

Dr hab. Jose Luis Valverde Piedra, prof. nadzw.
Zakład Toksykologii i Ochrony Środowiska
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 28 listopada 2016 r.

Ocena rozprawy doktorskiej lek. med. Aleksandry Matuszyk pt. "Wpływ podawania peptydów kodowanych przez gen greliny na uszkodzenia błony śluzowej jelita grubego wywołane kwasem octowym" (The influence of administration of ghrelin gene encoded peptides on colonic mucosa damage induced by acetic acid) wykonana pod kierunkiem Promotora dr hab. n. med. Piotra Ceranowicza oraz Promotora pomocniczego dr n. biol. Iwony Brzozowskiej. Pracę wykonano w Zakładzie Fizjologii Klinicznej Katedry Fizjologii Collegium Medium, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Zdolność utrzymania integralności błony śluzowej przewodu pokarmowego zapewnienia prawidłową funkcję bariery chroniącej przed wniknięciem mikroorganizmów i związków chemicznych ze światła przewodu pokarmowego. Do zachwiania prawidłowego działania tej bariery prowadzić mogą czynniki o naturze chemicznej, biologicznej i fizycznej w wyniku spowolnienia lub zahamowania procesów odpowiedzialnych za jej prawidłową odnowę. Dynamiczna równowaga istniejąca pomiędzy regeneracją komórek nabłonka a ich utratą, pozwala na zachowanie integralności błony śluzowej przewodu pokarmowego. W prawidłowych warunkach proces ten jest regulowany na zasadzie ujemnych sprzężeń zwrotnych i jest wypadkową intensywności przebiegu procesów śmierci i proliferacji komórek. Przewód pokarmowy jest miejscem powstawania wielu peptydów biorących udział w utrzymaniu na odpowiednim poziomie przebiegu tych procesów. Jednakże w wyniku działania silnego bodźca nocycyptywnego dochodzić może do powstania stanów zapalnych i uszkodzenia błony śluzowej w różnych miejscach przewodu pokarmowego. W warunkach rozwoju zapalenia zainicjowane procesy odnowy przebiegają zbyt wolno aby zapewnić rychłą odbudowę błony śluzowej.

Warto zaznaczyć, że proces wymiany komórek wyścielających błonę śluzową jelit jest bardzo dynamiczny i zachodzi dzięki podziałom komórek macierzystych umiejscowionych w strefie twórczej w dolnej części krypt jelitowych. W czasie wędrówki (trwającej kilka dni) do szczytu kosmków w jelicie cienkim lub luminalnej powierzchni w jelicie grubym dochodzi do ich różnicowania czynnościowego a po dotarciu na szczyt ulegają one złuszczeniu do światła jelita. Wypaczenie tempa proliferacji komórek macierzystych i śmierci komórek nabłonka jelitowego (enterocytów lub kolonocytów) prowadzić może do atrofii błony śluzowej, jak również do powstawania miejsc pozbawionych ich obecności, dając początek wrzodom. Zaś, zwiększenie tempa regeneracji przyspiesza proces błony śluzowej po jej uszkodzeniu i przywraca integralność błony śluzowej przewodu pokarmowego.

Pomimo znaczącego postępu w zapobieganiu i leczeniu zapaleń jelita grubego, brak jest skutecznych metod leczenia a poszukiwanie nowych substancji leczniczych jest koniecznością dla zapewnienia lepszej ochrony zdrowia pacjentów. W Polsce szacuje się, że zapadalność na WZJG (wrzodziejące zapalenie jelita grubego) wynosi ok. 700 przypadków rocznie, a liczba chorych ok. 30 000 do 40 000. W krajach zachodnich 1/500 mieszkańców cierpi na IBD (inflammatory bowel disease), a wg danych z Wielkiej Brytanii nawet 1/250 osób.

Preprogrelina jest wspólnym prohormonem dla greliny i obestatyny. Oprócz uwalniania hormonu wzrostu, grelina wykazuje inne efekty biologiczne, takie jak pobudzenie motoryki przewodu pokarmowego, wzrost przyjmowania pokarmu i zwiększanie odkładania tkanki tłuszczowej oraz udział w regulacji bilansu energetycznego ustroju. Ponadto, badania prowadzone przez wybitne światowe zespoły naukowe wykazały, że grelina chroni wiele narządów przed działaniem czynników szkodliwych, w tym: serce, nerki i mózg przed uszkodzeniami wywołanymi niedotlenieniem. W przewodzie pokarmowym, profilaktyczne podanie greliny hamuje rozwój wrzodów błony śluzowej żołądka indukowanych doświadczalnie etanolem, stresem i alendronianami. Grelina przyspiesza gojenie przewlekłych wrzodów żołądka i dwunastnicy wywołanych kwasem octowym. Wykazano również, że grelina hamuje rozwój ostrego zapalenia trzustki wywołanego ceruleiną lub niedotlenieniem z następową reperfuzją oraz przyspiesza regenerację trzustki w przebiegu tego zapalenia.

Liczne badania wykazały, że obestatyna wykazuje protekcyjne oraz terapeutyczne działanie w układzie pokarmowym. Podawanie obestatyny dootrzewnowo przyspiesza leczenie wrzodów żołądka wywołanych kwasem octowym oraz zapalenia jelita grubego wywołane roztworem dekstranu sodu. Profilaktyczne podawanie obestatyny hamuje rozwój

ostrego zapalenia trzustki wywołanego ceruleiną i niedokrwieniem z następową reperfuzją a także sprzyja przeżyciu wysp trzustkowych, zwłaszcza komórek β . Ponadto, zespół Profesora Konturka stwierdził, że pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wykazują zwiększoną ekspresję mRNA dla greliny i TNF- α w błonie śluzowej jelita grubego sugerując istotną rolę tych czynników w patogenezie tej choroby.

Badanie wpływu podawania greliny i obestatyny na uszkodzenia błony śluzowej jelita grubego jest zadaniem trudnym, co wynika zarówno z metodologicznych ograniczeń badań wymagających dużej liczby zwierząt, jak ze złożoności czynników endo i egzogennych oddziałujących na nabłonek jelitowy, jak również czynników uczestniczących w procesach zapalnych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. med. Aleksandry Matuszyk pt. "Wpływ podawania peptydów kodowanych przez gen greliny na uszkodzenia błony śluzowej jelita grubego wywołane kwasem octowym" obejmuje przeprowadzone przez Autorkę badania zmierzające do określenia roli greliny i obestatyny w stanach zapalnych jelita grubego. Ponadto, badania te obejmują możliwości stosowania syntetycznych analogów ww. peptydów w leczeniu stanów patologicznych związanych z przerwaniem ciągłości bariery jelitowej.

Wybór bardzo aktualnego tematu pracy przez Doktorantkę należy ocenić wysoko, jako zasadny naukowo i pożądany ze względu na możliwość przeniesienia uzyskanych wyników do praktyki klinicznej.

Rozprawa jest zbiorem trzech prac oryginalnych, przedstawiona w formie 10 rozdziałów tj. spis treści, streszczenie (w języku polskim i angielskim), wstęp zawierający teoretyczne podstawy problemu, cel podjętych badań, metody i organizacja badań, wyniki badań i podsumowanie, wnioski, piśmiennictwo, publikacje składające się na pracę doktorską oraz oświadczenia współautorów.

Wszystkie trzy artykuły dotyczą udziału peptydów powstających z preprogreliny w procesach odnowy (gojenia) błony śluzowej jelita grubego na modelu szczurzym z indukowanym zapaleniem za pomocą niskoprocentowego kwasu octowego. Wszystkie trzy oryginalne artykuły są pracami wieloautorskimi, opublikowanymi w czasopismach z Listy Filadelfijskiej (Journal of Physiology and Pharmacology, Archives of Medical Sciences oraz Oxidative Medicine and Cellular Longevity). Prace były cytowane 3 razy, a czynnik wpływu wynosi łącznie 9,108. Spełnione zostały tym samym ustawowe wymogi odnośnie spójności tematycznej publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Do rozprawy dołączono oświadczenia Doktorantki i wszystkich współautorów, wskazujące na indywidualny wkład przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników poszczególnych prac. Należy zwrócić uwagę, że w dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem.

Krótki wstęp podsumowujący kliniczne aspekty badanej jednostki chorobowej, odsyłający do publikacji przeglądowych i oryginalnych, wprowadza czytelnika w tematykę ocenianej rozprawy.

Jako cel pracy Doktorantka postawiła sobie określenie wpływu parenteralnego podawania (i.p.) peptydów pochodnych preprogreliny, tj. greliny i obestatyny na proces odnowy uszkodzonej błony śluzowej jelita grubego oraz na powstawanie uszkodzeń błony śluzowej jelita grubego wywołane podawaniem kwasu octowego na modelu szczurzym. Do osiągnięcia celu, Doktorantka przeprowadziła badania w trzech etapach w poszukiwaniu odpowiedzi na pytania:

1. Jaki jest wpływ peptydów pochodnych preprogreliny na odnowę komórkową błony śluzowej jelita grubego?
2. Czy podawanie peptydów pochodnych preprogreliny wpływa na dynamikę procesu gojenia uszkodzeń błony śluzowej jelita grubego?
3. Czy podawanie peptydów pochodnych preprogreliny wpływa na lokalny odczyn zapalny w błonie śluzowej jelita grubego?
4. Jaki jest wpływ peptydów pochodnych preprogreliny na rozwój stresu oksydacyjnego w przebiegu uszkodzeń błony śluzowej jelita grubego?
5. Czy podawanie peptydów pochodnych preprogreliny przed wywołaniem uszkodzeń błony śluzowej jelita grubego może hamować rozwój tych uszkodzeń?

Najważniejszą część rozprawy stanowią trzy artykuły przedstawiające wyniki badań z udziałem peptydów powstających z preprogreliny w procesach odnowy błony śluzowej jelita grubego na modelu szczurzym z indukowanym zapaleniem za pomocą niskoprocentowego kwasu octowego:

1. Maduzia D, Matuszyk A, Ceranowicz D, Warzecha Z, Ceranowicz P, Fyderek K, Gałazka K, Dembiński A. The influence of pretreatment with ghrelin on the development of acetic-acid-induced colitis in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2015 Dec; 66: 875-85. IF=2,804
2. Aleksandra Matuszyk, Piotr Ceranowicz, Zygmunt Warzecha, Jakub Cieszkowski, Krystyna Gałazka, Joanna Bonior, Jolanta Jaworek, Peter Christopher Konturek, Krzysztof Gil, Artur Dembiński. Pretreatment with obestatin inhibits the development of

acetic acid-induced colitis in rats. Arch Med Sci. Online publish date: 2016-03-23 DOI (digital object identifier): 10.5114/aoms.2016.58749. IF=1,812

3. Matuszyk A, Ceranowicz P, Warzecha Z, Cieszkowski J, Bonior J, Jaworek J, Kuśnierz-Cabala B, Konturek P, Ambroży T, Dembiński A. Obestatin accelerates the healing of acetic acid-induced colitis in rats. Oxid Med Cell Longev. 2016; 2016:2834386. doi: 10.1155/2016/2834386. Epub 2015 Dec 20. IF=4,492

W pierwszej pracy zbadano wpływ greliny na zapobieganie powstawania uszkodzeń błony śluzowej jelita grubego wywołanych kwasem octowym. Badania przeprowadzono na 160 szczurach szczepu Wistar podzielonych na grupy kontrolne i doświadczalne zapewniające odpowiednią liczbę obserwacji do wiarygodnej analizy statystycznej. Zbadano wpływ trzech różnych dawek greliny (4, 8 i 16 nmol/kg mc. 2x dziennie *i.p.*) oraz wpływ płynu fizjologicznego zarówno u szczurów z indukowanym zapaleniem, jak i bez indukcji zapalenia jelita grubego. W znieczuleniu ogólnym indukowano stan zapalny jelita grubego u szczurów poprzez wykonanie wlewu z 1 ml 4% kwasu octowego, zaś kontrolne wlewy wykonano z soli fizjologicznej. Ocena stopnia stanu zapalnego dokonywano po godzinie i po upływie 24 godzin od wlewu. Po znieczuleniu i otwarciu jamy brzusznej oceniano rozległość uszkodzeń błony śluzowej jelita grubego oraz przepływ krwi przez tę błonę. Pobrano fragmenty ściany jelita do oceny histologicznej i określenia wielkości syntezy DNA oraz oceny biochemicznych wskaźników nasilenia zapalenia (aktywność mieloperoksydazy i stężenie pro-zapalnej interleukiny-1 β) i oceny stanu równowagi oksydoredukcyjnej (stężenie dwualdehydu malonowego oraz aktywności dysmutazy ponadtlenkowej). W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że wcześniejsze podawanie dootrzewnowo greliny hamuje rozwój zapalenia jelita grubego indukowanego kwasem octowym u szczurów. Autorzy przypisują te działania właściwościom przeciwzapalnym i antyoksydacyjnym greliny.

W drugiej pracy zbadano wpływ obestatyny na zapobieganie powstawania uszkodzeń błony śluzowej jelita grubego wywołanych kwasem octowym. Badania przeprowadzono na 128 szczurach szczepu Wistar. Metodyka przeprowadzonych badań, jak i zakres prowadzonych analiz wskaźników była podobna jak w pierwszej pracy.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że wcześniejsze podawanie dootrzewnowo obestatyny działa ochronnie na błonę śluzową jelita grubego zapobiegając rozwojowi zapalenia indukowanego kwasem octowym u szczurów. Autorzy wskazują na potencjalną możliwość stosowania tego peptydu w kontroli remisji u pacjentów z zapaleniem jelit.

W trzeciej pracy badano wpływ obestatyny na przebieg zapalenia jelita grubego wcześniej wywołanego 1 ml 3,5% roztworu kwasu octowego. Na 80 szczurach szczepu Wistar badano wpływ dawki 8 nmol/kg/mc. dwa razy dziennie (16 nmol/kg/mc./dzień) oraz wpływ płynu fizjologicznego zarówno u szczurów z indukowanym zapaleniem, jak i bez indukcji zapalenia jelita grubego. Metodyka przeprowadzonych badań, jak i zakres prowadzonych analiz wskaźników była podobna, jak w poprzednich pracach. Różne były jednak czasokresy stosowania obestatyny dootrzewnowo tj. siedem lub czternaście dni, oraz związane z tym czas od indukcji zapalenia, po którym oceniano rozległość uszkodzeń błony śluzowej jelita grubego, jak i badania przepływu krwi przez tę błonę.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że dootrzewnowe podawanie obestatyny przyspiesza proces odnowy błony śluzowej jelita grubego u szczurów z zapaleniem jelita grubego wywołanym 3,5% roztworem kwasu octowego. Autorzy przypisują te działania właściwościom przeciwzapalnym obestatyny oraz jej zdolności do zwiększania przepływu krwi i stymulacji proliferacji błony śluzowej jelita grubego.

Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską **lek. med. Aleksandry Matuszyk** uważam, że Autorka pracy posiadała wymaganą znajomość warsztatu metodycznego, potrafi te umiejętności odpowiednio wykorzystać w pracy eksperymentatorskiej, a otrzymane wyniki logicznie zinterpretować. Praca dokumentuje, w moim przekonaniu, kilka ważnych odkryć biomedycznych. Mając powyższe na uwadze pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska **lek. med. Aleksandry Matuszyk** pt "Wpływ podawania peptydów kodowanych przez gen greliny na uszkodzenia błony śluzowej jelita grubego wywołane kwasem octowym" (The influence of administration of ghrelin gene encoded peptides on colonic mucosa damage induced by acetic acid)" w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę do **Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego**

Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie **lek. med. Aleksandry Matuszyk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny oraz nowatorski charakter recenzowanej dysertacji wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

