



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Wydział

Farmaceutyczny

Zakład Biotechnologii

15-089 Białystok, ul. Kilińskiego 1

Tel. (85) 748-57-01, FAX (85) 879-

57-18

aniabiel@umb.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm. Anna Bielawska

Białystok, 03.10.2019

Ocena pracy doktorskiej mgr Magdaleny Wyszkwowskiej-Kolatko pt. "Ocena aktywności biologicznej *in vitro* wyciągów z wąkroty azjatyckiej"

Produkty lecznicze pochodzenia roślinnego stanowią fundament dzisiejszego przemysłu farmaceutycznego, jak i kosmetycznego. Jedną z najbardziej cenionych roślin w medycynie Dalekiego Wschodu obok żeńszenia jest wąkrota azjatycka *Centella asiatica* (L.) Urban, syn. *Hydrocotyle asiatica* (L.). Surowcem leczniczym pozyskiwanym z wąkroty azjatyckiej są zarówno liście, jak i cała roślina z korzeniami. Są one stosowane od tysięcy lat w medycynie ajurwedyjskiej jako swoiste *panaceum* w różnych chorobach ośrodkowego układu nerwowego, w chorobach układu sercowo-naczyniowego (w nadciśnieniu, zaburzeniach krążenia obwodowego), chorobie wrzodowej przewodu pokarmowego, w chorobach skóry, w tym w leczeniu trudno gojących się ran. Lekarze indyjscy stosują preparaty z wąkroty azjatyckiej zewnętrznie i wewnętrznie w chronicznych owrzodzeniach, egzemach, łuszczycy, trądziku, a także w malarii oraz jako środek ogólnie wzmacniający. Wsuszone liście stosuje się dla poprawienia pamięci oraz w zaburzeniach sfery mentalnej. Stwierdzono przy tym, że skład chemiczny wąkroty azjatyckiej jest zróżnicowany w zależności od miejsca występowania rośliny. W Indiach stwierdzono obecność pięciu różnych odmian chemicznych. Pierwsza odmiana zawiera w większości kwas azjatykowy i madekasowy oraz ich pochodne, druga kwas indocetoikowy, trzecia azjatykozyl, bramozyl, braminozyl oraz kwas azjatykowy i bramikowy, kolejna zawiera tankunizyl i kwas tankunikowy, zaś ostatnia odmiana:

izotankunizyd i kwas izotankunizydowy. W Chinach i na Madagaskarze wyciągi z *Centella asiatica* zawierają głównie pochodne kwasu madekasowego. Zaobserwowano także, że zawartość procentowa czterech podstawowych związków frakcji triterpenowej: kwasów (azjatykowego, madekasowego) oraz azjatykozydu i madekasozydu, w wyciągach wodnych i alkoholowych różni się znacznie w zależności od ekotypu. Zgodnie z wymogami obowiązującymi we Wspólnocie Europejskiej, ekstrakt TECA (titrated extract of *Centella asiatica*) nie może być aktualnie zarejestrowany jako preparat ziołowy, ze względu na jego zmienny skład oraz różne procesy otrzymywania. Według European Medicines Agency (EMA) stosowane metody otrzymywania wyciągów z wąkroty azjatyckiej nie zapewniają stałej jakości uzyskiwanego produktu. Leki powstające w sposób konwencjonalny, na bazie substancji czynnych opracowywane w laboratorium, są standaryzowane. Natomiast w przypadku roślinnych produktów leczniczych, ich skład i jakość jest związana z procesem uprawy i zbioru roślin. Złożoność składu tych produktów (zarówno substancje jak i przetwory roślinne np. wyciągi) skutkuje tym, że są one w istocie skomplikowanymi mieszaninami grup związków chemicznych, co znacząco utrudnia kontrolę jakości na poziomie stosowanym wobec czystych substancji chemicznych. Występować mogą liczne problemy z wyselekcjonowaniem i oznaczaniem zawartości konkretnej substancji. Możliwość dokumentowania jakości pod kątem analizy składu, zawartości i zanieczyszczeń w stosunku do tych produktów jest ograniczona. Należy jednak podkreślić fakt, że wyciągi z wąkroty azjatyckiej stosowane są w różnych preparatach dermatologicznych i kosmetycznych do gojenia zmienionej chorobowo struktury skóry (wyprysków, trądziku, oparzeń, odleżyn, wyrównywania zbliznowaceń). Produkowane na bazie wyciągów z wąkroty azjatyckiej preparaty, np. Madecassol i Analen – mazidła, Alveo – płyn, Varixinal – tabletki i Cicatridine – globulki, mają status suplementów diety. Hasco-Lek produkuje preparaty Detocell Cellulit oraz Detocell Aqua – suplementy diety przeznaczone dla kobiet ze skłonnością do cellulitu. Preparat Detocell Cellulit zawiera jako substancję czynną, poza olejem rybim (kwasy z grupy *omega-3*) i olejem z ogórecznika (kwasy *omega-6*), wyciąg suchy z wąkroty azjatyckiej, wspomagający krążenie obwodowe oraz pobudzający rozwój fibroblastów oraz biosyntezę kolagenu, elastyny i kwasu hialuronowego. Prowadzone obecnie badania farmakologiczne potwierdzają wielokierunkowe działanie lecznicze wąkroty azjatyckiej.

W nurt tych rozważań wpisuje się praca doktorska mgr Magdaleny Wyszowskiej-Kolatko pt. "Ocena aktywności biologicznej *in vitro* wyciągów z wąkroty azjatyckiej". Wybór tematu pracy doktorskiej jest aktualny i interesujący, o dużych walorach aplikacyjnych. Przemysł kosmetyczny, zarówno w Polsce, jak i na świecie wykazuje ogromne

zainteresowanie ekstraktami z wąkroty azjatyckiej, co skutkuje zagrożeniem wyginięcia rośliny w środowisku naturalnym. Alternatywną metodą pozyskiwania dużej ilości biomasy są hodowle roślinne kultur *in vitro*. Doktorantka podejmuje próbę zbadania aktywności biologicznej i bezpieczeństwa stosowania wyciągu z wąkroty azjatyckiej otrzymanego z rośliny pochodzącej ze stanowiska szklarniowego (CA1), wyciągu z rośliny z hodowli *in vitro* (CA2) oraz ich głównych składników aktywnych azjatykozydu i madekasozydu, w stężeniach odpowiadających ich zawartości w wyciągach.

Układ przedstawionej do recenzji pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, z podziałem na rozdziały: wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski końcowe, literaturę, oraz spis tabel i rycin. W rozprawie znajdziemy abstrakt w języku angielskim i języku polskim oraz wykaz stosowanych skrótów. Praca doktorska mgr Magdaleny Wyszowskiej-Kolatko jest obszerna, liczy 176 stron tekstu, w których zawarty jest 35 rycin i 20 tabel. Tabele i ryciny umieszczono w tekście, co znacznie ułatwia korzystanie z nich w trakcie czytania. Doktorantka posługuje się precyzyjnym, zwięzłym językiem naukowym, swobodnie poruszając się w terminologii omawianych zagadnień. Zwraca uwagę wielką staranność graficzna i edytorska pracy. Piśmiennictwo liczy 143 pozycji i jest właściwie dobrane i cytowane.

We wstępie pracy, liczącym 35 stron, Doktorantka przedstawia informacje szeroko naświetlające zakres tematyczny podjętych badań. W rozdziałach tych Autorka omawia zagadnienia dotyczące morfologii, występowania i składu chemicznego *Centella asiatica*. We wstępie dysertacji znajdziemy również opis właściwości terapeutycznych wyciągów z wąkroty azjatyckiej i jej składników aktywnych wykorzystywanych w preparatach kosmetycznych i dermatologicznych. Doktorantka naświetla też biodostępność ekstraktów z *C. asiatica*. Wstęp rozprawy doktorskiej pozwala czytelnikowi zapoznać się z profilem alergologicznym i toksykologicznym ekstraktów z wąkroty azjatyckiej i ich aktywnością antycellulitową, wpływem na mikrokrążenie skórne oraz na proces gojenia się ran. Informacje zawarte w tej części pracy stanowią wyczerpujące wprowadzenie do części doświadczalnej dysertacji. Podsumowując, rozdział ten świadczy o bardzo dobrej znajomości aktualnego piśmiennictwa, dużej wiedzy, solidnym i dogłębnym przygotowaniu Doktorantki do podjętych badań.

Celem pracy doktorskiej mgr Magdaleny Wyszowskiej-Kolatko jest badanie aktywności biologicznej i bezpieczeństwa stosowania wyciągów wodnych z wąkroty azjatyckiej otrzymanych z rośliny pochodzącej ze stanowiska szklarniowego (CA1) i z rośliny z hodowli *in vitro* (CA2). Jako związki referencyjne zastosowano azjatykozyd i madekasozyd, główne składniki aktywne zawarte w wyciągach. Zawartość azjatykozydu (AZJ) i

madekasozydu (MAD) w wyciągach CA1 i CA2 oznaczono przy użyciu spektroskopii masowej UPLC-MS/MS. Badane ekstrakty różniły się znacznie zawartością azjatykozydu i madekasozydu, na korzyść ekstraktu z rośliny szklarniowej. Badania *in vitro* zostały zakrojone na bardzo szeroką skalę, na sześciu liniach komórkowych, w tym na trzech liniach komórek prawidłowych: fibroblastach skóry ludzkiej (BJ-5ta), keratynocytach skóry ludzkiej (HaCaT), astrocytach (C8D1A) oraz na trzech liniach komórek nowotworowych: czerniaka skóry (linia A375), czerniaka skóry przerzut z płuca (linia WM793) i nowotworu wątroby – hepatocytach (HepG2).

Metodologia badań opisana jest w sposób jasny i przejrzysty. Rozdział „Materiały i Metody” został opracowany szczegółowo, lecz zarazem klarownie. Rezultaty badań opracowane są niezwykle starannie w rozdziale „Wyniki”. Przedstawiono je w sposób uporządkowany, zgodny z układem zaproponowanym w rozdziale poświęconym metodyce badań, co znacząco ułatwia ich ocenę. Zbadano wpływ wyciągów z wąkroty azjatyckiej CA1 i CA2 i saponin azjatykozyd i madekasozyd na żywotność i proliferację komórek sześciu linii komórkowych w kontekście bezpieczeństwa stosowania oraz potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej za pomocą testów oceniających: funkcje mitochondriów (test MTT), aktywność lizosomów (test z czerwienią obojętną), aktywność proliferacyjną (test z fioletem krystalicznym). Doktorantka zbadala wpływ wyciągów i saponin na żywotność astrocytów poddanych działaniu doksorubicyny w aspekcie aktywności glioprotekcyjnej. W celu oszacowania potencjału mutagennego wyciągi wodne z wąkroty azjatyckiej objęte projektem badano w teście Ames, wykorzystując szczepy *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100 stosowane w rutynowych badaniach przesiewowych mutagenności. Doktorantka dokonała oceny działania przeciwstarzeniowego badanych wyciągów i saponin. Zbadala wpływ wyciągów i saponin na aktywność migracyjną keratynocytów w teście zarastania rany *in vitro*. Określiła aktywność antyoksydacyjną badanych dwóch wyciągów z wąkroty azjatyckiej oraz azjatykozydu i madekasozydu za pomocą trzech różnych testów (DPPH, FRAP i, ROS-Glo(H₂O₂)). Kontynuacją tych eksperymentów było zbadanie zdolności fotoprotekcyjnej wyciągów i saponin poprzez pomiar właściwości absorpcyjnych w zakresie promieniowania UV. Rozdział jest napisany bardzo kompetentnie, zawiera wszystkie informacje potrzebne do wyciągnięcia końcowych wniosków z badań.

Autorka rozprawy doktorskiej wykazała, że testowane wyciągi nie wykazują aktywności cytotoksycznej ani mutagennej w odniesieniu do komórek prawidłowych keratynocytów, fibroblastów i astrocytów, natomiast działają cytotoksycznie, a także hamują proliferację komórek nowotworowych czerniaka linii A375 i linii WM793. Ciekawym wydaje

się brak cytotoksyczności zarówno wyciągów CA1, CA2, jak i saponin azjatykozydu i madekasozydu na komórki nowotworowe wątroby hepatocyty (HepG2). Obydwa testowane przez Doktorankę wyciągi charakteryzowały się działaniem antyoksydacyjnym, fotoprotekcyjnym, glioprotekcyjnym, przy czym ekstrakt z rośliny szklarniowej CA2 wykazywał dodatkowo działanie przeciwstarzeniowe. Autorka stwierdziła wysoką aktywność przeciwstarzeniową oraz przeciwluszczycową madekasozydu. Uzyskane wyniki przyczyniły się do poszerzenia wiedzy o aktywności rośliny *Centella asiatica*, pozwoliły po raz pierwszy wykazać działania wodnych wyciągów CA1 i CA2, porównać aktywność wyciągów otrzymanych z roślin z hodowli szklarniowej i z hodowli *in vitro*, a także po raz pierwszy wyłoniły madekasozyd jako składnik ekstraktów z wąkroty azjatyckiej o bardzo silnej, korzystnej aktywności przeciwstarzeniowej i glioprotekcyjnej.

Dyskusja liczy 19 stron i jest podzielona na 6 rozdziałów. Wydaje się to słusznym zabiegiem przy omawianiu tak wielkiej ilości badań własnych i konfrontacji ich z badaniami innych autorów. W rozdziale tym Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę uzyskanych wyników badań własnych i skonfrontowała je z osiągnięciami innych zespołów badawczych. Rozdział dysertacji pt. „Podsumowanie i wnioski końcowe”, zawiera 6 wniosków, które wynikają z przeprowadzonych bardzo szeroko zakrojonych badań eksperymentalnych.

Praca doktorska mgr Magdaleny Wyszowskiej-Kolatko pt. „Ocena aktywności biologicznej *in vitro* wyciągów z wąkroty azjatyckiej” rodzi kilka refleksji recenzentki:

1. Cel badań, zdaniem recenzentki został zakrojony zbyt szeroko. Obejmuje on badanie aktywności cytotoksycznej, proliferacyjnej, mutagennej, glioprotekcyjnej, antyoksydacyjnej, fotoprotekcyjnej wyciągu wodnego z wąkroty azjatyckiej otrzymanego z rośliny pochodzącej ze stanowiska szklarniowego (CA1), wyciągu z rośliny z hodowli *in vitro* (CA2) oraz ich głównych składników aktywnych azjatykozydu i madekasozydu, czyli badaniu poddano aż cztery komponenty i do tego w różnych stężeniach i różnych czasach inkubacji. Badania te zaplanowano i zrealizowano aż na sześciu liniach komórkowych, trzech prawidłowych i trzech nowotworowych. Czy nie należało ograniczyć badań tylko do komórek prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej oraz komórek naskórka keratynocytów? Badania na komórkach nowotworowych mogłyby być przedmiotem rozważań innego pogłębionego opracowania naukowego, a na komórkach glejowych astrocytach jeszcze innej dysertacji.
2. Wniosek 3 wysunięty w dysertacji w rozdziale „Podsumowanie i wnioski końcowe”, cytując „Dowodzono selektywności działania ekstraktów CA1 i CA2, czyli aktywności cytotoksycznej w stosunku do komórek nowotworowych i bezpieczeństwa w stosunku do komórek prawidłowych.” zdaniem recenzentki nie jest precyzyjny, gdyż jak sama Doktorantka

wykazała w swoich badaniach, oba wyciągi CA1 i CA2 nie wykazały działania cytotoksycznego na komórki nowotworowe wątroby HepG2. Należałoby sprecyzować jakich komórki nowotworowych i prawidłowych dotyczy wnioszek.

3. Zdaniem Recenzentki należałoby określić bioaktywne substancje frakcji triterpenowej w ekstraktach CA1 i CA2 z *Centella asiatica*

4. Wiemy, że zawartość procentowa czterech podstawowych związków frakcji triterpenowej: kwasów (azjatykowego, madekasowego) oraz azjatykozydu i madekasozydu, w wyciągach wodnych i alkoholowych wątroty azjatyckiej różni się znacznie w zależności od ekotypu. Dlatego istotne przy wyciąganiu wniosków z badań opisanych w dysertacji jest określenie z jakiego ekosystemu pochodziła roślina, z której wyciągi są przedmiotem dysertacji?

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Magdaleny Wyszkwskiej-Kolatko pt. "Ocena aktywności biologicznej *in vitro* wyciągów z wątroty azjatyckiej" cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość praktyczną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Doktorantkę. Dysertacja jest bardzo obszerna, dowodzi ogromnego zaangażowania, pracowitości i entuzjazmu naukowego, pasji nie tylko Autorki rozprawy doktorskiej, ale również Jej Promotor prof. Elżbiety Pękali oraz Promotor Pomocniczej Dr Pauliny Koczurkiewicz. Rozprawę doktorską oceniam wysoko, uważam za interesującą. Stanowi ona samodzielny dorobek naukowy, w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i spełnia wymogi określone w Art. 13 ust. 1 z dn. 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym z późniejszymi poprawkami z 2014r. (Dz.U. Poz. 1852). Z wielką przyjemnością mam zaszczyt przedstawić wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Magdaleny Wyszkwskiej-Kolatko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakład Biotechnologii

prof. dr hab. Anna Bielawska