krwi indukowaną kwasem arachidonowym) czy poprawę funkcji śródbłonka naczyniowego ocenianej w modelu z zastosowaniem komórek izolowanych z żyły pępowinowej (HUVEC). Uzupełnieniem opublikowanych już badań są wyniki obecnie przygotowywane do publikacji, które podtrzymują przeciw płytkowe działanie ekstraktu z serdecznika pospolitego w mechanizmie zależnym od receptora dla fibrynogenu GPIIb/IIIa. Opisane przez Doktoranta wyniki badań wskazują na wielokierunkowe działanie ekstraktu z ziela serdecznika pospolitego i sugerują możliwość zastosowania tego preparatu w minimalizowaniu i leczeniu infekcyjnego zapalenia wsierdza.

W kontekście analizy publikacji wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej nasuwa mi się uwaga dotycząca planowania eksperymentu i późniejszej analizy statystycznej wyników związana z liczbą powtórzeń. Jak w eksperymencie na komórkach z hodowli, np. HUVEC czy na bakteriach definiowane jest niezależne powtórzenie (n)? Ponadto, czy mamy wówczas do czynienia z układem sparowanym czy raczej z układem niezależnych grup wyników?

W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska mgr Bartłomieja Micota jest bardzo wartościowa i wnosi istotne wartości poznawcze z potencjalną możliwością ich zastosowania. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Bartłomieja Micota do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie Mu stopnia doktora nauk biologicznych. Ponadto z uwagi na bardzo wysoką wartość poznawczą, a w przyszłości aplikacyjną wnoszę również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej właściwą nagrodą.

Bogusława Luzak

Adiunkt
 Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi
 Uniwersytet Medyczny w Łodzi
 dr hab. n. med. Bogusława Luzak

Łódź, 19.X.2017 r.

Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi
 Katedra Nauk Biomedycznych
 92-215 Łódź | ul. Mazowiecka 6/8
 tel. (042) 2725720, fax. (042) 2725730
 www.umed.pl