

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Marty Szandruk

pt. "Wpływ mangiferyny na przebieg doświadczalnego zapalenia jelit u szczurów"

Nieswoiste zapalenia jelit charakteryzują się bardzo złożoną i ciągle niedostatecznie poznaną patogenezą. Uważa się, że interakcje czynników genetycznych i immunologiczno-zapalnych prowadzą do nadmiernie wyrażonej odpowiedzi organizmu, w której bierze udział bardzo wiele związków biologicznie czynnych. Wszystkie te elementy łańcucha patogenetycznego Doktorantka omówiła w obszernym wstępie do rozprawy doktorskiej, dając dowód głębokiej wiedzy jaką posiada w zakresie planowanych badań własnych. Szczegółowy proces myślowy racjonalnie skierowała na odniesienie zdobyczy nauk podstawowych na implikacje kliniczne, szczególnie w aspektach terapeutycznych. Skuteczna terapia tych ciężkich chorób przewodu pokarmowego stanowi bowiem jedno z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny. Ważnym krokiem w tym względzie było wprowadzenie tzw. terapii biologicznej. Jako pierwsze znalazły zastosowanie leki neutralizujące aktywność czynnika martwicy nowotworów – infliksimab i adalimumab. Wykazują one stosunkowo dużą skuteczność, ale ich stosowanie ograniczają działania niepożądane, w tym osłabiające ogólnoustrojowe mechanizmy odpornościowe. Bezpieczniejszy w tym zakresie okazał się wedalimumab, wiążący się swoiście z integryną $4\alpha 7\beta$ limfocytów prawie wyłącznie w ścianie jelit, hamując jej łączenie z cząsteczką adhezyjną MAdCAM-1.

Aktualnie w badaniach przedklinicznych i klinicznych ocenianych jest kilka nowych preparatów. Wszystkie one skierowane są głównie na neutralizowanie wybranych cytokin prozapalnych. Wyprodukowanie leku o szerokim, a jednocześnie bezpiecznym działaniu przeciwzapalnym jest bardzo trudne. Z tego powodu poszukiwanie substancji o wielokierunkowym działaniu przeciwzapalnym, nawet w celach terapii adiuwantowej, jest działaniem bardzo pożądanym. Uzasadnia to w pełni podjęcie badań własnych przez Doktorantkę, których celem było określenie przydatności terapeutycznej mangiferyny.

W oparciu o wyniki wielu badan wskazujących, że ten polifenol roślinny wykazuje działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, immunomodulujące, przeciwbakteryjne i przeciwbólowe postanowiła te informacje potwierdzić lub zweryfikować na modelu doświadczalnego zapalenia jelit u szczurów.

Mangiferynę wyizolowano z kłącza rośliny *Belamcanda chinensis*, pozyskanej z hodowli Ogrodu Roślin Leczniczych Katedry i Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Ekstrakcję i analizę jakościową przeprowadzono przy użyciu

chromatografii cienkowarstwowej i cieczowej. Oznaczanie ilościowe otrzymane mangiferyny wykonano metoda spektrofotometrii, a przy ustalaniu tożsamości chemicznej oraz czystości otrzymanego związku korzystano z wzorca magniferyny firmy Sigma Aldrich, Niemcy.

Część doświadczalną przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar, z wyodrębnieniem 8 grup po 10 osobników, w tym grup kontrolnych. Mangiferynę podawano przez 16 dni dożołądkowo, w dawkach 10, 3 i 100 mg/kg. W 15 dniu szczurom podawano doodbytniczo alkoholowy roztwór kwasu trinitrobenzenosulfonowego (TNBS) w dawce 50mg/kg. W 17 dniu zwierzęta usypiano i uśmiercano i pobierano 8-centymetrowe odcinki dystalnej części jelita grubego, które utrwalano w formalinie do badań histopatologicznych lub zamrażano do celów badan biochemicznych.

Dokonano oceny makroskopowej jelita wg kryteriów Galvez i wsp. i oceny mikroskopowej stanu zapalnego wg kryteriów Arribas i wsp.

W homogenatach jelit oznaczano stężenie TNF- α i IL-17 met.immunofluoroscencyjną oraz stężenie MDA i aktywność SOD met. kolorometryczną.

Z oceny makroskopowej wynika, że TNBS wyzwał u wszystkich zwierząt doświadczalnych zapalenie jelita grubego; pojawiło się przekrwienie, obrzęk i ubytki błony śluzowej.

Podobnie w badaniu mikroskopowym stwierdzono napływ limfocytów, makrofagów i neutrofilii do warstw ściany jelita. Wykazano także uszkodzenie nabłonka powierzchniowego i nabłonka krypt oraz zmniejszenie liczby komórek kubkowych i warstwy śluzu ochronnego.

Gromadzeniu komórek stanu zapalnego i niszczeniu nabłonka towarzyszyło zwiększone wytwarzanie badanych cytokin prozapalnych, zwiększone stężenie MDA oraz zmniejszona aktywność SOD.

Mangiferyna w grupie kontrolnej nie powodowała istotnych zmian morfologicznych, histologicznych ani biochemicznych w jelitach zwierząt, natomiast w grupach poddanych eksperymentowi istotnie zmniejszała wykładniki stanu zapalnego. W szczególności zmniejszała ilość i rozległość owrzodzeń jelita, zwiększała liczbę komórek kubkowych i przywracała warstwę ochronnego śluzu pokrywającego nabłonek.

Stwierdzono także zmniejszenie napływu komórek zapalnych do struktur jelita. Jednocześnie obserwowano zmniejszenie stężenia cytokin prozapalnych.

Wszystkie powyższe korzystne zmiany występowały głównie w grupach szczurów otrzymujących mangiferynę w dawce średniej i dużej, tj. 30 i 100mg/kg.

Tej zależności zmian od dawki mangiferyny nie stwierdzono przy ocenie wykładników procesu oksydacyjnego. Zmniejszone stężenie MDA w ścianie jelit było największe przy dawce średniej (30mg/kg), natomiast wzrost aktywności SOD przy dawce największej (100mg/kg).

Zmniejszenie zmian histologicznych wraz obniżeniem stężenia TNF-alfa, IL-17 i MDA oraz rosnącą aktywnością SOD świadczy o istotnej zależności między stopniem uszkodzeń strukturalnych a aktywnością przeciwzapalną i antyoksydacyjną mangiferyny.

Uzyskane wyniki dowodzą, że mangiferyna podawana w każdej stosowanej dawce działa antyoksydacyjnie, a przeciwzapalnie dopiero w dawkach wysokich. Uszkodzenie jelit było najmniejsze przy dawce 100mg/kg, co wskazuje, że aktywność antyoksydacyjna jest niewystarczająca do ich przeciwdziałania, a bardzo ważna w mechanizmie działania ochronnego jest jej aktywność przeciwzapalna.

Recenzowana rozprawa jest cennym osiągnięciem Doktorantki, posiada istotne walory poznawcze i implikacje terapeutyczne.

Wyróżnia się:

- Dobrym zaplanowaniem eksperymentu i przejrzystym postawieniem zadań badawczych
- uwzględnieniem najważniejszych elementów procesu immunologiczno-zapalnego dotyczących nieswoistych chorób zapalnych jelit
- precyzyjnym przygotowaniem materiału badawczego z użyciem nowoczesnych metod
- kompleksową morfologiczno-biochemiczną oceną uzyskanych wyników eksperymentu
- racjonalnym odniesieniem wyników badan eksperymentalnych do badan klinicznych.

W uwagach pozamerytorycznych proponuje jedynie, aby w tytule i treści pracy określenie „Wpływ mangiferyny na przebieg doświadczalnego zapalenia jelit u szczurów” zmienić na „Wpływ mangiferyny na obraz doświadczalnego zapalenia jelita grubego u szczurów”. Określenie „przebieg” bardziej odnosi się do klinicznej oceny zmian w tych chorobach, z okresami zaostrzeń i remisji.

Recenzowana rozprawa doktorska wyróżnia się nienagannym opracowaniem pod względem językowym i technicznym. Zawiera 102 strony, 15rycin, 9 tabel i 3 zbiorowe dokumenty fotograficzne. Piśmiennictwo obejmuje 140 pozycji, właściwie wyselekcjonowanych i wykorzystanych w pracy.

Stwierdzam więc, że recenzowana praca spełnia wszystkie warunki ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i przekazuję wniosek do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Marty Szandruk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

10.10.2015

2769342
Prof. dr hab. med. Jan Ciżyński
Specjalista chorób wewnętrznych
gastroenterolog
Katedra i Klinika
Gastroenterologii i
Hepatologii