

Warszawa 14.10.2017

**Dr hab. Mariusz Sacharczuk, prof. IGHZ PAN**  
**Zespół Neurogenomiki**  
**Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk**

## **OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**mgr Krzysztofa Siczka**

**zatytułowanej**

### **„NOWE FORMY TERAPII NIESWOISTYCH CHORÓB ZAPALNYCH JELITA GRUBEGO W OPARCIU O PREPARATY NA BAZIE SREBRA”**

Problematyka chorób zapalnych przewodu pokarmowego, pomimo że dokonał się ogromny postęp w terapii, nadal pozostaje jednym z głównych wyzwań współczesnej medycyny. Nieswoiste procesy zapalne przewodu pokarmowego obejmują grupę chorób, wśród których wyróżnia się dwie podstawowe tj. wrzodziejące zapalenie jelita grubego i chorobę Leśniowskiego-Crohna, ale również kolagenowe i limfocytowe należące do wspólnej grupy zapaleń mikroskopowych. Podział ten podyktowany jest pewnymi cechami o pewnym stopniu scharakteryzowania, tj. miejscem występowania procesu zapalnego i rozległością zmian. Niemniej jednak i ten podział często nie pozwala na pewną diagnozę pacjentów co do formy procesu zapalnego.

NChZJ stanowią istotny problem współczesnej gastroenterologii, ze względu na obserwowany od kilkadziesiąt lat ogólnoswiatowy dynamiczny wzrost zachorowalności, szczególnie w obszarach miejskich krajów rozwiniętych, oraz z uwagi na stosunkowo młody wiek chorych i związane z tym konsekwencje społeczne. Na wagę problematyki NChZJ składa się zarówno poziom objawów bólowych i funkcjonalnych oraz czas ich trwania, często przebiegający przez całe życie i wyłączających pacjenta z życia zawodowego i społecznego.

Pierwsze opisy NChZJ pojawiające się już w tekstach starożytnych świadczą, iż problematyka NChZJ wpisuje się w długą historię ludzkości i nie wynika wyłącznie ze specyfiki obecnego trybu życia i warunków środowiska. Pomimo wielu lat badań etiologia i patogenez tych chorób jest nie do końca poznana, co sprawia iż obecnie nie mamy wypracowanych metod

terapeutycznych skierowanych na leczenie przyczynowe. Trudności w identyfikacji czynników wywołujących i podtrzymujących NChZJ wynikają ze złożonych interakcji genetyczno-środowiskowych, w tym infekcji bakteryjnych i wirusowych oraz stresu pełniącego istotną rolę w inicjacji zaostrzeń NChZJ i leżących u podstaw etiologii tych chorób.

Dostępne metody terapeutyczne skupiają się głównie na postępowaniu przeciwzapalnym i przeciwbólowym oraz w wielu przypadkach wrzodziejącego zapalenia jelita grubego również chirurgicznym. Istotną składową schematów terapeutycznych jest również zastosowanie klasycznych leków przeciwdepresyjnych, których skuteczność świadczy o komponentcie psychicznym i emocjonalnym etiologii NChZJ. W wielu przypadkach postępowanie terapeutyczne obejmuje również leczenie powikłań pozajelitowych ze strony wątroba i dróg żółciowych, skóry, narząd wzroku, układu stawowego i innych.

W świetle powyższych danych, tematyka przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr Krzysztofa Siczka wydaje się bardzo aktualna i celowa. W swojej pracy Doktorant omawia nieswoiste choroby zapalne jelit, w tym chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChLC) i wrzodziejące zapalenie okrężnicy (WZJG) opisując ich epidemiologię, patogenezę, objawy kliniczne i metody leczenia. Przedstawia zastosowanie srebra w badaniach podstawowych i klinicznych, jego właściwości biologiczne, rolę w stanach zapalnych, preparaty i perspektywy przyszłych zastosowań. W praktyce lekarskiej wykazano już pozytywny wpływ preparatów srebra terapii wielu chorób o podłożu zapalnym. Jak słusznie zauważył Doktorant, aby w pełni wykorzystać potencjał terapeutyczny srebra, niezbędne jest opracowanie preparatów o kontrolowanym uwalnianiu tego metalu.

Celem pracy było zbadanie nowych autorskich preparatów zawierających srebro opartych na formule szklanych kulek z naniesioną warstwą tego metalu w leczeniu NChZJ oraz porównanie ich potencjału terapeutycznego ze związkami koloidalnymi srebra. Skuteczność preparatów oceniano w badaniach *in vivo* przeprowadzonych w dwóch mysich modelach NChZJ. Model ChLC wywołano przez doodbytnicze podanie TNBS, natomiast model WZJG przez podanie *per os* w wodzie pitnej soli DSS. Zmiany chorobowe oceniano makroskopowo, histopatologicznie i biochemicznie w tkankach pobranych od zwierząt kontrolnych i leczonych badanymi preparatami. Oceniono również zmiany mikrobiomu jelitowego wywołane procesem zapalnym i leczeniem badanymi preparatami. Optymalizację grubości powłoki srebra i średnicy kulek przeprowadzono na podstawie szybkości uwalniania tego metalu z nośnika ustalając dynamikę tego procesu pośrednio jako wielkość erozji powłoki srebra. Przy wykorzystaniu pięciu różnych metod przygotowano czopki doodbytnicze z kulkami szklanymi powlekanymi srebrem, a strukturę czopków określono skanowaniem rentgenowskim. Stwierdzono, że związki srebra badane w mysich modelach NChZJ mają właściwości przeciwzapalne, modulują skład flory jelitowej i nie uszkadzają błony śluzowej

zołądka. Układ doświadczenia obejmujący odpowiednie grupy zwierząt został opracowany prawidłowo a liczebności zwierząt zostały ograniczone do wartości minimalnej zapewniającej uzyskanie rzetelnych wyników, zgodnie z zasadą 3R.

Przedstawiona do oceny praca zawiera 96 stron i składa się z rozdziałów takich jak: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstępu mającego charakter przeglądu piśmiennictwa, założenia i celów badań, materiałów i metod, załączonych publikacji stanowiących podstawę niniejszej pracy oraz opracowanych na ich podstawie streszczonej formy wyników. Kolejnym rozdziałem są starannie i logicznie opracowane wnioski opracowane oddzielnie dla każdej z załączonych prac (łącznie z pracą przeglądową). Pracę kończą rozdziały dotyczące przedstawienia źródeł finansowania badań, literatury (73 starannie dobrane pozycje piśmiennictwa), oświadczenia współautorów wyrażających zgodę na włączenie poszczególnych publikacji do rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Siczka oraz kopie zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach na przeprowadzenie poszczególnych procedur badawczych. Logiczny układ pracy, poprawny styl, prawidłowe cytowanie literatury, a także przedstawienie i omówienie wyników wskazuje na dobrze opanowaną przez Doktoranta umiejętność pracy naukowej.

Brakuje mi natomiast rozdziału o charakterze dyskusji łączącej wyniki opublikowane w formie czterech prac oryginalnych, tym bardziej że wnioski sformułowane są oddzielnie dla każdej z prac. Uważam, że w przypadku prac opartych na cyklu publikacji właśnie taki rozdział jest potrzebny dla pełnej interpretacji otrzymanych wyników i stanowiłby jej duże wzbogacenie.

We wstępie liczącym 10 stron Doktorant wprowadził czytelnika w tematykę pracy, prezentując problematykę nieswoistych chorób zapalnych jelit, ich definicję, epidemiologię, patogenezę z uwzględnieniem czynników genetycznych i środowiskowych oraz immunologicznych i mikrobiologicznych (choć moim zdaniem zarówno czynniki immunologiczne i mikrobiologiczne powinny być zaliczone i omówione w kontekście czynników genetycznych i środowiskowych). W kolejnych rozdziałach opisano charakterystyczne cechy i objawy kliniczne dla choroby Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego różnicując te dwie postaci NChZJ i przedstawiając wspólne i zróżnicowane metody terapeutyczne. W dalszej części przeglądu literaturowego Doktorant skupił się na biologicznych właściwościach srebra i ich wykorzystaniu w badaniach podstawowych i klinicznych omawiając szerzej ich zastosowanie w różnych stanach zapalnych oraz podejmując problematykę działań niepożądanych. Wstęp zamykają rozdziały opisujące stare i nowe generacje preparatów srebra oraz perspektywa ich wykorzystania w NZJ, które na obecnym etapie są na etapie badań podstawowych

Materiały i metody stosowane w pracy przedstawiono wnikliwie na siedmiu stronach z uwzględnieniem szczegółów procedur badawczych. Metodologia została przedstawiona w sposób jasny i przekonujący. Na początku przedstawiono modele badawcze zastosowane dla choroby

Leśniowskiego-Crohna (doodbytnicze podanie TNBS) i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (doustne podanie DSS), po czym opisano metody oceny makroskopowej zmian wywołanych stanem zapalnym. Następnie przedstawiono metody oceny histologicznej zmienionych chorobowo tkanek ściany jelita wykonywanych w kierunku identyfikacji zmian o charakterze owrzodzeń i nacieku neutrofilii (pożądane byłoby włączenie do oceny innych typów granulocytów oraz monocytów). Jak opisano w dalszej części rozdziału nacieki i aktywność leukocytów weryfikowano w badaniach biochemicznych na podstawie aktywności enzymu mieloperoksydazy. Kolejny podrozdział metodyki dotyczy opisu zmian mikrobiomu jelitowego w odpowiedzi na wywołany stan zapalny i zastosowane leczenie preparatami srebra.

Następnie Doktorant szczegółowo opisuje sposób nanoszenia oraz ocenę uwalniania srebra ze szklanych kulek srebra, po czym przedstawia metodykę formułacji gotowego preparatu w postaci czopków zawierających wspomniane nośniki tego metalu. Końcowy opis dotyczy oceny przygotowanych czopków zawierających kulki szklane powlekane srebrem przy użyciu skanowania rentgenowskiego.

Zastosowane procedury badawcze wymagały dużego doświadczenia w ich przeprowadzeniu i sporego nakładu pracy ze względu na ich czasochłonność i stopień skomplikowania. Można jedynie zasugerować, że pełny obraz efektu terapeutycznego wzbogaciłoby przeprowadzenie badań morfologicznych i biochemicznych krwi obejmujących najczęstsze odchylenia laboratoryjne w NChZJ tj: niedokrwistość, leukocytoza, podwyższona liczba płytek, przyspieszone OB, wzrost stężenia CRP, hypoalbuminemia oraz wzrost stężenia gamma-globulin.

Kolejną, zasadniczą część pracy stanowią załączone publikacje będące przedmiotem przedstawionej rozprawy doktorskiej w skład których wchodzi jedna praca przeglądowa oraz cztery prace oryginalne powstałe na bazie przeprowadzonych doświadczeń.

Pracę opublikowano w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, o satysfakcjonującym współczynniku oddziaływania o łącznym współczynniku oddziaływania 11.69 i łącznej punktacji MNiSzW wynoszącym 120:

1. Metrology and Measurement Systems: IF 1.598, MNiSzW: 15
2. CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY: IF: 3.249, Q2, MNiSzW: 35
3. Pharmacological Report: IF: 2.587, Q2, MNiSzW: 25
4. Pharmaceutical Development and Technology: IF: 1.860, Q3, MNiSzW: 20
5. CHEMICAL BIOLOGY & DRUG DESIGN: IF: 2.396, Q3, MNiSzW: 25

Uzyskane w trakcie badań wyniki są bardzo interesujące. W pracy przeglądowej Doktorant wprowadza opisuje dotychczasową wiedzę na temat patogenezy oraz dostępnych i eksperymentalnych terapii NChZJ. Istotną część pracy Doktorant poświęca możliwości

wykorzystania właściwości przeciwzapalnych, przeciwbakteryjnych i przeciwwirusowych preparatów srebra i innych metali w terapii NChZJ dokonując przeglądu najnowszej literatury opartej na badaniach podstawowych i przedklinicznych.

Kolejne cztery prace oryginalne powstałe na bazie własnych wyników przedstawione są przejrzysto zgodnie z chronologią przeprowadzonych doświadczeń. Przedstawiają one w sposób przejrzysty założenia pracy, zastosowaną metodykę oraz otrzymane wyniki i ich interpretację w formie dyskusji dla każdej z prac. Pierwsza publikacja dotyczy podstaw teoretycznych wykorzystania nowej formułacji preparatu srebra naniesionego na szklane kulki. Doktorant przedstawia również walidację tej metody w odniesieniu do wielkości depozytu srebra na nośniku i określenia absorpcji srebra określając optymalną grubość powłoki na 50nm. Podane są również szacunkowe ilości srebra uwalnianego w jelicie. W tym miejscu chciałbym zasugerować żeby przy braku oznaczenia poziomu srebra we krwi, tkankach i wydalonej treści jelitowej podawać ilości srebra uwolnionego a nie wchłoniętego.

W drugiej pracy Doktorant bazując na opracowanej optymalizacji przygotowanego preparatu srebra opisuje wyniki przedstawiające jego skuteczność terapeutyczną w dwóch modelach NChZj – modelu z zastosowaniem TNBS imitującego ChLC oraz modelu z wykorzystaniem DSS imitującego WZJG dokumentując właściwości przeciwzapalne zastosowanej formułacji preparatu srebra w obu modelach NChZj. Otrzymane wyniki świadczą jednocześnie, że obserwowany efekt terapeutyczny odbywa się poprzez modulację flory jelitowej przez badany preparat srebra. Bardzo ciekawym spostrzeżeniem jest modyfikacja flory bakteryjnej przez zastosowany preparat srebra, co ma szczególne znaczenie w aspekcie roli mikrobiomu w patogenezie chorób zapalnych. Jednocześnie Doktorant wnioskuje, że głównym kryterium skuteczności zastosowanej formułacji srebra jest grubość powłoki przy mniejszym znaczeniu objętości szklanych kulek, jako nośnika. Interesującym jest, że w przypadku modelu NChZJ wywołanego podaniem DSS to właśnie nośnik odpowiada za główny efekt terapeutyczny badanego preparatu poprzez eliminację złogów kału w niszach wrzodowych. W powyższej pracy brakuje mi jednak wyjaśnienia lub podjęcia dyskusji czy oddziaływanie p/zapalne srebra odbywa się pośrednio poprzez modyfikację mikrobiomu, np. poprzez produkcję urolityny lub/i wiązania związków siarki (co zostało stwierdzone), czy też jest to bezpośredni efekt immunomodulujący a może dwa mechanizmy jednocześnie. W odniesieniu do powyższej pracy powstaje kilka pytań, głównie o charakterze technicznym:

- dlaczego w modelu DSS nie zastosowano wszystkich metod oceny zmian jak w modelu TNBS, np. zmian histologicznych, aktywności MPO czy mikroflory

- brakuje mi również kontroli pozytywnej w postaci innych związków srebra już stosowanych w terapii chorób zapalnych p. pok. np. sulfadiazyny srebra

- w analizie statystycznej zmian mikrobiomu nie podano dokładnie jaki zastosowano czynnik główny. Ponadto dla odzwierciedlenia zmian w mikroflorze (zmian w proporcji występowania różnych szczepów bakterii po zastosowanym leczeniu) należałoby zastosować 2-czynnikową ANOVA uwzględniającą jako czynniki główne grupę zwierząt i szczep bakterii a jako czynnik niezależny liczbę bakterii w gramie stolca. Umożliwiłoby to statystyczne udokumentowanie zmian jakościowych flory pod wpływem zastosowanej terapii

- nie do końca przekonującym jest określenie NChZJ wywołane przez TNBS jako model ChLC. Podobnie nie w pełni nerelevantne jest określenie stanu zapalnego wywołanego doustnym podaniem DSS jako modelu WZJG. Wynika to zarówno z trudności różnicowania obu tych procesów zapalnych jak i braku oceny zmian w innych odcinków przewodu pokarmowego w tym j. cienkiego, żołądka i przetyku. Ponieważ DSS podawano w wodzie pitnej można się spodziewać obecności takich zmian przybliżających ich charakter do ChLC. Podobnie w modelu podania doodbytniczego TNBS przy braku oceny innych odcinków przewodu pokarmowego trudno o jednoznaczne przypisanie specyfiki wywołanego IBD do ChLC. Moje wątpliwości poparte są szeregiem publikacji, w których charakter procesu zapalnego wywołany doodbytnicznym podaniem TNBS opisywany jest w kategorii modelu WZJG.

Kolejna, trzecia praca oryginalna dotyczyła opracowania formułacji czopków doodbytnicznych zawierających kulki szklane powlekanie srebrem. Wykorzystując pięć różnych metod preparatywnych stwierdzono, że najbardziej jednorodne rozprowadzenie kulek w całej objętości czopka uzyskuje się poprzez umieszczenie kulek w stopionej masie wylanej do formy czopka potwierdzając jednocześnie zasadność wykorzystania tak przygotowanej formy preparatu srebra w hamowaniu procesów zapalnych dolnego odcinka przewodu pokarmowego.

Ostatnia z cyklu prac dotyczy oceny potencjału terapeutycznego nowych preparatów srebra koloidalnego w postaci wodnych zawiesin nanocząsteczkowych NanoAg1 i NanoAg2 w mysich modelach naśladujących ChLC i WZJG. Wykazano, że działanie przeciwzapalne badanych zawiesin zależy od kształtu i średnicy nanocząstek srebra, a jego działanie lecznicze, analogicznie jak w przypadku formy srebra osadzonej na kulkach szklanych oparte jest w znaczący sposób poprzez modyfikację florę jelitowej badanych zwierząt. Ponieważ w badaniach do redukcji jonów srebra użyto kwasu taninowego o znanych właściwościach p/zapalnych i p/nowotworowych (charakterystycznych dla związków o charakterze polifenoli) jego pozostałości w otrzymanych preparatach srebra utrudniałaby właściwą ocenę ich efektu terapeutycznego. Czy zatem przeprowadzono analizę w kierunku oceny jakościowej i ilościowej pozostałości kwasu taninowego, jako reduktora jonów srebra?

W kolejnym rozdziale Doktorant zwięźle podsumowuje i interpretuje uzyskane wyniki w przedstawionych publikacjach. Praca doktorska zakończona jest łącznie 16 wnioskami

sformułowanymi oddzielnie dla każdej publikacji, w których doktorant bardzo trafnie podsumował wyniki swojej pracy naukowej. Jeszcze raz chciałbym zasugerować, że przy takiej formie prezentacji wyników i wniosków pożądanym byłaby krótka dyskusja spajająca wszystkie publikacje i umożliwiająca pełną interpretację przeprowadzonych badań.

Mimo bardzo dobrej treści jak i formy tej pracy, nie uniknięto też pewnych, choć drobnych błędów w większości o charakterze redakcyjnym np.:

- w pracy zastosowano nieprawidłową pisownię genów, które w przypadku człowieka powinny być pisane dużymi literami kursywą.
- ponieważ geny stanowią część strukturalną chromosomów ich lokalizację należy określać nie na chromosomie (jak to definiuje Doktorant we Wstępie) lecz w chromosomie
- Doktorant nieprecyzyjnie określa skrót NNKT – w niektórych przypadkach używając terminu tłuszcze nienasycone, np rozdz. 1.1.3.2. a dotyczy to oczywiście nienasyconych kwasów tłuszczowych
- nieprecyzyjne jest stwierdzenie we wstępie mówiące, że etiologia NChZJ ma podłoże autoimmunologiczne oraz genetyczne i środowiskowe. Samo podłoże autoimmunologiczne może wynikać z predyspozycji genetycznych będących w interakcji z czynnikami środowiskowymi
- W rozdz. 1.1.6 dotyczącym metod leczenia ChLC nieprawidłowo sformułowano zdanie, cytując: „W obrębie farmaceutyków, najczęściej stosowane są następujące leki: kwas 5-aminosalicylowy (5-ASA, znany również jako mesalamina) i jego pochodne, jak sulfasalazyna (np. Azulfadine), azatiopryna (np. Imuran) 6-MP (np. Purinethol), cyklosporyna, metotreksat, kortykosteroidy (np. Prednisone)”, w którym można błędnie wnioskować iż azatiopryna i inne leki należą do pochodnych 5-ASA.
- w założeniach i celach pracy (str. 16) doktorant zalicza badania histologiczne i biochemiczne na pobranym od zwierząt materiale biologicznym jako badania *in vitro*. Nie jest to precyzyjne, bowiem tego typu badania są ostatnim etapem badań *in vivo*. Badania *in vitro* dotyczą jedynie systemów biologicznych utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych – np. hodowli komórkowych czy sztucznych błon
- doktorant powinien unikać terminów potocznych np. „myszy o wadze ciała” (Metody, pkt. 3.2.1.1, str. 18)
- w dalszych badaniach koniecznym jest określenie niepożądanych efektów toksycznych preparatów srebra, głównie systemowych np. neurotoksycznych. Przeprowadzane badania były krótkoterminowe, tymczasem efekt toksyczny związków srebra wynika z długotrwałej kumulacji tego metalu. Choroby zapalne jelit mają najczęściej przebieg długotrwały wymagający chronicznego podawania leków.
- z racji mojego zainteresowania i profilu badań chciałbym zapytać o możliwe zbadanie wpływu

badanych preparatów srebra na rozszczelnienie bariery krew-jelito, której udział w patogenezie chorób zapalnych jelit jest niezmiernie ważny. Zbadanie powyższych zależności pozwala nie tylko na określenie zmian w przepuszczalności BBB w odniesieniu do patogeny IBD, lecz również wpływu na wchłanianie srebra i w konsekwencji jego stężenie w jelicie, jako wyznacznik efektywności terapeutycznej. Podkreślam jednak, że powyższa uwaga wynika raczej z mojego zainteresowania powyższą problematyką a nie z uwagi wobec pracy.

Podsumowując, niniejsza praca wnosi nowe informacje i zwraca uwagę jak wielką rolę w terapii NChZJ mogą pełnić preparaty srebra w opracowanej formulacji szklanych kulek. Ponadto praca przedstawia możliwe hipotezy i dowody na rolę mikrobiomu jelitowego w procesach zapalnych przewodu pokarmowego.

Przeprowadzone badania wymagały ogromnej wiedzy i nakładu pracy Doktorantka. Omówione wyżej drobne nieliczne niedociągnięcia nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji pracy. Warty podkreślenia jest fakt, iż praca oparta jest na szeregu pięciu publikacji, co umożliwia wykorzystanie zdobytej wiedzy przez inne zespoły badawcze. Zaprezentowane badania wnoszą nowe informacje na temat potencjału terapeutycznego srebra jak również patogeny NChZJ i mogą mieć implikacje kliniczne, co upoważnia mnie do wnioskowania o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

**Uważam, że przedstawiona do recenzji praca pt. „Nowe formy terapii nieswoistych chorób zapalnych jelita grubego w oparciu o preparaty na bazie srebra” spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawie doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych, dlatego mam zaszczyt wnieść do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Krzysztofa Siczka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Dr hab. Mariusz Sacharczuk, prof. IGiHZ PAN