

Kraków, dnia 25 listopada 2021



UNIwersYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

### Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

„Identyfikacja i walidacja nowych potencjalnych leków przeciwzapalnych w kontekście ostrego zapalenia trzustki” wykonanej przez mgr inż. Aleksandrę Tarasiuk pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Jakuba Fichny w Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Ostre zapalenie trzustki (OZT) jest chorobą o ciężkim przebiegu klinicznym, stanowiącą wyzwanie zarówno pod względem diagnostycznym jak i terapeutycznym. Występuje z częstotliwością średnio ok. 30 przypadków na 100 tysięcy osób w populacji, chociaż na świecie obserwuje się znaczące różnice w częstości występowania OZT (np. Holandia około 14, a Norwegia, Szwecja czy USA ponad 50 przypadków na 100 000 osób). W Polsce dane epidemiologiczne są niestety niepełne, ale (na podstawie bazy NFZ) stwierdza się średnio około 30000 zachorowań rocznie na OZT, przy czym w ostatnich latach notujemy wzrost częstości zachorowań. Stanowi to poważny problem kliniczny, ponieważ, chociaż dość dobrze znane są główne czynniki ryzyka wystąpienia OZT i podstawowe mechanizmy patofizjologiczne, nie potrafimy przewidzieć dynamiki rozwoju choroby i przyczyn pogarszania się stanu chorego, prowadzących do uogólnionej reakcji zapalnej i zespołu niewydolności wielonarządowej ze wszelkimi tego konsekwencjami. I pomimo rosnącej wiedzy o tej chorobie, i coraz szerszych możliwości terapii towarzyszących jej zaburzeń oraz łagodzenia objawów, u części chorych są one nieskuteczne, a przynajmniej niewystarczające.

Tym cenniejsze są więc badania prowadzone na modelach eksperymentalnych i próby poszukiwania nowych leków modulujących przebieg OZT, możliwych w przyszłości do zastosowania w praktyce klinicznej. Praca doktorska mgr inż. Aleksandry Tarasiuk pt. „Identyfikacja i walidacja nowych potencjalnych leków przeciwzapalnych w kontekście ostrego zapalenia trzustki” wychodzi na przeciw tym oczekiwaniom. Należy tutaj podkreślić, że praca została przygotowana w Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Jakuba Fichny, wybitnego znawcy zagadnień neurogastroenterologii doświadczalnej i farmakologii przewodu pokarmowego, o uznanej renomie w tej dziedzinie.

Przedstawiona do recenzji praca mgr inż. Aleksandry Tarasiuk stanowi przykład dysertacji o układzie przyjętym powszechnie dla dysertacji doktorskich opartych na publikacjach –składają się na nią 4 publikacje w renomowanych, recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o łącznym współczynniku oddziaływania  $IF=12,37$ ; należy zaznaczyć, że we wszystkich publikacjach mgr inż. Aleksandra Tarasiuk jest pierwszą Autorką.

1. Tarasiuk A, Fichna J. *Effectiveness and therapeutic value of phytochemicals in acute pancreatitis: A review. Pancreatology. 2019 Jun;19(4):481-487. doi:10.1016/j.pan.2019.04.010. Epub 2019 May 3. PMID: 31079933. IF=3.629*
2. Tarasiuk A, Pawlik L, Fichna J. *Berberyna jako potencjalny terapeutyk w leczeniu ostrego zapalenia trzustki. Postepy Biochem. 2019 Oct 1;65(3):224-230. Polish. doi:10.18388/pb.2019\_278.*
3. Tarasiuk A, Bulak K, Talar M, Fichna J. *Chlorogenic acid reduces inflammation in murine model of acute pancreatitis. Pharmacol Rep. 2021 Oct;73(5):1448-1456. doi:10.1007/s43440-021-00320-5. PMID: 34383255. IF=3.024*
4. Tarasiuk A, Talar M, Bulak K, Fichna J. *Ghee Butter from Bovine Colostrum Reduces Inflammation in the Mouse Model of Acute Pancreatitis with Potential Involvement of Free Fatty Acid Receptors. Nutrients. 2021 Sep 19;13(9):3271. doi:10.3390/nu13093271. PMID: 34579147. IF=5.717*

Wydział Lekarski

Katedra Patofizjologii

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel.: +48 (12) 633 39 47

fax: +48 (12) 632 90 56

patofizjo@cm-uj.krakow.pl

www.patofizjologia.cm-uj.krakow.

Pracę otwierają streszczenia w języku polskim oraz w języku angielskim, następnie umieszczono wykaz skrótów. Na kolejne części rozprawy składają się wprowadzenie, założenia i cele badawcze, materiał i metody, publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, wyniki i dyskusja, informacja o finansowaniu badań oraz bibliografia. Na końcu umieszczono zgody lokalnej komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Łodzi. Następnie zamieszczono oświadczenia współautorów publikacji wykorzystanych do przygotowania pracy doktorskiej. Praca w całości liczy 76 stron.

Rozpoczynają pracę streszczenia w języku polskim oraz w języku angielskim przedstawiające zwięźle, rzetelnie i rzeczowo treści zawarte w dysertacji doktorskiej, a następujący po nich wykaz skrótów ułatwia późniejszą lekturę dysertacji.

We wstępie pracy Autorka krótko, ale wyczerpująco wprowadza czytelnika w temat w przystępny sposób. Natomiast poszerzone wprowadzenie w tematykę doktoratu znajdujemy w pracy poglądowej, stanowiącej 1 pozycję cyklu publikacji składających się na doktorat.

W pracy tej pt. „Effectiveness and therapeutic value of phytochemicals in acute pancreatitis: A review” Autorka przedstawiła najnowsze doniesienia naukowe dotyczące zastosowania fitozwiązków jako potencjalnych leków przeciwzapalnych w OZT, w szczególności takich, jak: berberyna, kwas chlorogenowy, kurkumina, kwas elagowy, cynamtanina B-1, resweratrol, piperyna i likopen. Przedyskutowała w tej publikacji także ich skuteczność terapeutyczną i ograniczenia w leczeniu OZT, przedstawiając dane zarówno z badań doświadczalnych *in vitro* i *in vivo* oraz z przeprowadzonych badań klinicznych. Praca ta wskazuje na rzetelną znajomość tematu badawczego, logiczną drogę naukową doktorantki, z której wynikały dalsze badania, a także dobry warsztat publikacyjny.

Następnie Autorka przedstawia rzeczowo cel rozprawy doktorskiej, którym było scharakteryzowanie działania wybranych związków pochodzenia roślinnego, tj. berberyny (BRB) i kwasu chlorogenowego (CGA) oraz GBBC w modelu eksperymentalnym ostrego zapalenia trzustki. Cele szczegółowe obejmowały:

- I. Walidację mysiego modelu OZT indukowanego dootrzewnowym podaniem 8%-owego roztworu monochlorowodoru L-argininy.
- II. Scharakteryzowanie skuteczności wybranych związków i preparatów potencjalnie wspomagających działanie trzustki *in vivo* w zwalidowanym modelu OZT.

W podrozdziale poświęconym materiałowi i metodom zaprezentowano sposób gromadzenia danych oraz ich dalszej analizy, co jest w zasadzie streszczeniem metodyki opisanej w publikacjach.

W badaniach wykorzystano model zwierzęcy (mysi) OZT indukowanego podaniem dootrzewnowym L-argininy. Warto podkreślić, że w procedurach eksperymentalnych zostały zastosowane zasady 3R mające na celu zmniejszenie cierpienia zwierząt oraz ograniczenia całkowitej liczby zwierząt użytych w badaniach. To pozwala prowadzić badania eksperymentalne w niezbędnym, ale koniecznym zakresie, co ma znaczenie nie tylko dla zachowania dobrostanu zwierząt, ale przede wszystkim znacząco podnosi jakość uzyskiwanych wyników eksperymentalnych.

W części laboratoryjnej pracy wykorzystano techniki biomolekularne, w tym Western blot, testy immunoenzymatyczne (ELISA) oraz techniki analizy histopatologicznej tkanek uzyskanych podczas eksperymentu. Do analizy danych wykorzystano metody statystyki opisowej, podstawowe testy statystyczne oraz analizy metodą ANOVA, wspomagane specjalistycznym oprogramowaniem.

W kolejnej części dysertacji przedstawiono najważniejsze wyniki badań - w postaci opisowej, dołączono odbitki opublikowanych prac naukowych składających się na dysertację i opatrzone to krótką dyskusją.

W pierwszej pracy oryginalnej pt. „Berberyna jako potencjalny terapeutyk w leczeniu ostrego zapalenia trzustki” mgr inż. Aleksandra Tarasiuk przedstawiła wyniki badań w mysim modelu OZT indukowanego monochlorowodoru L-argininy, w których BRB podawana była dożylnie w dawce 0.1 oraz 0.5 mg/kg m.c, co łagodziło stan zapalny w trzustce. Otrzymane wyniki sugerujące, że BRB może stać się terapeutycznym wspomagającym leczenie OZT zostały skonfrontowane z obszernymi danymi literaturowymi dotyczące działania profilaktycznego i właściwości przeciwzapalnych BRB.

W kolejnym artykule oryginalnym pt. „Chlorogenic acid reduces inflammation in murine model of acute pancreatitis” przedstawiono wyniki badań po podaniu doustnym CGA, polifenolu znanego z działania przeciwzapalnego, w leczeniu doświadczalnego OZT indukowanego monochlorowodorkiem L-argininy. Zaobserwowano zmniejszenie aktywności MPO po podaniu CGA u myszy z OZT w stosunku do myszy, którym nie podawano CGA. Ocena morfologiczna wykazała, że podanie CGA u myszy z OZT, spowodowało zmniejszenie nacieków zapalnych w okolicy okołonaczyniowej oraz minimalny zanik komórek pęcherzykowych, a także obniżyło aktywność amylazy w trzustce, wskazując na potencjalne korzystne efekty przeciwzapalne CGA u myszy w przebiegu OZT.

W kolejnej pracy pt. „Ghee Butter from Bovine Colostrum Reduces Inflammation in the Mouse Model of Acute Pancreatitis with Potential Involvement of Free Fatty Acid Receptors” doktorantka wykazała przeciwzapalne działanie GBBC w mysim modelu OZT. Świadczą o tym uzyskane w badaniach: zmniejszenie aktywności MPO (w trzustce i płucach) oraz markerów biochemicznych OZT – lipazy, amylazy (w surowicy krwi), a także obserwacje histopatologiczne - suplementacja GBBC po indukcji OZT zmniejszyła nacieki komórek zapalnych w okolicy okołobrodawkowej i spowodowała minimalny zanik komórek pęcherzykowych oraz obniżoną aktywność lipazy w trzustce w grupie zwierząt z OZT po leczeniu GBBC, co wskazuje na możliwy udział receptorów wolnych kwasów tłuszczowych (FFAR). Zostało to potwierdzone poprzez podanie antagonistów FFAR1 i FFAR4. Podanie antagonisty FFAR1, a następnie GBBC (doustnie, w dawce 100  $\mu$ L/mysz), istotnie zmniejszyło przeciwzapalny efekt GBBC (zwiększona aktywność MPO); ponadto podobne hamowanie działania przeciwzapalnego GBBC wystąpiło po podaniu antagonisty FFAR4. Jest to jedno z pierwszych doniesień sugerujących korzystne działanie GBBC w leczeniu OZT i ponadto wskazujące, że efekt ten może być mediowany poprzez receptory grupy FFAR.

Następnie w krótkiej dyskusji doktorantka w oparciu o dane z piśmiennictwa poddała analizie uzyskane wyniki własne i porównała z badaniami innych autorów. Wykazała znajomość dyskutowanych zagadnień oraz literatury tematu. Warto zaznaczyć, że zarówno ośrodek, w którym doktorantka realizował pracę badawczą, jak i opiekun są uznanymi w kraju i zagranicą ekspertami w tej dziedzinie.

Dyskusję wieńczą wnioski, które wynikają bezpośrednio z założonego celu pracy i są należycie uzasadnione przedstawionymi wynikami badań.

Wynika z nich, że w badaniach z wykorzystaniem mysiego modelu OZT:

1. BRB w odpowiednich dawkach 0.1 oraz 0.5 mg/kg m.c. podawana dożylnie zmniejsza stan zapalny w trzustce w mysim modelu OZT;
2. CGA w dawce 20 mg/kg m.c. podawany po zmniejsza stan zapalny w trzustce w mysim modelu OZT;
3. GBBC w dawce 100  $\mu$ L/zwierzę podawane po zmniejsza stan zapalny w mysim modelu OZT, z udziałem FFAR.

Doktorantka wykazała, że zastosowany w badaniach model OZT indukowany roztworem monochlorowodorku L-argininy u myszy w znacznym stopniu odwzorowuje zmiany w obrazie histopatologicznym i biochemicznym zachodzące u człowieka. Jednocześnie jednak doktorantka słusznie konkluduje, że nie istnieje idealny zwierzęcy model OZT, który w pełni odpowiadałby warunkom klinicznym, dlatego stosowany model powinien być każdorazowo dobierany do konkretnego problemu badawczego.

Niestety, różne modele eksperymentalnego OZT, a także między innymi różnice gatunkowe w stosowanych modelach eksperymentalnych (np. mysz vs. szczur) powodują, że tak trudno jest jednoznacznie interpretować i konfrontować patomechanizmy i potencjalne środki terapeutyczne w przebiegu OZT obserwowane w warunkach eksperymentalnych, czasem nawet wysoce skuteczne, z przebiegiem ostrego zapalenia trzustki u ludzi.

Załączone piśmiennictwo obejmuje 83 wybrane pozycje - zarówno pozycje uznane za klasyczne w tej dziedzinie, jak również wyniki najnowszych badań sięgające aż do roku 2021, które zostały starannie i prawidłowo zacytowane w rozprawie.


W części końcowej dysertacji Autorka przedstawiła zgody właściwej komisji etycznej na przeprowadzenie badań oraz oświadczenia Współautorów publikacji składających się na pracę doktorską, które wskazują na znaczny, a nawet dominujący wkład Autorki w zaplanowanie badań, ich realizację oraz przygotowanie publikacji.

## Podsumowanie

Przedstawiona mi do oceny praca jest oryginalnym, nowatorskim doniesieniem naukowym. Dotyczy ciekawego zagadnienia z pogranicza kliniki i farmakoterapii ostrego zapalenia trzustki, które Autorka próbuje zgłębić metodami specyficznymi dla nauk podstawowych. Należy stwierdzić, że cel rozprawy doktorskiej założony przez badaczkę został zrealizowany, a przedstawiona rozprawa może mieć praktyczne implikacje dla przyszłych terapii ostrego zapalenia trzustki i przyczynia się do rozwoju wiedzy w tym zakresie. Zwłaszcza, że jak zauważa Autorka, badane w toku realizacji niniejszej pracy doktorskiej substancje są już obecnie stosowane jako suplementy diety lub środki lecznicze w terapii innych schorzeń, co skraca ich drogę do wspomagania leczenia OZT w przyszłych potencjalnych badaniach klinicznych. Na podkreślenie zasługują także umiejętności zastosowania zaawansowanych procedur eksperymentalnych przeprowadzonych w modelu zwierzęcym w toku realizacji niniejszej pracy, a wyniki dotyczące roli GBBC w modulowaniu przebiegu OZT mają charakter pionierski.

Podsumowując, stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa mgr inż. Aleksandry Tarasiuk pt. „Identyfikacja i walidacja nowych potencjalnych leków przeciwzapalnych w kontekście ostrego zapalenia trzustki” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Jakuba Fichny w Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi spełnia warunki określone w art. 13 ust. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki i dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Tarasiuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoki poziom naukowy pracy doktorskiej udokumentowany publikacjami w renomowanych czasopiśmie naukowych oraz różnorodność zastosowanych technik badawczych zgłaszam również wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Tarasiuk.

Katedra Patofizjologii UJCM  
  
dr hab. n. med. Krzysztof Gil, prof. UJ  
p.o. Kierownik