



Zabrze, dnia 31.10.2015 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr farmacji Marty Szandruk pt. „*Wpływ mangiferyny na przebieg doświadczalnego zapalenia jelit u szczurów*”.

Praca pochodzi z Katedry i Zakładu Farmakologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, kierowanego przez Pana Prof. dr hab. n. med. Adama Szelaga, będącego jednocześnie promotorem recenzowanej pracy doktorskiej.

Ma układ typowy, liczy 102 strony, 9 tabel, 15 rycin i 140 pozycji cytowanego piśmiennictwa. Uwagę zwraca staranne opracowanie ww. rozprawy doktorskiej, bogata szata graficzna zawierająca ryciny zaprojektowane i wykonane przez Autorkę oraz pomocny wykaz skrótów.

Wprowadzenie liczące aż 28 stron, w sposób bardzo dokładny i rzetelny, a jednocześnie przystępny, umożliwia czytelnikowi rozeznanie tematyki poruszanej w omawianej pracy doktorskiej. Składa się z trzech części, w których Autorka kolejno omawia charakterystykę, patofizjologię i aktualne możliwości terapii nieswoistych zapaleń jelit (NZJ). Ponadto, przedstawia budowę i działanie badanej substancji, by w końcu przejść do dokładnej analizy modeli doświadczalnych stosowanych w badaniach przedklinicznych nad NZJ. Za szczególnie warte podkreślenia należy uznać przedstawienie we wprowadzeniu informacji płynących z aż 118 pozycji piśmiennictwa. Zwraca uwagę, że oprócz cytowanych klasycznych publikacji dotyczących problemu, Autorka oparła się w tej sekcji na 24 doniesieniach, które opublikowane zostały w przeciągu ostatnich 5 lat. Świadczy to nie tylko o znakomitym rozeznaniu najnowszych postępów w dziedzinie badań nad omawianą tematyką, ale również o aktualności rozpatrywanych w pracy doktorskiej zagadnień. Co szczególnie istotne, Autorka odnosi się nie tylko do obowiązujących zaleceń Europejskiego Towarzystwa Chorób Zapalnych Jelit (cytowane wytyczne *European Crohn and Colitis Organization*), ale przytacza również rekomendacje kliniczne Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii.

Cele pracy zostały określone w sposób jasny, zarówno ogólnie jak i szczegółowo. Obejmowały nie tylko kompleksową ocenę wpływu mangiferyny na wystąpienie wywołanych eksperymentalnie zmian zapalnych w jelicie grubym szczurów, ale także - co podnosi wartość pracy - uzyskanie badanej substancji z surowca roślinnego, którym były kłącza *Belamcanda chinensis*. Nie można pominąć w tym świetle faktu, że Autorka przy realizacji swoich badań, nawiązała współpracę z uznanym Zakładem Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Placówka ta specjalizuje się w badaniach właściwości roślin leczniczych, ze szczególnym uwzględnieniem azjatyckich surowców zielarskich.

W tym kontekście trzeba zaznaczyć, że poszukiwanie nowych czynników aktywnych mogących zmieniać przebieg NZJ jest szczególnie cenną inicjatywą. Dane epidemiologiczne nie pozostawiają złudzeń - nieswoiste choroby zapalne jelit: choroba Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego stanowią ciągle rosnący problem medyczny, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych. Choroby te, w szczególności wrzodziejące zapalenie jelita grubego, stanowią ponadto czynnik ryzyka powstawania nowotworów, a także często współistnieją z innymi chorobami autoimmunologicznymi. Nie ulega wątpliwości, że pomimo pewnego postępu w zakresie farmakoterapii nieswoistych zapaleń jelit istnieje potrzeba dalszych badań, szczególnie w zakresie leków modulujących przebieg tych chorób. Niestety, pomimo coraz powszechniejszego dostępu do leków biologicznych, wciąż wielu pacjentów skazanych jest na okaleczające interwencje chirurgiczne. Nie bez znaczenia są w tej perspektywie również kwestie farmakoekonomiczne, ze względu na olbrzymie i ciągle rosnące koszty leczenia i monitorowania pacjentów cierpiących na NZJ. Wszystkie wyżej opisane czynniki powodują, że w dalszym ciągu poszukujemy leków skutecznie indukujących i podtrzymujących remisję chorób zapalnych jelit.

Dobór zastosowanych **metod** w badaniu jest właściwy, a ich paleta świadczy o rozległych umiejętnościach Autorki. Model badawczy eksperymentalnego zapalenia jelita grubego u szczurów, oparty na zastosowaniu bodźca chemicznego (kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy - TNBS) wykazuje podobieństwo do całokształtu zmian patofizjologicznych zachodzących w nieswoistych zapaleniach jelit u ludzi, szczególnie tych ograniczonych do jelita grubego. Za szczególnie warte podkreślenia uważam dobrze wybrane i wiarygodne metody użyte do analizy jakościowej badanej substancji, wykonane w Zakładzie Herbológii i Technik Uprawy Roli Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Podnosi to niewątpliwie jakość uzyskanych wyników, podobnie jak wiarygodna ocena histologiczna tkanek jelita grubego szczurów, przeprowadzona w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Opis wyników nie budzi wątpliwości, a niektóre uwagi zawarłem poniżej. Zaznaczyć należy przy tym, że połączenie formy graficznej z tabelami znakomicie ułatwia czytelnikowi ich zrozumienie.

W recenzowanej pracy wykazano, że podawanie mangiferyny zmniejsza zakres uszkodzeń tkanek jelita grubego w modelu eksperymentalnie wywołanego zapalenia u szczurów. Wielkość uszkodzenia była znamienne mniejsza w ocenie zarówno makro- jak i mikroskopowej u zwierząt leczonych badaną substancją podawaną w ilości 30 mg/kg i 100 mg/kg. Nie wykazano przy tym ochronnego działania najniższej dawki, 10 mg/kg na ww. parametry. Co istotne, Autorka wykazała także, że korzystne działanie ochronne mangiferyny jest zależne od dawki, ponieważ nasilenie zmian było mniejsze przy zastosowaniu w dawce 100 mg/kg, w porównaniu do dawki 30 mg/kg. Najwyższa dawka badana, zmniejszała również istotnie stężenie cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-17). Dodatkowym argumentem przemawiającym za dawkozależnym działaniem badanej substancji jest obserwacja, że efekt ten był silniejszy w grupie gdzie zastosowano najwyższą dawkę w porównaniu do grupy w której podawano dawkę 30 mg/kg.

Mangiferyna wpływała na parametry układu oksydoredukcyjnego w tkankach jelita grubego szczurów: wszystkie dawki znacząco zmniejszały stężenie malonodialdehydu (MDA), a dawka 100 mg/kg dodatkowo zwiększała przy tym aktywność dysmutazy nadkwasotlenkowej (SOD).

Dyskusja została poprowadzona w sposób jasny i zrozumiały dla czytelnika. Niewątpliwie jest popisem możliwości Autorki, która prowadząc wnikliwą i wielokierunkową analizę nie stroni od zadawania pytań, na które z polotem odpowiada. Uznanie budzi również zmysł obserwacji, umiejętność kojarzenia faktów oraz wysuwanie wniosków klinicznych, a przede wszystkim wręcz wytyczanie sobie i innym dalszych kierunków badań. Wszystkie wyżej wymienione cechy wskazują na dojrzałość Autorki jako badacza, którą bez wątpienia rozwinęła w unikalnej szkole swojego Promotora.

Uzyskane przez Autorkę wyniki mają bez wątpienia duże znaczenie poznawcze, jak i mogą mieć w niedalekiej przyszłości istotne znaczenie kliniczne. Dowodzą one, że badana substancja - mangiferyna

ma silny, korzystny wpływ ochronny w modelu eksperymentalnego zapalenia jelita grubego u szczurów, który polega na działaniu przeciwzapalnym i antyoksydacyjnym. Ponadto, Autorka wykazała, że te protekcyjne właściwości są zależne od dawki, ponieważ najkorzystniejszy profil wywieranych działań został stwierdzony przy podawaniu mangiferyny w dawce 100 mg/kg.

Wnioski niniejszej rozprawy doktorskiej z naddatkiem odpowiadają na postawione w celu pracy założenia.

Z obowiązku recenzenta oraz wiedziony niedosytem informacji mam następujące pytania do Autorki:

- 1) Jednym z najbardziej istotnych problemów współczesnej terapii nieswoistych chorób zapalnych jelit jest indukcja i podtrzymanie remisji choroby Leśniowskiego-Crohna, szczególnie postaci z zajęciem jelita cienkiego. Pomimo licznych badań i wysiłków, ze względu na niewielką użyteczność pochodnych 5-ASA i coraz częściej dyskutowaną pozycję przewlekłej immunosupresji azatiopryną w tej chorobie, podstawą indukcji remisji pozostają glikokortykoidy, a w przypadku postaci opornych - terapia biologiczna. Co szczególnie ważne, wbrew występowaniu wielu wspólnych cech, wszelkie wytyczne postępowania wyraźnie odgraniczają (i słusznie) od siebie postacie NZJ: wrzodziejące zapalenie jelita grubego oraz chorobę Leśniowskiego-Crohna. W tym kontekście, pewną wątpliwość budzi wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników o prawdopodobnej skuteczności badanej substancji w **obu** najczęstszych postaciach NZJ: wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego, **oraz** chorobie Leśniowskiego-Crohna. Co prawda, Autorka nie wyraża takiej opinii **wprost**, jednak zwraca uwagę, że punkt 3 sekcji „Wnioski”, traktujący o: „działaniu ochronnym mangiferyny **na jelita** w przebiegu ich uszkodzenia doświadczalnego...” jest nieco nieścisły i może stwarzać mylne wrażenie, że omawiana substancja została zbadana pod kątem jej globalnego wpływu na przewód pokarmowy w fazie ostrego zapalenia, a także sugeruje, że jej działanie obejmuje zarówno jelito cienkie, jak i grube. Z drugiej zaś strony, Autorka w celach pracy jak i opisie przyjętych metod, wielokrotnie podkreśla, że wnioski z badania bazują na ocenie tkanek jelita grubego. W tym kontekście, jaka jest opinia Autorki na temat tego, czy zasadne jest ograniczenie interpretacji wyłącznie do ewentualnego wpływu na jelito grube, bądź idąc dalej, na eksperymentalną postać wrzodziejącego zapalenia jelita grubego? Wydaje się to szczególnie istotne, gdy dodatkowo weźmie się pod uwagę opis histologiczny uszkodzeń jelita grubego uzyskanych w zastosowanym modelu (*vide* niżej).
- 2) Jak powszechnie wiadomo, rozpoznanie i różnicowanie nieswoistych zapaleń jelit bywa bardzo trudne, a opiera się na całokształcie obrazu klinicznego, badaniach obrazowych, endoskopowych, a także histopatologicznych. Ze względu na bardzo dużą ilość wyników niejednoznacznych, stosunkowo rzadko ta ostatnia z wymienionych wyżej metod przesądza o postawionej diagnozie, co zależne jest m.in. od aktywności NZJ w czasie przeprowadzania badania. Niemniej jednak, aktualny konsensus dotyczący rozpoznania histopatologicznego chorób zapalnych jelit dość ściśle określa cechy charakterystyczne dla najczęstszych postaci NZJ: choroby Leśniowskiego-Crohna (m.in. występowanie zmian zapalnych ogniskowo, w sposób nieciągły, nieregularność krypt, tworzenie ziarniników bez związku z uszkodzeniem krypt - szczególnie w przypadku postaci z zajęciem jelita grubego) oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (m.in. rozlane zaburzenie architektoniki krypt, infiltracja zapalna śluzówki z tworzeniem mikroropni krypt, a w postaciach o długotrwałym przebiegu - dysplazja nabłonka). W tym kontekście, czy Autorka może odnieść się do przyjętego w swojej pracy modelu oceny histopatologicznej tkanek jelita grubego, który opierał się przede wszystkim na ocenie zasięgu owrzodzeń, nacieku błony podśluzowej i mięśniowej?

- 3) Nieswoiste choroby zapalne jelit, a przede wszystkim wrzodziejące zapalenie jelita grubego, stanowią czynnik ryzyka występowania nowotworów przewodu pokarmowego. W związku z wykazaniem przez Autorkę działaniem przeciwzapalnym, modulującym aktywność cytokin zapalnych oraz wpływem na parametry stresu oksydacyjnego mangiferyna wydaje się być potencjalnie interesującym obiektem badań w kontekście chemoprewencji nowotworów w przebiegu NZJ. Jakie aspekty aktywności tej substancji mogłyby być zdaniem Autorki szczególnie interesujące pod kątem tego typu badań?
- 4) Autorka opisuje zdolności chelatujące mangiferyny, na przykładzie tworzenia kompleksów z jonami żelaza. Czy są jej znane inne reakcje chemiczne badanej substancji, które w teorii mogłyby przyczyniać się do zaburzenia wchłaniania innych substratów ze światła przewodu pokarmowego, a co za tym idzie stanowić potencjalne działanie niepożądane w kontekście upośledzenia wchłaniania towarzyszącego NZJ?

Moje uwagi dotyczące kompozycji tekstu są m.in. następujące:

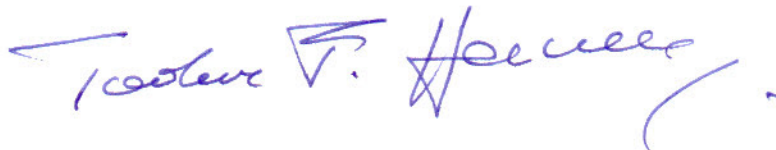
- 1) sekcja **Piśmiennictwo** jest niespójna w swej formie: niektóre prace są cytowane wraz z numerami woluminu/zeszytu oraz numeru, a niektóre z pominięciem niektórych elementów opisu cytowanej pozycji
- 2) str. 74 - należałoby wyraźniej zaznaczyć na koniec ostatniego akapitu tej strony, że zawarty w nim opis dotyczy grupy kontrolnej, która nie otrzymywała TNBS.
- 3) .w mojej opinii, przejrzystość tabeli byłaby znacznie większa gdyby zawierały dodatkowo:
 - oznaczenie symbolem grup między którymi występuje znamienność statystyczna
 - legendę pod tabelą, która zawierałaby opis zastosowanych skrótów (ze względu na relatywnie dużą ilość badanych grup)

Reasumując, powyższe uwagi i pytania nie ujmują wartości tej rozprawy, którą oceniam wysoko jednocześnie stwierdzając, że zawiera ona ważne i oryginalne elementy wniesione do nauki. Jestem głęboko przekonany, że stanowią one solidne podwaliny pod przyszłe badania kliniczne dotyczące możliwego zastosowania mangiferyny w terapii NZJ u ludzi.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 64, poz. 595, z późn. zm.). i w związku z tym z pełnym przekonaniem i zarazem przyjemnością

wnioskuję

do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Pani **mgr farmacji Marty Szandruk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/ Tadeusz F. Krzemiński /