

Warszawa, dn. 16.12.2021

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Tarasiuk, zatytułowanej  
***„Identyfikacja i walidacja nowych potencjalnych leków  
przeciwzapalnych w kontekście ostrego zapalenia trzustki”***.

Promotor: prof. dr hab. n. med. Jakub Fichna

Ostre zapalenie trzustki (OZT) jest chorobą zapalną o szerokim spektrum klinicznym od postaci samoograniczających się do ciężkich przebiegów z niewydolnością wielonarządową i niepomyślnym rokowaniem. Mimo, iż w ciągu ostatnich dekad dokonał się istotny postęp jeśli chodzi o intensywne leczenie wspomagające, to jednak brak wyjaśnionej patogenezy jest istotnym ograniczeniem w opracowaniu skutecznych metod leczenia przeciwzapalnego. Idealnym rozwiązaniem byłaby możliwość prowadzenia badań nad etiopatogenezą OZT na ludzkiej trzustce, jednak z uwagi na istotnie ograniczony dostęp do materiału tkankowego podstawą badań pozostają prace na eksperymentalnych modelach zwierzęcych. W ostatnich latach najczęściej wykorzystuje się szczury oraz myszy z uwagi na stosunkowo łatwy dostęp, niskie koszty oraz możliwość indukcji OZT o różnym nasileniu. To właśnie w badaniach na modelach zwierzęcych upatruje się wyjaśnienia etiopatogenezy oraz wprowadzenia nowych skutecznych metod terapeutycznych.

Podjęty zatem przez Doktorantkę temat pracy jest niezwykle aktualny i wychodzi naprzeciw zapotrzebowaniu lekarzy gastroenterologów na pojawienie się nowych leków, poprawiających rokowanie w OZT.

Rozprawa doktorska pani mgr inż. Aleksandry Tarasiuk została przedstawiona w postaci cyklu opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, co spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami).

Rozprawa jest podzielona na kilka części odpowiadających typowej formie opracowania pracy doktorskiej. Uważam, że tytuł pracy zawiera nieco niefortunne sformułowanie „w kontekście”, zamiast „w leczeniu”. Zwarty merytorycznie wstęp

oraz jasno i przejrzysto przedstawione założenia i cele pracy, poprzedzone są spisem treści, wykazem użytych w tekście skrótów oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim. Zasadniczą częścią rozprawy doktorskiej jest spójny tematycznie cykl czterech publikacji, jednej o charakterze pogładowym oraz trzech prac oryginalnych, które zostały opublikowane w czasopiśmie o łącznej punktacji IF=12,37 oraz MNiSW=300. Sam fakt publikacji wyników w renomowanych czasopiśmie anglojęzycznych dowodzi wysokiej jakości prowadzonych badań oraz rzetelnej prezentacji wyników. Kolejną rozprawa zawiera podsumowanie, wnioski, piśmiennictwo oraz załączniki: zgodę Komisji Bioetycznej oraz oświadczenia współautorów o wkładzie Doktorantki w powstanie publikacji, które jednoznacznie wskazują na jej wiodącą rolę we wszystkich prezentowanych badaniach.

We wstępie pani mgr inż. Aleksandra Tarasiuk zwięźle i przejrzysto prezentuje problematykę ostrego zapalenia trzustki, główną uwagę poświęcając terapii zachowawczej, a w szczególności zastosowania związków pochodzenia roślinnego, będących przedmiotem licznych badań przedklinicznych. Doktorantka rzeczowo prezentuje aktualne zasady terapii OZT, podkreślając jednocześnie nowoczesne trendy naukowe mające na celu wprowadzenie metod leczenia alternatywnego. Szczególną rolę zajmuje tu ewentualna rola kwasów tłuszczowych będących jednym ze składników masła klarowanego z siary bydlęcej, które Doktorantka poddaje badaniu.

Cele pracy obejmowały:

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

Metodyka badań została przedstawiona jasno i wyczerpująco.

Doktorantka poddała badaniom berberynę (BRB), kwas chlorogenowy (CGA) oraz masło klarowane z krowiego colostrum (GBBC). Badania były prowadzone po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Łodzi i zgodnie z wszelkimi procedurami z zachowaniem szczególnej dbałości o minimalizację cierpienia zwierząt.

Do indukcji OZT u myszy, a tym samym do stworzenia modelu zwierzęcego, Doktorantka użyła roztworu L-argininy podanego dwukrotnie dootrzewnowo w dawce 4g/kg m.c. w odstępie godzinnym wg metody opisanej przez Dawra i wsp. (2007). L-arginina prowadzi do martwiczego zapalenia trzustki, przy niewielkiej liczbie innych powikłań. Jest to aktualnie najczęściej wybierany związek do wywoływania OZT u zwierząt, a zastosowane przez Doktorantkę dawki są optymalnym sposobem uzyskania modelu zwierzęcego przy minimalnym ryzyku śmiertelności zwierząt. Następnie po 72h od aplikacji L-argininy, zwierzęta były poddawane eutanazji, a materiał tkankowy trzustki oraz płuc był utrwalany w formalinie oraz mrożony ciekłym azotem celem oznaczenia aktywności enzymatycznych. Interesujące byłoby podsumowanie doświadczeń Doktorantki w kontekście obserwowanych ewentualnych pozatrzustkowych powikłań obserwowanych po podaniu L-argininy.

Pierwszą z cyklu publikacji jest praca poglądowa pt. *„Effectivness of therapeutic value of photochemicals in acute pancreatitis: A review”*, opublikowana w *Pancreatology*, 2019 (IF=3.629), która dowodzi doskonałej znajomości patofizjologii oraz potencjalnych mechanizmów terapeutycznych w OZT. Podstawą pracy jest przegląd piśmiennictwa dotyczący substancji pochodzenia roślinnego o potencjalnie korzystnym działaniu w OZT. Spośród kilku związków na pierwszym miejscu zostały przedstawione berberyna oraz kwas chlorogenowy. Badania nad tymi związkami stanowią integralną część pozostałych pozycji cyklu publikacji.

W kolejnej pracy zatytułowanej: *„Berberyna jako potencjalny terapeutyk w leczeniu ostrego zapalenia trzustki”*, *Postępy Biochemii MNiSW=20*, Doktorantka przedstawia wyniki swoich badań oceniających efekt dożylnego podania BRB w różnych dawkach 12h po indukcji OZT u myszy. Badania wykazały, iż dożylne podanie BRB zarówno w dawce 0.1mg/kg jak i 0.5mg/kg zmniejsza aktywność enzymatyczną mieloperoksydazy (MPO) w trzustce co świadczy o zmniejszeniu stanu zapalnego. W świetle dotychczasowych doniesień dotyczących działania protekcyjnego BRB podawanej przed indukcją OZT, opublikowane przez Doktorantkę wyniki mają charakter pionierski.

Dalsze wyniki badań z zastosowaniem kwasu chlorogenowego w OZT Doktorantka opublikowała w 2021 roku na łamach czasopisma *Pharmacological Reports*

(IF=3.024) pt. „*Chlorogenic acid reduces inflammation in murine model of acute pancreatitis*”. Badanie opierało się o trzy grupy badawcze: grupę kontrolną, grupę z OZT i grupę z OZT leczoną CGA doustnie i wykazało, iż podanie CGA może mieć korzystny efekt przeciwzapalny o czym świadczy istotne zmniejszenie aktywności MPO w trzustce. Dodać należy, iż praca jest wzbogacona oceną histopatologiczną materiału tkankowego, również z zastosowaniem metod immunohistochemicznych. Na podstawie przedstawionych wyników oraz wcześniejszych publikacji Doktorantka wskazuje CGA jako obiecujące leczenie wspomagające OZT proponując jednocześnie dawkowanie doustne u ludzi jako próba profilaktyki i leczenia OZT. Należy jednak podkreślić, iż ustalenie bezpieczeństwa oraz skuteczności proponowanego leczenia może mieć miejsce wyłącznie w ramach kontrolowanych badań klinicznych.

Ostatnią w cyklu pracą jest „*Ghee Butter from Bovine Colostrum Reduces Inflammation in the Mouse Model of Acute Pancreatitis with Potential Involvement of Free Fatty Acid Receptors*”. W mojej opinii jest to najważniejsza publikacja z cyklu. Masło klarowane z krowiego colostrum (GBBC), zawierające w swoim składzie między innymi dużą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych (szczególnie linolenowy i arachidonowy), ma uznane wartości odżywcze i może być stosowane jako suplement diety. Prezentuje również szereg innych korzystnych działań na czele z właściwościami immunomodulującymi, przeciwzapalnymi, a nawet przeciwnowotworowymi.

Na podstawie aktywności MPO oraz oceny histopatologicznej w trzustce i płucach Doktorantka wykazała, że suplementacja GBBC spowodowała istotne zmniejszenie nacieków zapalnych, ograniczenie zaniku komórek pęcherzykowych oraz zmniejszenie aktywności lipazy w trzustce. Założenie, iż w opisywanych procesach rolę mediatorów mogą odgrywać receptory wolnych kwasów tłuszczowych (FFAR) zostało potwierdzone poprzez podanie antagonistów FFAR, co istotnie ograniczyło korzystny przeciwzapalny efekt GBBC. Ten sposób udowodnienia hipotezy badawczej zasługuje na szczególne uznanie. W opracowaniu rozprawy zabrakło może jedynie wprowadzenia patofizjologicznego odnośnie roli FFAR, co jest jednak zawarte w treści publikacji.

Dyskusja jest napisana jasno i przejrzysto. Zawiera omówienie najważniejszych wyników z opublikowanych prac w świetle aktualnego piśmiennictwa.

Wnioski odpowiadają celom pracy i zawierają pozytywną ocenę walidacji modelu zwierzęcego OZT indukowanego dootrzewnowym podaniem L-argininy oraz podsumowanie korzystnego działania terapeutycznego badanych substancji:

1. BRB w dawce 0.1 oraz 0.5 mg/kg m.c. podawana iv 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.

Bibliografia rozprawy zawiera 83 pozycje piśmiennictwa spójnego tematycznie i prawidłowo cytowanego.

W podsumowaniu stwierdzam, iż cykl publikacji pani mgr inż. Aleksandry Tarasiuk został prawidłowo zaplanowany i właściwie przedstawiony pod względem metodycznym, a jakość prezentowanych publikacji świadczy o dużym doświadczeniu badawczym Doktorantki. Prezentowane wnioski są spójne z hipotezą badawczą i odpowiadają celom dysertacji, a wyniki przedstawione są bardzo starannie i zwięźle. Na szczególne uznanie i podkreślenie zasługuje nowatorski charakter prowadzonych badań dający ważną wiedzę w zakresie patofizjologii oraz potencjalnych metod leczenia OZT. Fakt, iż badane związki są dostępne i znane z innych korzystnych działań u ludzi, ma dodatkową wartość pod kątem planowania dalszych badań i praktycznego ich zastosowania w terapii OZT.

Mgr. Aleksandra Tarasiuk wykazuje doskonałe przygotowanie do dalszej pracy naukowej, a przedstawiona rozprawa pt.: „Identyfikacja i walidacja nowych potencjalnych leków przeciwzapalnych w kontekście ostrego zapalenia trzustki” pod kierunkiem pana prof. dr hab. n. med. Jakuba Fichny spełnia wszystkie kryteria przewidziane odpowiednią ustawą (z dnia 20 lipca 2018r., Dz. U. z 2018 r. poz.1668 ze zm.) określone w art. 187 wymagane na stopień doktora nauk medycznych.

W związku z powyższym przedkładam Radzie Naukowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Tarasiuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Zwracam się również z wnioskiem o wyróżnienie pracy doktorskiej za bardzo dobre metodycznie przeprowadzenie badań oraz formę pracy opartej o publikacje w wysoko notowanych czasopismach z listy filadelfijskiej.



Dr hab. n. med. Piotr Czubkowski, prof. inst.

Klinika Gastroenterologii, Hepatologii, Zaburzeń Odżywiania i Pediatrii

Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”