Warszawa, 04.08.2023 r.

Prof. dr hab. n. wet. Romuald Zabielski, czł. koresp. PAN
Centrum Medycyny Translacyjnej
SGGW w Warszawie

Ocena rozprawy doktorskiej[1] lek. wet. Marty Brzozowskiej

pt. „Wpływ stanu zapalnego wywołanego podaniem kwasu acetylosalicylowego, naproksenu i indometacyny na kodowanie chemiczne neuronów jelitowego układu nerwowego dwunastnicy świni domowej"

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. wet. Marty Brzozowskiej obejmuje 79-stronicowe opracowanie w języku polskim, w którym zawarto 3 powiązane tematycznie oryginalne artykuły naukowe opublikowane w języku angielskim w *Annals of Anatomy* (2020 r.), *Frontiers in Pharmacology* (2020 r.) i *International Journal of Molecular Sciences* (2023 r.), na których praca doktorska się opiera. Spójność tematyczna artykułów została logicznie wywiedziona we Wstępie dysertacji doktorskiej i nie rodzi uwag krytycznych. Przy każdej z publikacji zamieszczono oświadczenia współautorów prac określające merytoryczny wkład autorów, w tym także Doktorantki, w powstanie publikacji użytych do pracy doktorskiej. Z zamieszczonych oświadczeń oraz rozdziału „Author contributions" każdej z prac wynika, że wkład pracy lek. wet. Marty Brzozowskiej w powstanie publikacji był znaczący. Łączny dorobek naukowy lek. wet. Marty Brzozowskiej wg. Bazy Web of Science obejmuje 14 pozycji, cytowanych w sumie 74 razy. Indeks *h* wynosi 6 (dane na dzień 24.07.2023). Z formalnej konieczności muszę zaznaczyć, że w dysertacji brakuje informacji o tym, że p. M. Czajkowska i M. Brzozowska to jedna i ta sama osoba.

Dysertacja składa się ze spisu publikacji, 2 jednobrzmiących streszczeń w języku polskim i angielskim, wstępu, w którym jasno wyartykułowano hipotezę badawczą, celów pracy, opisu materiałów i metod, wyników czterech eksperymentów, dyskusji, wniosków oraz spisu piśmiennictwa (95 pozycji), oświadczeń autorów oraz trzech wspomnianych opublikowanych artykułów. Dysertacja jest wzbogacona 2 tabelami (lista przeciwciał użytych do badań oraz zestawienie liczby neuronów śródściennych dwunastnicy świni wykazujących ekspresję badanych neuroprzekaźników). Dysertacja została bardzo starannie przygotowana od strony językowej i edytorskiej. Mimo to, znalazłem w tekście kilka pomniejszych usterek np., określenie „etapu doświadczenia" zamiast „analizy" (str. 14), niepotrzebną białą plamę bez

[1] Ocenę rozprawy doktorskiej przygotowano zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1669 ze zm.)

tekstu (str. 16), brak opisu skrótów użytych w tabeli 1 i 2 (str. 17 i 23), niewłaściwe pisanie wartości procentowych (np. 20,27% ± 0,83% zamiast 20,27 ± 0,83% - str. 19), użycie „suplementacja" zamiast „podanie" lub „aplikacja" (str. 26) i niezręcznych sformułowań „nasze wyniki silnie odpowiadają powyższym obserwacjom" (str. 30). Opisy badań i czynności laboratoryjnych są jasne, klarowne i pozbawione terminów z żargonu laboratoryjnego, co wywołuje generalnie bardzo dobre wrażenie o pracy oraz umożliwia odtworzenie doświadczeń w laboratorium o podobnym profilu. Publikacje zamieszczono w postaci dobrej jakości reprintów na końcu dysertacji. Jako że materia badań jest cenna od strony metodycznej oraz bogata w odkrycia, wyniki opublikowano w czasopismach naukowych o dobrej międzynarodowej renomie (IF=2,7, 5,8 i 6,2).

Ocena merytoryczna

Niesterydowe leki przeciwzapalne (NLPZ) to grupa leków stosowanych głównie w celu złagodzenia bólu, redukcji stanu zapalnego i obniżenia gorączki. NLPZ działają, najkrócej mówiąc, poprzez hamowanie enzymu cyklooksygenazy (COX), który jest odpowiedzialny za produkcję prostaglandyn. Są one niezwykle powszechnie stosowane w leczeniu różnych schorzeń, takich jak ból mięśni i stawów, ból głowy, zapalenie stawów, zapalenie mięśni, zapalenie układu moczowego, menstruacyjne bóle brzucha, migreny i wielu innych. Łatwa dostępność, często bez recepty, wiąże się ze stosunkowo częstym zgłaszaniem skutków ubocznych działania NLPZ. Długotrwałe stosowanie NLPZ może również prowadzić do poważniejszych działań niepożądanych, takich jak uszkodzenie wątroby i serca. Jak słusznie Autorka wspomniała na str. 9, NLPZ mogą powodować różne działania niepożądane w przewodzie pokarmowym. Mogą prowadzić do uszkodzenia i owrzodzenia błony śluzowej żołądka, co może prowadzić do wystąpienia bólu brzucha, zgagi, nudności, wymiotów, krwawień żołądkowych i wrzodów. W niektórych przypadkach może dojść nawet do perforacji żołądka. Długotrwałe stosowanie NLPZ może prowadzić do uszkodzenia błony śluzowej jelita cienkiego i grubego, co może prowadzić do wystąpienia biegunki, krwi w stolcu, bólu brzucha i zapalenia jelit. O czym Autorka nie wspomniała, a byłoby to cennym przedmiotem badań z użyciem technik, którymi dysponuje, niektóre osoby przyjmujące długotrwale NLPZ mogą doświadczać nasilonych objawów zespołu jelita drażliwego, takich jak ból brzucha, wzdęcia, zaparcia lub biegunka, zespołu o nadal niejasnej etiologii a wiązanego z funkcją jelitowego układu nerwowego. W końcu, NLPZ mogą zwiększać ryzyko krwawienia z przewodu pokarmowego, zarówno w żołądku, jak i w jelitach. Warto nadmienić na cele tej recenzji, że dawkowanie NLPZ zależy od rodzaju leku i choroby, którą się leczy, zazwyczaj zaleca się stosowanie najniższej skutecznej dawki przez możliwie najkrótszy czas.

Autorka dysertacji postanowiła zbadać ekspresję szeregu neuroprzekaźników jelitowego układu nerwowego w strukturach tego układu, zwojach mięśniowych (MP) oraz zwojach podśluzowych wewnętrznych i zewnętrznych (ISP, OSP) w odpowiedzi na podanie jednego z trzech wybranych NLPZ (indometacyny, naproksenu i kwasu acetylosalicylowego). W grupie badanych neuroprzekaźników znajdujemy: VIP, GAL, CART, PACAP, SP i nNOS, czyli istotnych graczy jelitowego układu nerwowego modulujących funkcje motoryczne, sekrecyjne, absorpcyjne, regeneracyjne, grę naczynowią i in. w żołądku i jelicie. Badania przeprowadzone

zostały na modelu przewodu pokarmowego świni domowej, na dzisiaj „złotego modelu" dla przewodu pokarmowego człowieka i tak też z grubsza Autorka uzasadnia swój wybór. Do Wstępu mam jedną wielką pochwałę, jak zresztą i do pozostałych rozdziałów pracy w tym względzie, że jest krótki a jednocześnie zawiera wszystko co w mojej ocenie jest niezbędne i doskonale prowadzi do puenty jaką jest postawienie celu badawczego. W mojej ocenie, markowanie słabości pracy poprzez wypisywanie tasiemcowych stanów aktualnej wiedzy niewiele pomaga, a może odnieść wręcz przeciwny skutek. Do Wstępu, mam dwa zastrzeżenia. Pierwsze, dotyczy tego, że Autorka niejako *a priori* założyła, że zaobserwuje zmiany „Określenie zmian ekspresji wazoaktywnego peptydu ... na skutek podawania aspiryny, naproksenu i indometacyny...". Wystarczyłoby usunąć z tego przydługiego zdania słowo „zmian" i byłoby akceptowalne nawet przez najsurowszego teoretyka metodologii badań naukowych. Po drugie zabrakło mi wyjaśnienia, dlaczego te, a nie inne NLPZ zostały wybrane do badań. W podsumowaniu, celowość zajęcia się problematyką została w pracy rzeczowo udokumentowana. W mojej ocenie podjęcie badań było w pełni uzasadnione, a wyniki potencjalnie cenne dla lepszego zrozumienia powstawania niepożądanych zdarzeń przy długotrwałym stosowaniu niesterydowych leków przeciwzapalnych. Ze zrozumiałych względów praca Autorki nie jest w stanie zaproponować gotowego rozwiązania z uwagi na olbrzymią złożoność, ale jej badania dają zaczyn w kierunku lepszego zrozumienia udziału neuroprzekaźników jelitowego układu nerwowego w odpowiedzi na długotrwałe podawanie NLPZ. Z zarzutem pierwszym koresponduje też „Potwierdzenie indukcji stanu zapalnego dwunastnicy spowodowanego..." w celu pracy nr II. Należałoby w mojej ocenie, tak sformułować cel, aby uniknąć w nim wstępnego założenia, że ten stan zapalny to będzie wywołany jak 2x2=4.

Metodykę badań otwiera informacja o uzyskaniu zgodny LKE na badania na zwierzętach. Opisy w części metodycznej są bardzo precyzyjne, skrótowe, ale nic w nich nie brakuje, poza jednym, a mianowicie poza kluczem, na podstawie którego wybrano te a nie inne dawki NLPZ. W sumie, dość trudno było znaleźć dawki terapeutyczne NLPZ stosowane u świń. Udało mi się znaleźć dawkę kwasu acetylosalicylowego *per os* dla świń 18-21 mg/kg m.c. z czego wynika, że Autorka użyła 5-krotnie wyższej dawki niż zalecana dla tego gatunku. To także wyższa dawka od maksymalnej zalecanej u ludzi (u dorosłych do 4 g/dobę, tj ok. 60 mg/kg m.c., a dzieci 1,5 g/dobę). Dlaczego? Naproxen – u ludzi maksymalna dawka dobowa wynosi ok 20 mg/kg m.c., dla świni znalazłem dawkę per os 20 mg/kg m.c., natomiast Autorka podawała *per os* dawkę 50 mg/kg m.c. dziennie, czyli 2,5-krotnie wyższą. Dlaczego? W końcu, indometacyna, klęska, brak informacji o dawkowaniu u świni. Autorka zaproponowała dawkę 10 mg/kg m.c. *per os*, szukając analogii znalazłem dawkowanie u człowieka 70-100 mg/kg m.c., czyli dawkę kilkukrotnie wyższą niż u badanych świń. W dodatku wiele ulotek informuje by nie stosować indometacyny u dzieci, a tak by trzeba było skwitować owe 20-kilogramowe loszki użyte do badań. Nie znajdując wytłumaczenia dawkowania ani we wstępie, ani w opisie metodyki ani w dyskusji, uważam, że to powinno znaleźć się na obronie pracy i zostać bardzo szczegółowo wyjaśnione. Odnośnie do czasu podawania, Autorka ustaliła czas podania preparatów na 28 dni, co w moim przekonaniu pozwoliło jej zaobserwować efekty adaptacji, tak jak wspominała w publikacjach. Opisy procedur histologicznych są podane modelowo. Przy okazji wyrażę także swoje uznanie co do wysokiej jakości obrazów mikroskopowych. To

widać z oczywistych względów dopiero przy przeglądaniu artykułów Autorki w sieci. Mam jeszcze jedną krytyczną uwagę - do możliwości precyzyjnego określenia kolokalizacji przy użyciu posiadanego sprzętu mikroskopowego i oprogramowania. Przy takich ograniczeniach sprzętowych raczej nie używałbym tu terminu „kolokalizacja".

W opisie wyników drażni „leczenie aspiryną" (str. 18, 20, 21) i dalsze, jest nawet m.in. na str. 27 i 32 o „suplementacji". Skoro Autorka opisuje doświadczenie, którego celem była aplikacja zdrowym zwierzętom badanego preparatu, a następnie określenie co się dzieje w tkankach po jego podaniu, to nie może to być określane jako leczenie. Skoro Autorka nie udowodniła niedoboru indometacyny czy pozostałych dwóch NLPZ w organizmie badanych świń, to nie może pisać o suplementacji! Pewne terminy są ściśle zdefiniowane i wolno je używać tylko zgodnie z ich definicją. Szkoda też, że w żaden sposób Autorka nie próbowała sparametryzować obrzęków i wybroczyn w błonie śluzowej powstających wskutek podania preparatów, co mogłoby dać możliwość porównywania wyników między grupami. Autorka określa precyzyjnie zmiany w ekspresji neuroprzekaźników – np. PACAPu na str. 20. Te zmiany to kilkanaście procent, poszukiwałem w części wyniki i w dyskusji (także w dołączonych publikacjach Autorki) odniesienia literaturowego oraz komentarza, czy to dużo, czy mało? Co taka kilkunastoprocentowa zmiana ekspresji możne znaczyć dla biologii jelitowego układu nerwowego i samego jelita. Ponadto, czy jest to efekt kumulacji z zatrzymania uwalniania przekaźnika, czy może raczej efekt podwyższenia jego syntezy wskutek adaptacji komórek stymulowanych do zwiększenia jego uwalniania? Byłoby niezmiernie interesujące przeczytać odpowiedzi na te pytania w dyskusji. Niezależnie od powyższych uwag krytycznych, oba rozdziały Wyniki oraz Dyskusja jak i korespondujące rozdziały artykułów naukowych wnoszą wiele cennych, oryginalnych informacji dla lepszego zrozumienia funkcjonowania jelitowego układu nerwowego podczas długotrwałego podawania trzech NLPZ. Takie długotrwałe dawkowanie, w znakomitej większości powodowało wzrost odsetka neuronów wykazujących ekspresję badanych neuroprzekaźników. Wyjątkiem był spadek ekspresji substancji P w grupie traktowanej naproxenem. Autorka tłumaczy to wyciszeniem reakcji zapalnej i rekonwalescencją (wolałbym tu użyć terminu „regeneracja") w okolicznych tkankach. To ciekawe spostrzeżenie i warte dalszych badań. Warto wspomnieć o prosekrecyjnym i pobudzającym motorykę jelita działaniu substancji P. Przy okazji zmian ekspresji galaniny, Autorka poddała pod dyskusję możliwość uszkodzenia neuronów śródściennych dwunastnicy długotrwałą aplikacją NLPZ. Trochę ryzykowne, skoro zwiększa się liczba neuronów w zwojach i wzrasta w nich ekspresja neuroprzekaźników. Mając skrawki, aż się prosi sprawdzić to na własnym materiale w kolejnych badaniach mikroskopowych np. z użyciem markerów uszkodzeń neuronów, apoptozy i innych form śmierci komórkowej, naprawy DNA, itp. Ciekawe poznawczo są wyniki z nierównomierną ekspresją nNOS w neuronach, obfitą w zwojach mięśniowych a skromniejszą w zwojach śluzówkowych, szczególnie w wewnętrznym (ISP), co sugeruje udział nNOS bardziej w regulacji funkcji skurczowych warstw mięśniówki dwunastnicy niż sekrecyjno-absorpcyjnych błony śluzowej. Część badanych tu neuropeptydów, VIP, PACAP i CART i jeszcze kilku innych (m.in., sekretyny, CCK, motyliny, greliny, leptyny i obestatyny), oceniałem swego czasu pod kątem ich wpływu na wydzielanie soku trzustkowego poprzez mechanizm z udziałem pośrednictwa jelitowego układu nerwowego i nerwów błędnych. Wyciągając wnioski z tamtych doświadczeń

zwróciłem uwagę na to, że nie działają one raczej samodzielnie, a wspólnie. Częściej w harmonii, ale w niektórych doświadczeniach trudno było w „bałaganie wyników" uchwycić wspólną myśl regulacyjną. Nawiązując do Dyskusji pracy, dobrze oceniam dyskusję poprowadzoną nad zachowaniem się poszczególnych neuroprzekaźników, to czego mi w dyskusji zabrakło to właśnie próby połączenia wyników ze sobą np. bardziej kompleksowej oceny w odpowiedzi na np. kwas acetylosalicylowy tych wszystkich badanych neuroprzekaźników łącznie.

Pracę kończy 6 wniosków wysnutych na podstawie osiągniętych wyników własnych i ich konfrontacji z dostępnymi danymi literaturowymi. Wnioski korespondują z celem pracy i nie budzą zastrzeżeń, poza kolejnym użyciem terminu suplementacja (wniosek V). Spis piśmiennictwa składający się z 95 pozycji został przygotowany starannie i według jednolitego schematu.

Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską lek. wet. Marty Brzozowskiej uważam, że Autorka pracy posiadła wymaganą znajomość warsztatu metodycznego badań na zwierzętach, pracy laboratoryjnej oraz technik mikroskopowych i analizy obrazu mikroskopowego. Doktorantka poza nabytymi umiejętnościami niezbędnymi w pracy eksperymentatorskiej, potrafi logicznie opisać i zinterpretować otrzymane wyniki. Uwagi krytyczne zawarte w recenzji nie umniejszają wartości naukowej dysertacji.

Mając powyższe na uwadze pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. wet. Marty Brzozowskiej pt. „Wpływ stanu zapalnego wywołanego podaniem kwasu acetylosalicylowego, naproksenu i indometacyny na kodowanie chemiczne neuronów jelitowego układu nerwowego dwunastnicy świni domowej" w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1669 ze zm.). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny nauki weterynaryjne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego wniosek o dopuszczenie lek. wet. Marty Brzozowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

R. Zabielski

Prof. Romuald Zabielski