



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Ciesielskiej-Figlon
pt. „Wpływ olejku eterycznego z nasion czarnuszki siewnej (*Nigella sativa*) na
aktywację, proliferację i apoptozę limfocytów T”**

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. n.med. Katarzyny Lisowskiej (promotor pomocniczy dr n.med. Agnieszka Daca) w Zakładzie Fizjopatologii, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Klaudii Ciesielskiej-Figlon dotyczy oceny wpływu olejku eterycznego z nasion czarnuszki siewnej oraz dwóch jego oczyszczonych komponentów o udokumentowanej aktywności biologicznej, na ekspresję wybranych antygenów powierzchniowych, proliferację i produkcję cytokin oraz podatność na apoptozę limfocytów T krwi obwodowej człowieka. Powyższe aspekty były oceniane w warunkach hodowli *in vitro* z użyciem komórek izolowanych od osób zdrowych obu płci oraz kobiet chorych na przewlekłe limfocytowe zapalenie tarczycy (choroba Hashimoto). Sama tematyka przedstawionych badań jest bardzo interesująca, gdyż prozdrowotne właściwości tego olejku były wykorzystywane już w starożytności za czasów faraonów w leczeniu chorób alergicznych oraz schorzeń układu oddechowego i sercowo-naczyniowego. Do dzisiaj doceniane są również walory smakowe samych nasion czarnuszki, co sprzyja ich szerokiemu zastosowaniu w przemyśle spożywczym, zwłaszcza jako dodatek do pieczywa i mięs oraz w kulinariach dnia codziennego, również w formie sproszkowanej przyprawy. W literaturze fachowej podnoszone są właściwości przeciwbakteryjne, przeciw pasożytnicze, przeciwgrzybicze i przeciwzapalne zarówno nasion czarnuszki, jak i olejku eterycznego z nich pozyskiwanego, który zawiera skondensowane substancje czynne o działaniu immunomodulującym. W tym kontekście podjęta przez Doktorantkę tematyka badań jest bardzo aktualna i ważna, zarówno z czysto poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia, zwłaszcza w odniesieniu do schorzeń o podłożu autoimmunizacyjnym.

Strona formalna rozprawy.

Doktorantka skorzystała z możliwości jakie daje Art.187 pkt.3 ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dn. 20 lipca 2018 r. i przedstawiła swoją rozprawę jako

Instytut Pediatrii

Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii | Zakład Immunologii Klinicznej
ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków, tel. +48 12 658 24 86, faks +48 12 658 17 56
www.cm-uj.krakow.pl

„(...) zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych (...)”. Na rozprawę składają się łącznie 3 artykuły, w tym 2 oryginalne i 1 przeglądowy, spełniające ustawowy wymóg spójności tematycznej, opublikowane w latach 2022-23 w czasopiśmie międzynarodowym z kwartyla Q1, o sumarycznym współczynniku oddziaływania $IF=21,5$ i punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki wynoszącej 300 punktów. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem.

Rozprawę poprzedza zestawienie podstawowych dla tej tematyki słów kluczowych, zarówno w języku polskim, jak i angielskim, wykaz stosowanych w tekście skrótów, informacja o źródłach finansowania przedmiotowych badań, w tym programie „Młody Badacz” realizowanym w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym oraz o uzyskaniu na ich prowadzenie zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Dalej następują streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenie w problematykę podjętych badań oraz opis wyników załączonych publikacji. W osobnym dokumencie Doktorantka przedstawiła oświadczenia współautorów publikacji o ich indywidualnym wkładzie w powstawanie tych opracowań.

W sytuacji, gdy dysertację doktorską stanowi cykl opublikowanych artykułów recenzent ma teoretycznie ułatwione zadanie, gdyż publikacje zostały już poddane wnikliwej ocenie przez recenzentów wyznaczonych przez redakcje czasopism. W praktyce, niełatwo jest jednak ocenić indywidualny wkład doktoranta, zwłaszcza w przypadku publikacji wieloautorskich, a istotne jest określenie, które wyniki przedstawione w publikacjach oryginalnych, kluczowych w postępowaniu na stopień doktora, są jej/jego zasługą. W tym konkretnym przypadku, z załączonych do rozprawy oświadczeń współautorów prac oryginalnych jasno wynika, iż mgr Klaudia Ciesielska-Figlon miała wiodący udział w ich powstaniu, samodzielnie przeprowadzając doświadczenia laboratoryjne i przygotowując pierwsze wersje manuskryptów.

Ocena merytoryczna rozprawy.

Omówienie cyklu publikacji posiada układ typowy dla opracowań naukowych. W krótkim „Wprowadzeniu” Autorka zapoznaje czytelnika z problematyką podjętych badań, poczynając od charakterystyki i właściwości leczniczych czarnuszki siewnej, a zwłaszcza pozyskiwanego z jej nasion ekstraktu oraz oleju. W tym zakresie Doktorantka przytacza wyniki dotychczasowych badań, prowadzonych *in vivo* na modelach zwierzęcych oraz *in vitro*. Zwraca uwagę na nieliczne próby kliniczne, w których oceniano wpływ podawania różnych preparatów czarnuszki, w tym wyciągu z jej nasion, samych sproszkowanych nasion lub tłoczonego z nich oleju, na przebieg odpowiednio, astmy oskrzelowej, reumatoidalnego zapalenia stawów i choroby Hashimoto. We wszystkich tych badaniach zaobserwowano korzystny wpływ podawania preparatów czarnuszki na przebieg chorób, potwierdzony zarówno złagodzeniem manifestacji klinicznych, jak i poprawą wartości parametrów laboratoryjnych, w tym poziomu autoprzeciwciał, służących do monitorowania przebiegu choroby. Z tej części rozprawy czytelnik dowiaduje się również, iż przedstawione badania są

kontynuacją obserwacji poczynionych przez Autorkę jeszcze w czasie realizacji Jej pracy magisterskiej i opublikowanych w czasopiśmie „Human Immunology”.

Cel główny oraz cele szczegółowe badań zostały jasno i logicznie sformułowane w 3 punktach. Metodologia badań została opisana w pracach doświadczalnych wchodzących w skład rozprawy i dodatkowo skrótowo przedstawiona w rozdziale „Materiały i metody”. Na uwagę zasługuje tu szerokie wykorzystanie cytometrii przepływowej jako dominującej metody badawczej, użytej m.in. do oceny proliferacji limfocytów T po stymulacji przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD3 oraz do badania wpływu na ten proces olejku z czarnuszki lub izolowanych z niego aktywnych składników, tj. tymochinonu i p-cymenu. Ze względu na rygorystyczne wymagania oraz trudności w analizie uzyskanych wyników, szczególnie w odniesieniu do ludzkich limfocytów T, zastosowanie tego testu i przytaczanie uzyskanych w nim wyników jest rzadko spotykane w literaturze. Tym większe więc uznanie dla Doktorantki za podjęcie tego wyzwania metodycznego, z którego mgr Ciesielska-Figlon wywiązała się wzorowo. Poza oceną proliferacji limfocytów T, cytometria przepływowa została w rozprawie wykorzystana do analizy ekspresji wybranych antygenów aktywacji - CD25 i CD28 na powierzchni limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, do oceny apoptozy limfocytów T w teście wiązania aneksyny V oraz do oceny stężenia wybranych cytokin w nadsączach hodowli komórek jednojądrzastych krwi stymulowanych przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD3, w obecności różnych stężeń alkoholowego roztworu olejku eterycznego lub jego składników (test „Cytokine Bead Array”). Należy podkreślić, iż wszystkie te testy wymagają dużego doświadczenia w pracy z cytometrem przepływowym, a ich wykorzystanie przez Doktorantkę do badań będących podstawą rozprawy, potwierdza Jej wysokie umiejętności w tym zakresie. W aspekcie metodologii badań mam jednak jedną uwagę – w opisie hodowli komórkowych, zarówno w samych publikacjach, jak i ich omówieniu nie znalazłem informacji o grupie kontrolnej, w której komórki byłyby stymulowane przeciwciałami anti-CD3 w obecności roztworu etanolu, o stężeniu odpowiadającym użytemu do hodowli po rozpuszczeniu olejku z czarnuszki lub jego składników. Wprowadzenie takiej dodatkowej kontroli pozwoliłoby na ocenę wpływu samego etanolu na proliferację limfocytów T indukowaną przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD3. Można domniemywać, iż wpływ ten był niewielki, niemniej kontrola taka byłaby dopełnieniem, istotnym dla pełnej klarowności uzyskanych w tym teście wyników.

Wyniki z analiz wpływu olejku czarnuszki i jego oczyszczonych komponentów na proliferację, apoptozę i ekspresję antygenów CD25 i CD28 w odniesieniu do limfocytów T zdrowych dawców krwi Doktorantka przedstawiła w artykule pt. „The influence of *Nigella sativa* essential oil on proliferation, activation, and apoptosis of human T lymphocytes in vitro”, opublikowanym w czasopiśmie *Biomedicine and Pharmacotherapy* o współczynniku oddziaływania IF=7,5. Przedstawione w tym artykule wyniki dokumentują antyproliferacyjny i proapoptotyczny efekt olejku eterycznego z nasion czarnuszki względem limfocytów T. Efekt ten był najbardziej nasilony w najwyższych stężeniach preparatu (rozcieńczenia 1:10 i 1:50). Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka słusznie konkluduje, iż odpowiedzialny za takie działanie może być tymochinon, który użyty w formie oczyszczonej w najwyższym stężeniu 200 µg/ml znacząco hamował proliferację limfocytów T i indukował ich apoptozę. Doktorantka podchodzi do tego wniosku jednak z należytą ostrożnością, zwracając uwagę, iż zawartość tymochinonu w całej frakcji eterycznej olejku z czarnuszki nie

przekraczała kilku procent, co może sugerować istotny udział w tym zjawisku również innych składników olejku, nie badanych tu w postaci oczyszczonej. Taka interpretacja uzyskanych wyników dowodzi umiejętności krytycznego spojrzenia na rezultaty własnych badań i już sporej dojrzałości Doktorantki w tym aspekcie. Jest to cecha ze wszech miar pożądana u naukowców na wszystkich etapach rozwoju naukowego, a niestety rzadko spotykana, zwłaszcza u młodych badaczy. Tym bardziej więc zasługuje na uznanie.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na pewną lukę w dyskusji tych wyników. W moim odczuciu należałoby podkreślić, iż wyniki oceny wpływu olejku i jego składników na proliferację i apoptozę limfocytów T są ze sobą wzajemnie powiązane. Kwestią do rozstrzygnięcia pozostaje wszak czy to indukcja apoptozy prowadzi do obniżonej proliferacji limfocytów, czy też zablokowanie proliferacji, kieruje komórki na szlak śmierci na drodze apoptozy. Wyjaśnienie tego problemu może być przedmiotem dalszych badań mgr Ciesielskiej-Figlon już po uzyskaniu stopnia doktora. Natomiast nie do końca przekonywają mnie wyniki oceny późnej apoptozy i nekrozy limfocytów T pod wpływem badanych preparatów użytych w najwyższym stężeniu, po długim czasie hodowli - 72 i 120 godz. W warunkach *in vitro* komórki apoptotyczne nie mogą być efektywnie usuwane przez fagocyty, np. monocyty krwi czy makrofagi tkankowe, jak to ma miejsce *in vivo*, w związku z czym z upływem czasu dochodzi do ich przejścia do stanu późnej apoptozy, a następnie wtórnej nekrozy i samoistnej dezintegracji. Obserwowany w pracy istotny wzrost odsetka limfocytów T w późnej apoptozie i nekrozie po tak długich czasach hodowli był zapewne rezultatem tego naturalnego procesu degradacji komórek apoptotycznych, zachodzącego w warunkach hodowli *in vitro*. W tym kontekście należy żałować, iż Doktorantka nie pokusiła się o zbadanie tego zjawiska w krótszych czasach hodowli. Wyniki takich badań pozwoliłyby też zweryfikować czy użyte stężenia preparatów czarnuszki, zwłaszcza te najwyższe z nich (rozcieńczenia 1:10 i 1:150), nie są stężeniami toksycznymi dla komórek. Ciekawy też jestem interpretacji przez Doktorantkę w trakcie obrony swojej rozprawy, wyników wpływu badanych preparatów czarnuszki na ekspresję antygenów CD25 i CD28 na limfocytach T. Wyniki te w publikacji zostały dość pobieżnie przedstawione na wykresach dot-plot w suplemencie publikacji. Doktorantka nie odniosła się do nich również w załączonym omówieniu wyników swoich badań.

Drugi artykuł oryginalny załączony do cyklu prac pt. „The impact of *Nigella sativa* essential oil on T cells in women with Hashimoto's thyroiditis”, opublikowany w czasopiśmie *Antioxidants*, IF=7,0 przedstawia wyniki z podstawowego schematu badań z wykorzystaniem olejku z czarnuszki z publikacji nr 1, ale w odniesieniu do stanu patologii, jakim jest limfocytowe zapalenie tarczycy (choroba Hashimoto). Wybór jednostki chorobowej nie był tu przypadkowy, bowiem wcześniejsze dane literaturowe z nielicznych prób klinicznych wskazywały na pozytywny wpływ spożywania nasion czarnuszki siewnej na parametry laboratoryjne oceny stanu klinicznego pacjentów z chorobami o podłożu autoimmunizacyjnym, w tym chorobą Hashimoto. W odróżnieniu od publikacji nr 1, Doktorantka zrezygnowała tu z badań wpływu oczyszczonych składników olejku, tj. tymochinonu i p-cymenu na limfocyty T chorych kobiet, a pokusiła się o oznaczenie stężenia cytokin Th1/Th2 i Th17 w nadsączach z hodowli komórek jednojądrzastych krwi, stymulowanych przeciwciałami anti-CD3 w obecności olejku czarnuszki, użytym w

identycznych, jak w publikacji nr 1, stężeniach. Wyniki te potwierdziły obserwacje przedstawione w publikacji nr 1, również w odniesieniu do limfocytów T i ich subpopulacji CD4⁺ i CD8⁺ u kobiet z limfocytowym zapaleniem tarczycy. Zaobserwowano również istotny wpływ olejku na profil uwalnianych przez komórki cytokin. Jego obecność (w najwyższym stężeniu) w hodowlach komórek jednojądrzastych izolowanych z krwi kobiet chorych, stymulowanych przeciwciałami anti-CD3 wpływała hamująco na wydzielanie TNF α i IL-17A – cytokin o silnym działaniu prozapalnym. Z drugiej strony, komórki jednojądrzaste izolowane od zdrowych kobiet po stymulacji przeciwciałami anti-CD3 z dodatkiem olejku w najwyższych stężeniach produkowały więcej IL-2 i IL-4, ale mniej IL-10. Obserwacje te dowodzą immunoregulacyjnego wpływu olejku z czarnuszki na uwalnianie cytokin przez komórki jednojądrzaste krwi. Efekt ten był jednak zróżnicowany i zależał od rodzaju cytokiny i stanu zdrowia badanych kobiet – inny efekt zaobserwowano np. dla produkcji TNF α u kobiet zdrowych, a inny u chorych z limfocytowym zapaleniem tarczycy. Ze względu na fakt, iż wiele z badanych tu cytokin może być produkowanych nie tylko przez limfocyty T, ale i inne komórki jednojądrzaste obecne w hodowlach, trudno obserwowane efekty olejku odnieść wyłącznie do limfocytów T. W tym kontekście, należy żałować, iż Doktorantka nie zdecydowała się na oznaczenia cytoplazmatycznej produkcji wybranych cytokin, co pozwoliłoby na zdefiniowanie subpopulacji limfocytów T, głównie spośród CD4⁺ - Th1, Th2 i Th17, a także Treg i na podstawie zmian w ich poziomach, wnieść o immunoregulacyjnym działaniu badanego preparatu.

Ostatnia praca cyklu to publikacja przeglądowa pt. „The immunomodulatory effect of *Nigella sativa*”, opublikowana również w czasopiśmie *Antioxidants*, IF=7,0. Przedstawia ona podsumowanie obecnej wiedzy na temat immunomodulacyjnych właściwości czarnuszki siewnej i różnych preparatów z niej pozyskiwanych. Jest to kompendium wiedzy, zestawiające wyniki dotychczasowych badań z tego tematu zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. W moim odczuciu, publikacja ta w najbliższym czasie będzie szeroko cytowana przez badaczy zajmujących się tą tematyką.

Podsumowanie.

Przedłożona do oceny rozprawa mgr Klaudii Ciesielskiej-Figlon jest istotnym opracowaniem na temat immunomodulacyjnych właściwości olejku eterycznego z nasion czarnuszki siewnej. Problematyka badań przedstawionych w publikacjach oryginalnych oparta została na wcześniejszych obserwacjach Doktorantki, poczynionych jeszcze w okresie realizacji Jej pracy magisterskiej w odniesieniu do oleju tłustego otrzymanywanego z tych nasion. Przedłożona rozprawa jest pogłębieniem tych obserwacji w odniesieniu do olejku eterycznego, o skondensowanej zawartości substancji biologicznie czynnych. Przedstawione w rozprawie wyniki z jednej strony potwierdzają wcześniejsze dane dotyczące wpływu różnych preparatów czarnuszki siewnej na wybrane funkcje biologiczne limfocytów T, a z drugiej, dostarczają nowych, wartościowych danych na ten temat, w odniesieniu do właściwości olejku eterycznego. Pewien niedosyt budzi jednak brak szerszej oceny zmian fenotypowych limfocytów T pod wpływem badanego preparatu. Wyniki z oceny ekspresji antygenów CD25 i CD28 są mało przekonujące, a Doktorantka nie pokusiła się o zbadanie

ekspresji innych markerów związanych z aktywacją limfocytów T, jak np. PD-1 czy CTLA-4, istotnych z punktu widzenia mechanizmów regulacji odpowiedzi adaptacyjnej. Zabrakło mi też zbadania mechanizmów indukcji apoptozy limfocytów T pod wpływem badanego preparatu czarnuszki. Ocena ekspresji antygenu Fas i FasL czy aktywności wybranych kaspaz pozwoliłaby na określenie na jakim szlaku dochodzi do indukcji apoptozy limfocytów T. Wszystkie te aspekty mogą być jednak przedmiotem dalszych pogłębionych badań Kandydatki, już po uzyskaniu stopnia doktora.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Klaudii Ciesielskiej-Figlon spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (t.j. Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.). W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Klaudii Ciesielskiej-Figlon do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Kraków, 21.11.2023

Katedra Immunologii Klinicznej
i Transplantologii UJ CM


dr hab. n. med. Jarosław Baran, prof. UJ