



Lublin, dnia 28 listopada 2023 r.

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

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana pod kierownictwem naukowym Pani Promotor, Dr hab. n. med. Katarzyny Lisowskiej, oraz Pani Promotor pomocniczej, Dr n. med. Agnieszki Daca, w Katedrze i Zakładzie Fizjopatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Założenia badawcze Doktorantki zostały zrealizowane w cyklu trzech spójnych tematycznie artykułów, w tym dwóch oryginalnych i jednego przeglądowego, podsumowującego obecną wiedzę na temat immunomodulacyjnego wpływu czarnuszki siewnej. W każdej publikacji Doktorantka jest pierwszym Autorem, co potwierdza Jej wiodący wkład w powstanie doniesień. Prace zostały wykonane w ramach środków statutowych Katedry i Zakładu Fizjopatologii Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, kierowanego przez prof. dr hab. n. med. Jacka Witkowskiego oraz programu wspierającego „Młody Badacz”, zadanie badawcze nr 01-0422/08/262.

Celem badań, przeprowadzonych przez Panią magister Klaudię Ciesielską-Figlon, w ramach opracowania dysertacji doktorskiej, była ocena wpływu olejku eterycznego, pozyskanego z nasion czarnuszki siewnej (*Nigella sativa*) na ludzkie limfocyty T, z uwzględnieniem ich fenotypu powierzchniowego, zdolności do proliferacji oraz produkcji cytokin, a także podatności na apoptozę.

Praca rozpoczyna się od wykazu publikacji, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, poprzedzonych słowami kluczowymi i wykazem użytych skrótów. Następnie Autorka umieściła streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, scharakteryzowała cele prowadzonych badań, przedstawiła materiał i metody. W dalszej części Doktorantka umieściła opisy publikacji, bibliografię oraz załączyła publikacje, wchodzące w skład rozprawy:

1. Praca oryginalna

Ciesielska-Figlon K, Daca A, Kokotkiewicz A, Łuczkiwicz A, Zabiegała B, Witkowski J, Lisowska K. The influence of *Nigella sativa* essential oil on proliferation, activation, and apoptosis of human T lymphocytes in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2022; vol. 153: 113349. Impact Factor – 7.5; Punktacja MNiSW – 100; Q1

2. Praca oryginalna

Ciesielska-Figlon K, Wojciechowicz K, Daca A, Kokotkiewicz A, Łuczkiwicz A, Witkowski J, Lisowska K. The impact of *Nigella sativa* essential oil on T cells in women with Hashimoto's thyroiditis. *Antioxidants* 2023; vol. 12: 1246. Impact Factor – 7.0; Punktacja MNiSW – 100; Q1

3. Praca przeglądowa

Ciesielska-Figlon K, Wojciechowicz K, Wardowska A, Lisowska K. The immunomodulatory effect of *Nigella sativa*. *Antioxidants* 2023; vol. 12: 1340. Impact Factor – 7.0; Punktacja MNiSW – 100; Q1.





Na uwagę i docenienie zasługuje fakt, że łączny współczynnik Impact Factor cyklu prac wynosi 21.5, a łączna punktacja MNiSW/MEiN 300, co świadczy o doskonałej jakości przeprowadzonych badań, które już na tak wczesnym etapie drogi naukowej pozwoliły na opublikowanie artykułów w wiodących czasopismach.

Tematyka rozprawy jest aktualna i istotna, zarówno w aspekcie naukowym, jak i praktycznym, ponieważ substancje pochodzenia roślinnego, od wieków powszechnie stosowane w medycynie ludowej z powodu swoich właściwości leczniczych, cieszą się obecnie dużym zainteresowaniem naukowców. Wśród roślin najczęściej wymienianych w literaturze, ważne miejsce zajmuje czarnuszka siewna (*Nigella sativa*), należąca do rodziny Jaskrowatych, o owocach, zawierających drobne i aromatyczne nasiona, z których pozyskuje się olej, zawierający frakcję tłustą bogatą w nienasycone kwasy tłuszczowe, frakcję eteryczną oraz substancje pochodzenia roślinnego, takie jak: alkaloidy, tokoferole, fitosterole, saponiny i flawonoidy. Uznaje się, że frakcja eteryczna ma największy potencjał immunomodulacyjny, ze względu na zawarte w niej substancje aktywne, takie jak tymochinon, p-cymen, alfa-tujen i karwakrol. Obserwacje kliniczne wskazują, że nasiona, ekstrakty i olej z czarnuszki siewnej mogą łagodzić objawy chorób o podłożu immunologicznym takich jak astma, alergiczny nieżyt nosa oraz reumatoidalne zapalenie stawów. Z kolei tymochinon ma właściwości antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe, a wraz z p-cymenem wykazuje właściwości przeciwzapalne. Dokładny mechanizm działania czarnuszki siewnej na układ odpornościowy nie jest jednak w pełni poznany. W przedstawionej mi do oceny rozprawie badano właściwości immunomodulacyjne olejku eterycznego otrzymanego z nasion czarnuszki siewnej oraz substancji chemicznych zidentyfikowanych w olejku eterycznym: tymochinonu oraz p-cymenu.

W opinii recenzentki, wprowadzenie do rozprawy jest zwięzłe, ale w sposób wyczerpujący uzasadnia przeprowadzenie badań w interesującym Doktorantkę obszarze. Użyte odnośniki literaturowe są aktualne. Cele pracy zostały poprawnie i szczegółowo scharakteryzowane jako:

1. Pozyskanie olejku eterycznego metodą hydrodestylacji z nasion czarnuszki siewnej i przeanalizowanie jego chemicznej kompozycji;
 2. Analizowanie wpływu wybranych etanolowych rozcieńczeń olejku eterycznego na limfocyty T CD4+ i CD8+ w grupie osób zdrowych i kobiet chorych na zapalenie tarczycy Hashimoto z uwzględnieniem ekspresji antygenów powierzchniowych w tym CD25 i CD28, ich zdolności do proliferacji, produkcji cytokin oraz podatności na apoptozę;
 3. Analizowanie wpływu wybranych stężeń tymochinonu i rozcieńczeń p-cymenu na limfocyty T CD4+ i CD8+ w grupie osób zdrowych z uwzględnieniem ich zdolności do proliferacji oraz podatności na apoptozę.
- Czy Doktorantka planuje w Swojej dalszej pracy naukowej scharakteryzować inne parametry układu odpornościowego, modulowane poprzez substancje uzyskane z nasion czarnuszki siewnej?*

Zasady doboru uczestników badania w rozdziale Materiał i Metody, w tym kryteria włączenia i wyłączenia oraz podział na grupy, zostały opisane czytelnie. Właściwości olejku eterycznego oceniono u osób zdrowych oraz u kobiet ze zdiagnozowanym autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy. Za pomocą cytometrii przepływowej przeanalizowano fenotyp powierzchniowy, aktywność proliferacyjną oraz podatność na apoptozę ludzkich limfocytów T, stymulowanych monoklonalnym przeciwciałem anti-CD3, w obecności seryjnych, etanolowych rozcieńczeń badanego olejku oraz tymochinonu i p-cymenu. Dodatkowo oceniono zmiany profilu cytokinowego w nadsączach pochodowlanych. Metodyka badawcza





jest dopasowana do celów postawionych przez Doktorantkę. Wszystkie procedury zostały zwięźle i poprawnie opisane. Analizy statystyczne zostały także opisane prawidłowo.

W świetle doniesień innych autorów, wydaje się zasadnym powtórzenie przeprowadzonych analiz w materiale pozyskanym od pacjentów, cierpiących na inne schorzenia, w tym autoimmunizacyjne, infekcyjne oraz nowotworowe. Czy Doktorantka mogłaby uzasadnić – na podstawie dostępnej literatury i własnych obserwacji – na przebieg jakich schorzeń olej z czarnuszki może wywierać pozytywny wpływ?

Opis publikacji 1: Ciesielska-Figlon K, Daca A, Kokotkiewicz A, Łuczkiwicz A, Zabiegała B, Witkowski J, Lisowska K. The influence of *Nigella sativa* essential oil on proliferation, activation, and apoptosis of human T lymphocytes in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2022; vol. 153: 113349. W niniejszej pracy opisano sposób pozyskania olejku eterycznego z nasion czarnuszki siewnej, analizy jego kompozycji chemicznej oraz wyniki doświadczeń, których celem było sprawdzenie, jak wybrane rozcieńczenia olejku eterycznego, a także wybrane substancje aktywne – tymochinon i p-cymen – wpływają na fenotyp oraz aktywność limfocytów T CD4+ i CD8+ w grupie zdrowych ochotników obu płci. Założenia oraz metodologia nie budzą zastrzeżeń, a uzyskane wyniki pozwoliły Autorce na sformułowanie trzech interesujących wniosków: 1/ Olejek eteryczny pozyskiwany z nasion *Nigella sativa* ma potencjalne działanie immunomodulujące, ponieważ hamuje aktywację ludzkich limfocytów T poprzez zahamowanie proliferacji oraz indukcję apoptozy w warunkach in vitro, głównie w najniższych rozcieńczeniach, 1:10 oraz 1:50. 2/ Za opisane właściwości może być odpowiedzialny tymochinon, który znacząco hamuje proliferację limfocytów T i indukuje ich apoptozę w najwyższych stężeniu. Jednak mając na uwadze fakt, że w oleju eterycznym znajduje się tylko kilka procent tej substancji, postawiono hipotezę, że prawdopodobnie nie jest to jedyny związek odpowiedzialny za tak silne właściwości immunomodulujące olejku eterycznego. 3/ P-cymen, mimo że stanowi większość frakcji eterycznej, nie wpływa na proliferację oraz apoptozę limfocytów i częściowo przeciwdziała efektom wywoływanym przez tymochinon.

Opis publikacji 2: Ciesielska-Figlon K, Wojciechowicz K, Daca A, Kokotkiewicz A, Łuczkiwicz A, Witkowski J, Lisowska K. The impact of *Nigella sativa* essential oil on T cells in women with Hashimoto's thyroiditis. *Antioxidants* 2023; vol. 12: 1246. W tej pozycji oryginalnej sprawdzono, jak wybrane rozcieńczenia olejku eterycznego wpływają na funkcjonowanie limfocytów T CD4+ i CD8+ w grupie kobiet chorych na zapalenie tarczycy Hashimoto. Do badania wpływu olejku włączono grupę 9-ciu kobiet ze zdiagnozowanym zapaleniem tarczycy Hashimoto (HT) oraz 9-ciu zdrowych kobiet, nieposiadających zdiagnozowanych chorób nowotworowych, autoimmunologicznych oraz nie przyjmujących leków na stałe, stanowiących grupę kontrolną. *Chociaż Autorka opublikowała pracę w wysoko punktowanym czasopiśmie, uwagę zwraca niewielka liczba osób, zakwalifikowanych do obu grup. Proponuję powiększenie analizowanych grup celem potwierdzenia, że uzyskano reprezentatywne wyniki i wyprowadzono odpowiednie wnioski, na które składają się następujące obserwacje Doktorantki:* 1/ Olejek eteryczny pozyskiwany z nasion czarnuszki siewnej działa proapoptotycznie i antyproliferacyjnie na preaktywowane komórki T u pacjentek z zapaleniem tarczycy Hashimoto oraz zdrowych kobiet w warunkach in vitro. 2/ Olejek eteryczny wpływa również na produkcję cytokin poprzez obniżenie stężenia niektórych cytokin ważnych dla regulacji procesów zapalnych, takich jak TNF, IL-17A oraz IL-10, przy jednoczesnym podwyższeniu stężeń IL-2 czy IL-4. Warto jednak zaznaczyć, że nie wpływał na produkcję IL-6 czy IFN- γ . 3/ Wrażliwość limfocytów na NSEO zależy również od stanu zdrowia osób badanych; olejek eteryczny nie wpływał istotnie na produkcję TNF u zdrowych kobiet, podczas gdy u pacjentek z HT w najniższych rozcieńczeniach istotnie ją zmniejszał.





Opis publikacji 3: Ciesielska-Figlon K, Wojciechowicz K, Wardowska A, Lisowska K. The immunomodulatory effect of *Nigella sativa*. *Antioxidants* 2023; vol. 12: 1340. Ostatni artykuł, zamykający cykl prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, jest pracą przeglądową. Artykuł ten podsumowuje obecną wiedzę na temat immunomodulacyjnego wpływu *Nigella sativa*. Doktorantka uwzględniła badania eksperymentalne, dotyczące zdolności czarnuszki siewnej do modulowania stanu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej oraz aktywności cytotoksycznej komórek układu odpornościowego. Przegląd opiera się na artykułach, książkach i referatach konferencyjnych wydrukowanych do września 2022 r., znalezionych w bazach danych Web of Science, PubMed, Wiley Online Library i Google Scholar. Wyniki badań opisane w tym przeglądzie pokazują, że czarnuszka wpływa na komórki odpornościowe poprzez modulowanie ich funkcji, takich jak zdolność do wytwarzania cytokin lub tlenu azotu, aktywności fagocytarnej i cytotoksycznej, proliferacji splenocytów i limfocytów T oraz podatności na apoptozę i nekrozę zarówno w warunkach *in vivo* i *in vitro*.

Reasumując, uzyskane wyniki wykazały, że olej eteryczny z nasion czarnuszki siewnej znacząco hamuje proliferację limfocytów T CD4+ i T CD8+ oraz indukuje śmierć komórek w sposób zależny od dawki, zarówno u osób zdrowych jak i pacjentek z zapaleniem tarczycy Hashimoto. Ponadto, olej eteryczny obniża ekspresję antygenów CD28 i CD25 istotnych dla aktywacji limfocytów. Antyproliferacyjny i proapoptotyczny efekt olejku eterycznego był związany z aktywnością tymochinonu. Z kolei p-cymen nie wpływał na proliferację ludzkich limfocytów T, ale w najwyższym stężeniu indukował ich nekrozę, a także częściowo przeciwdziałał niektórym skutkom obecności tymochinonu. Olej eteryczny znacząco obniżał stężenie TNF, IL-17A i IL-10 w nadsączach pochodowlanych. Z kolei poziom IL-4 i IL-2 istotnie wzrastał w obecności olejku. Olejek nie wpływał na stężenie IL-6 i IFN- γ . *Autorce nie udało się uniknąć drobnych potknięć gramatycznych i interpunkcyjnych, ale w żadnej mierze nie umniejszają one walorom merytorycznym rozprawy doktorskiej. Uzyskane wyniki mają wysokie znaczenie poznawcze, ponieważ wyjaśniają immunosupresyjne działanie nasion, ekstraktów oraz olejków pozyskanych z nasion czarnuszki siewnej, a ponadto mogą stanowić podstawę do prób wdrażania terapii z wykorzystaniem substancji pochodzenia roślinnego.*

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, pod względem merytorycznym i formalnym, spełnia zatem warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.). Wnoszę do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Klaudii Ciesielskiej-Figlon do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, mając na uwadze wysokie wskaźniki naukometryczne przedstawionego cyklu publikacji i aplikacyjny charakter poczynionych przez Doktorantkę odkryć, wnioskuję o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK

Zakładu Immunologii Doświadczalnej
Katedry Nauk Biomedycznych
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Ewelina Grywalska
Prof. dr hab. n. med. Ewelina Grywalska

