

Prof. dr hab. Maria Koziółkiewicz,
Instytut Biochemii Technicznej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
ul. Stefanowskiego 4/10
90-924 Łódź
maria.koziolkiewicz@p.lodz.pl

Łódź, 15 sierpnia 2017r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Dudzińskiej na temat: "Przeciwpłytkowe właściwości preparatów polifenolowych uzyskanych z liści jeżyny i liści maliny"

Rozprawa doktorska mgr Dominiki Dudzińskiej została zrealizowana w Katedrze Nauk Biomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. Cezarego Watały. Celem badań była ocena wpływu ekstraktów polifenolowych pochodzących z liści jeżyny popielicy i maliny zwyczajnej na funkcje płytek krwi oraz wybrane właściwości komórek śródbłonna naczyń.

Praca doktorska mgr Dominiki Dudzińskiej wpisuje się w szeroki nurt badań nad kardioprotekcyjną i przeciwpłytkową aktywnością związków polifenolowych. Jakkolwiek obecnie stosuje się szereg leków przeciwzakrzepowych nakierowanych na różne cząsteczki docelowe (cyklooksygenaza, receptor P2Y₁₂, receptor fibrynogenu, fosfodiesterazy cAMP i cGMP), istnieje także wyraźna tendencja do poszukiwania związków naturalnych o podobnym działaniu. W ostatnich latach pojawiło się wiele publikacji naukowych na temat związków pochodzenia naturalnego (w tym polifenoli), wykazujących zdolność do hamowania procesu agregacji płytek krwi, a co za tym idzie - powstawania zakrzepów. W rozdziale I zatytułowanym „Wprowadzenie” Doktorantka wymienia rośliny, których ekstrakty wpływają na różne parametry istotne dla utrzymania prawidłowego funkcjonowania układu krwionośnego, a wśród nich te, które mają działanie przeciwzakrzepowe. Jednakże mnogość danych literaturowych na ten temat, a także złożone interakcje pomiędzy komórkami uczestniczącymi w aktywacji płytek krwi sprawiają, że mechanizmy aktywowane przez odpowiednie ekstrakty (lub poszczególne związki polifenolowe) zostały zidentyfikowane i opisane tylko w niewielkim stopniu. Dlatego uważam, że praca realizowana przez Doktorantkę i uzyskane przez nią wyniki mogą mieć znaczenie dla dalszego rozwoju badań nad przeciwpłytkową aktywnością związków polifenolowych.

W liczącym 20 stron rozdziale I mgr Dudzińska opisuje m.in. najważniejsze czynniki oraz szlaki sygnałowe odpowiedzialne za aktywację płytek krwi i ich udział w procesie krzepnięcia (szlak

indukowany hydrolizą fosfatydyloinozytolu, kaskada szlaku arachidonowego oraz szlak inicjowany przez ATP i ADP wiążące się do receptorów nukleotydowych P2X₁, P2Y₁ oraz P2Y₁₂). Opisuje także interakcje płytek krwi, wielojądrowych leukocytów (w tym neutrofilii) oraz komórek śródbłonna naczyń. Szkoda, że te opisy nie zostały zilustrowane odpowiednimi schematami; praca ma przecież charakter interdyscyplinarny i mogą po nią sięgać nie tylko specjaliści zajmujący się procesami krzepnięcia krwi, ale także chemicy badający produkty naturalne. Niestety, brak odpowiednich ilustracji nie ułatwi im tej lektury.

Omówienie eksperymentów wykonanych przez Doktorantkę (rozdział V *Wyniki*) liczy 22 strony, a dyskusja wyników (rozdział VI) to kolejnych 9 stron. Na wstępie autorka podaje jakościową i ilościową charakterystykę acetonowych ekstraktów polifenoli z liści jeżyny i maliny, wskazując znaczną zawartość tanin (szczególnie w ekstrakcie z liści jeżyny) oraz różnice w zawartości kwasów fenolowych (kwas kawowy – obecny tylko w liściach maliny; kwas galusowy – występujący głównie w liściach jeżyny). Określono także aktywność antyoksydacyjną obu ekstraktów, wykazując wyższą aktywność ekstraktu z liści jeżyny, który był o 40 oraz o 50% skuteczniejszym zmiataczem rodników ABTS i DPPH niż ekstrakt z liści maliny.

Kluczowe znaczenie dla charakterystyki aktywności biologicznej badanych ekstraktów miał pomiar agregacji płytek we krwi pełnej pobranej od zdrowych dawców i w osoczu bogatopłytkowym. Ekstrakty polifenoli użyte w stężeniu 15 µg/ml hamowały agregację płytek w zakresie 31-31% dla ekstraktu z liści maliny i 28-55% dla ekstraktu z liści jeżyny. Dla porównania, dwaj antagoniści receptorów purynergicznych (P2Y₁₂): adenozylo 3',5'-difosforan (A3P5) oraz kangrelor hamowały agregację, odpowiednio, o 35% i 31%. Co więcej, oba ekstrakty dodatkowo pogłębiły hamujący wpływ A3P5 i kangreloru o 21 i 25% (dla maliny) oraz o 47 i 35% dla jeżyny. Jednak, badając agregację płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym, Doktorantka zauważyła brak hamującego wpływu ekstraktów na ten proces. Ponieważ zasadnicza różnica między pełną krwią i osoczem PRP polega na braku neutrofilii w tym ostatnim, należało założyć, iż przeciwapagregacyjne działanie polifenoli jest zależne od tego typu leukocytów. Powyższa hipoteza stała się punktem wyjścia do dalszych analiz, a mianowicie wyjaśnienia zależnego od neutrofilii mechanizmu działania ekstraktów z liści jeżyny i maliny. Badania obejmowały analizę cytometryczną ekspresji receptora GPIIb/IIIa, płytkowej selektywnej P oraz adhezyjnego receptora CD11b w obecności badanych ekstraktów, a także ocenę ich zdolności do neutralizowania reaktywnych form tlenu generowanych przez neutrofile stymulowane z użyciem ADP lub fMLP. Uzyskane wyniki sugerują, że oba ekstrakty posiadają zdolność neutralizowania RFT uwalnianych przez neutrofile stymulowane przez te związki. Doktorantka na tej podstawie konkluduje, że ekstrakty z liści jeżyny i maliny hamują agregację płytek krwi działając jako antyoksydanty, a nie modulatory transdukcji sygnałów w neutrofilach (argument: nie powodują zmniejszenia ekspresji receptora CD11b).

Istotnym elementem regulującym stan homeostazy w naczyniu krwionośnym są komórki śródbłonna naczyń, które mogą hamować funkcje płytek krwi, w tym proces ich agregacji. Komórki śródbłonna wydzielają tlenek azotu i prostacyclinę PGI₂, które aktywują, odpowiednio, cyklazę guanylanową i cyklazę adenylanową, przez co wzrasta poziom cyklicznych nukleotydów, co z kolei uniemożliwia aktywację płytek krwi. Istotnym czynnikiem jest także ATP, ADP-fosfohydrolaza (CD39, apyraza) odpowiedzialna za degradację m.in. ADP, który jest agonistą płytkowego receptora nukleotydowego P2Y₁₂. Obniżenie poziomu ADP prowadzi do zahamowania aktywacji płytek. Dlatego Doktorantka zbadała wpływ ekstraktów na powierzchniową ekspresję apyrazy oraz jej aktywność. Wykazała z jednej strony zwiększenie ekspresji CD39 na powierzchni komórek HUVEC, a z drugiej strony – zmniejszenie jej aktywności, co w konsekwencji może prowadzić do zmniejszonej aktywacji receptorów purynergicznym na powierzchni płytek. Te wyniki nie pozwalały w sposób jednoznaczny ocenić, czy ekstrakty polifenoli wywołują aktywację komórek śródbłonna, dlatego mgr Dudzińska przeprowadziła analizę cytometryczną ekspresji ICAM-1 jako markera aktywacji komórek HUVEC. Eksperyment ten potwierdził wzrost ekspresji powierzchniowej tej molekuly adhezyjnej oraz aktywację komórek śródbłonna przez ekstrakty z liści jeżyny i maliny, chociaż większość doniesień literaturowych wskazuje, że polifenole obniżają ekspresję ICAM-1.

Nie jestem przekonana, że za ten efekt odpowiadają taniny, jak wnioskuje Doktorantka na podstawie publikacji Kolodzieja i Kiderlena. Pomiędzy ekstraktami z liści jeżyny i maliny istnieje spora różnica w zawartości tanin (130 mg/g suchej masy w ekstrakcie z liści jeżyny i 90 mg/g suchej masy w ekstrakcie z liści maliny), podczas gdy stopień aktywacji komórek HUVEC mierzony na podstawie ekspresji ICAM-1 jest taki sam dla obu ekstraktów. Ponadto taniny w badanych ekstraktach z liści jeżyny i maliny nie zostały zidentyfikowane; trudno więc powoływać się na wyniki Kolodzieja i Kiderlena, których preparaty mogły zawierać zupełnie inne taniny (a ich publikacja też nie należy do najnowszych – 2005r.). Dla wyjaśnienia tej kwestii należałoby zastosować dobrze oczyszczony preparat tanin i wykazać, że wywołuje on zależną od stężenia aktywację komórek śródbłonna.

Uważam, że zamieszczone na końcu „Dyskusji” stwierdzenie: „Pomimo, iż badane ekstrakty nie wykazują korzystnego działania w odniesieniu do komórek śródbłonna, pozostają obiecującym źródłem polifenoli o właściwościach antyoksydacyjnych i przeciwplatek, co czyni je godnym uwagi materiałem do pozyskiwania suplementów o działaniu kardioprotekcyjnym” jest zbyt ogólne i napisane trochę na wyrost. Dobrze byłoby wskazać, jakie konkretnie badania należy przeprowadzić w przyszłości, aby potwierdzić wysoki potencjał ekstraktów z liści jeżyny i maliny, na tyle wysoki aby planować ich zastosowanie jako suplementów o działaniu kardioprotekcyjnym. Uważam, że więcej uwagi wymagałaby w przyszłości analiza składu ekstraktów, szczególnie analiza elagotanin.

Mam także pytanie dotyczące krótkiego fragmentu dyskusji na stronie 73: „... nie można wykluczyć bezpośredniego wpływu badanych ekstraktów na receptory purynergiczne, zwłaszcza, iż w bieżącej pracy wykazano spadek indeksu reaktywności płytek w teście VASP, co jest równoznaczne z zablokowaniem receptora dla ADP – P2Y₁₂.” Rozumiem, że jest to hipoteza postawiona przez Autorkę, nie poparta jednak żadnym przykładem. Uważam, że jest ona interesująca, ale chciałabym wiedzieć czy Doktorantka zna przykłady związków polifenolowych działających jako antagoniści receptora P2Y₁₂.

Lista zacytowanych artykułów naukowych liczy 171 pozycji, z czego tylko 33 zacytowane pozycje opublikowano po roku 2010. Wynika to z faktu, iż w latach 2000-2010 opublikowano wiele prac potwierdzających szereg aktywności biologicznych polifenoli, w tym aktywność przeciwplatek i kardioprotekcyjną, ale liczba publikacji, które wyjaśniają mechanizmy molekularne i przypisują je konkretnym związkom chemicznym jest już znacznie mniejsza. I tak np. wiadomo, że główne elagotaniny rodzaju *Rubus* to lambertianina i saguina, ale brak jest jakichkolwiek wskazówek o ich działaniu na płytki krwi lub komórki śródbłonna, co byłoby cenne w kontekście rozprawy mgr Dudzińskiej. W tej sytuacji niektóre wyniki i obserwacje mgr Dominiki Dudzińskiej trudno jest poprzez dane literaturowe i dlatego Doktorantka powołuje się niekiedy na trochę już przestarzałe i nie do końca wiarygodne, w moim odczuciu, prace.

Mam także uwagę o charakterze edytorskim: wykaz stosowanych skrótów (str. 3-5) jest niekompletny. Nie wiem dlaczego część skrótów, szczególnie skrótów nazw odczynników chemicznych (np. PVPP, A3P5, ABTS, DPPH, fMLP) pojawia się dopiero na str. 34 wśród nazw odczynników zakupionych w firmie Sigma-Aldrich.

I tak np. czytelnik znajduje na stronie 36 zdanie zaczynające się od słów „Po usunięciu tanin z ekstraktu z zastosowaniem PVPP” albo czyta nagłówek tabeli 6 na stronie 50 „profil polifenolowy ekstraktów z liści jeżyny i liści maliny przed i po usunięciu tanin z zastosowaniem PVPP”, ale w wykazie skrótów na stronach 3-5, ani też w opisie zastosowanej procedury nie znajdzie wyjaśnienia, co to jest PVPP, chyba że przeczyta starannie, jakie odczynniki zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich. Z drugiej strony, wykaz skrótów zawiera niepotrzebne, moim zdaniem, „oczywiste oczywistości” jak np. wyjaśnienie, co znaczy skrót „mRNA”.

Uwagi te mają charakter dyskusyjny i nie obniżają mojej pozytywnej opinii o naukowych walorach pracy mgr Dominiki Dudzińskiej. Dlatego stwierdzam, iż Jej rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i przedstawiam Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Dominiki Dudzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Kosińska
4