Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu

Katedra Dietetyki
Zakład Żywienia Człowieka
41-808 Zabrze, ul.: Jordana 19, tel./fax: 32 275 51 95
e-mail: zzc@sum.edu.pl

Zabrze, 30.06.2023

Ocena rozprawy doktorskiej lek. dent. Agnieszki Ewy Stempniewicz, pt.:
" Leczniczy wpływ obestatyny na gojenie doświadczalnych uszkodzeń błony śluzowej jamy ustnej"

Obestatyna jest peptydem obecnym w surowicy krwi, głównie produkowanym w błonie śluzowej żołądka. Powstaje w ramach wewnątrzkomórkowych przemian potranslacyjnych z preprogreliny. Uważa się, że obestatyna wpływa między innymi na hamowanie pragnienia, hamowanie uwalniania wazopresyny, zmniejszanie lęku i poprawę pamięci oraz pogłębienie snu. W obrębie przewodu pokarmowego wykazano pobudzający wpływ obestatyny na czynność zewnątrzwydzielniczą trzustki. Ponadto wpływa na opróżnianie żołądkowe i motorykę jelit, a także czynność parakrynną i endokrynną trzustki. Prowadzone w ostatnich latach badania wykazują także, ochronne i lecznicze działanie obestatyny w uszkodzeniach przewodu pokarmowego. Obestatyna jest kodowana przez ten sam gen co grelina, składa się z 23 aminokwasów, jej konformacja jest stabilizowana przez grupę amidową na końcu C-terminalnym. Obestatyna, wykazuje działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne w różnych narządach ludzkiego ciała. W związku z tym, wpływ obestatyny na zapobieganie i leczenie różnych chorób stanowi istotny temat badań od kilku lat. Prewencyjny i leczniczy efekt obestatyny zaobserwowano m.in. w sercu, nerce czy mięśniach szkieletowych. Badania wykazały także, że obestatyna w cytowanych wykazuje

działanie ochronne i lecznicze, polegające między innymi na poprawie lokalnego przepływu krwi, zwiększeniu proliferacji komórek, redukcji prozapalnych czynników tj. IL1-β i TNF-α, redukcji leukocytozy i aktywności tkankowej mieloperoksydazy, redukcji stężęnia dialdehydu malonowego (MDA), a zwiększenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w tkankach. Obestatyna wykazuje także działanie antyapoptotyczne, które polega na aktywacji określonych szlaków sygnałowych.

Reaktywne formy tlenu (ROS) to silnie reaktywne chemiczne molekuły zawierające tlen. Powstają w warunkach fizjologicznych, jako produkt uboczny metabolizmu komórkowego i odgrywają bardzo istotną rolę w procesach biologicznych, takich jak sygnalizacja komórkowa, czy obrona immunologiczna. Jednak, produkowane w nadmiarze mogą uszkodzić komórki, ingerując w procesy przemian węglowodanów, lipidów, białek i DNA. W warunkach fizjologicznych organizm posiada naturalne mechanizmy obronne utrzymywania homeostazy w organizmie. ROS uszkadzają komórki na wielu płaszczyznach w wyniku procesu peroksydacji lipidów, a także białek i kwasów nukleinowych. Peroksydacja lipidów błony komórkowej prowadzi do zmian w jej strukturze i funkcji. Modyfikacja aminokwasów w białkach wywołuje zmiany w strukturze i funkcji tych białek. Uszkodzone białka akumulują się zaburzając funkcjonowanie komórek. W wyniku uszkodzenia DNA powstają mutacje, co prowadzi do śmierci komórek lub innych zaburzeń. Wśród organelli komórkowych szczególnie podatne na ROS są mitochondria z uwagi na ich aktywność metaboliczną. ROS uszkadzają DNA i białka mitochondrialne, zaburzając funkcje tych organelli, w tym przede wszystkim produkcję energii. Ponadto, ROS pełnią funkcje czynników sygnalizacyjnych, aktywują szlaki sygnalizacyjne, zawiadujące procesem apoptozy komórek. Nie mniej, organizm posiada mechanizmy obronne, w postaci czynników przeciwutleniających. Dzięki temu możliwe jest utrzymanie równowagi w komórce i zapobieganie uszkodzeniom w razie jej zaburzenia. Mechanizmy antyutleniające można podzielić na enzymatyczne i nieenzymatyczne. Systemy enzymatyczne, obejmują dysmutazę ponadtlenkową, katalazę i peroksydazę glutationową. Natomiast do systemów nieenzymatycznych należą przeciwutleniacze o niskiej masie cząsteczkowej, takie jak: witamina E, witamina C i beta-karoten, glutation, flawonoidy i koenzym Q10. Te antyoksydanty działają przez usuwanie wolnych rodników lub poprzez wzmacnianie aktywności enzymów antyutleniających. Ponadto organizm posiada mechanizmy naprawy, takie jak enzymy naprawiające DNA, które mogą naprawić uszkodzenia oksydacyjne komórek.

Błona śluzowa dziąseł zbudowana jest z nabłonka wielowarstwowego płaskiego, błony właściwej i przyzębia. W warstwie tej występują również komórki plazmatyczne, które produkują przeciwciała. Błona właściwa zawiera tkankę łączną i naczynia krwionośne, a przyzębie to tkanka łączna i włókna kolagenowe, które łączą dziąsło z kością. Oprócz tych trzech głównych warstw, błona śluzowa dziąsła zawiera również wiele komórek immunologicznych, które chronią przed infekcjami i stanami zapalnymi. główną funkcją jest ochrona zębów oraz tkanki kostnej. W okolicy warg i policzków również znajduje się nabłonek wielowarstwowy płaski a błona śluzowa zawiera liczne gruczoły łojowe. Z kolei podniebienie twarde i język to grubsza i bardziej elastyczna struktura, co ułatwia ruchy języka i połykanie. W tych obszarach występuje nabłonek jednowarstwowy płaski lub nabłonek jednowarstwowy walcowaty. Struktura błony śluzowej jamy ustnej różni się w zależności od lokalizacji. Poszczególne obszary jamy ustnej różnią się rodzajem i grubością warstw nabłonka co wynika z ich odmiennych funkcji. Nabłonek, który wyściela błonę śluzową jamy ustnej możemy ogólnie podzielić na nierogowaciejący i rogowaciejący. Komórki budujące nabłonek rogowaciejący, inaczej skeratynizowany, zawierają keratynę, która odpowiada za odporność na uszkodzenia mechaniczne. Występuje na dziąsłach i podniebieniu twardym.

W Katedrze Fizjologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, od wielu lat prowadzone są badania nad ochronną rolą różnorodnych czynników w doświadczalnych uszkodzeniach narządów układu pokarmowego. Obejmują one zagadnienia dotyczące miedzy innymi: wpływu obestatyny na rozwój eksperymentalnych wrzodów błony śluzowej żołądka i dwunastnicy, gojenie owrzodzeń jamy ustnej, przebieg ostrego doświadczalnego zapalenia trzustki.

W tym świetle temat podjęty przez Doktorantkę, którego celem była ocena czy podawanie obestatyny po uprzednim wywołaniu owrzodzeń błony śluzowej dziąseł i języka ma wpływ na proces gojenia tych zmian, jest, w opinii Recenzenta, bardzo interesujący i aktualny. Stanowi również konsekwentną kontynuację i rozwinięcie ważnego nurtu badawczego.

Pod względem formalnym praca obejmuje 98 stron edycji komputerowej z podziałem na typowe rozdziały.

We *Wstępie*, mającym wszelkie zalety pracy poglądowej, Doktorantka w sposób zwięzły i treściwy przedstawiła zagadnienia dotyczące błony śluzowej jamy ustnej, jej budowę, unaczynienie, a także informacje dotyczące ochronnego i leczniczego działania obestatyny oraz mechanizm działania Reaktywnych Form Tlenu. Znaczenie, działanie i własności enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów. Dużo

miejsca Doktorantka poświęca omówieniu możliwościom zapobiegania i leczenia zapalenia błony śluzowej jamy ustnej.

Analiza obecnego stanu wiedzy wykazała sprzeczne dane dotyczące roli obestatyny w gojeniu doświadczalnych uszkodzeń błony śluzowej jamy ustnej. Dlatego, Doktorantka sformułowała *6 zadań szczegółowych*, uwzględniając, między innym odpowiedzi na pytania:

1. Czy podawanie obestatyny wpływa na gojenie uszkodzeń błony śluzowej jamy ustnej?
2. Jaki jest wpływ obestatyny na rozwój stresu oksydacyjnego w trakcie powstawania i gojenia uszkodzeń jamy ustnej?
3. Czy podawanie obestatyny wpływa na przebieg uszkodzenia błony śluzowej jamy ustnej?
4. Czy podawanie obestatyny ma wpływ na przebieg stresu oksydacyjnego w przebiegu uszkodzenia błony śluzowej jamy ustnej?
5. Jakie mechanizmy odpowiadają za obserwowane zmiany?
6. Czy istnieją działania niepożądane lub przeciwwskazania do stosowania obestatyny w uszkodzeniach błony śluzowej jamy ustnej?

Rozprawa doktorska powstała w trakcie realizacji Środowiskowych Studiów Doktoranckich w ramach Projektu nr POWR.03.02.00-00-I013/16, "Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej" InterDokMed, realizowanych w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.
Badania zostały przeprowadzone zgodnie z protokołem zatwierdzonym przez I Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (uchwała NR 655/2022 z dnia 27 września 2022) oraz zatwierdzonym przez Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum projekcie badawczym (nr SAP N41/DBS/000397).

Badania przeprowadzono na 256 szczurach płci męskiej rasy Wistar, o masie ciała wynoszącej ok. 200-250 g. W trakcie badań zwierzęta były umieszczane w metalowych klatkach z drucianym dnem, aby zapobiec koprofagii. W pomieszczeniu utrzymywano temperaturę 22°C i wilgotność względną 50 ± 10% z 12-godzinnym cyklem światło-ciemność.

W dniu poprzedzającym operację pozorowaną lub wywołanie uszkodzeń błony śluzowej jamy ustnej, jak i przez 12 godzin w okresie pooperacyjnym, zwierzęta były głodzone z zachowanym stałym dostępem do wody. W pozostałych okresach miały

stały dostęp do wody i pokarmu. Karmione były standardowym granulatem zawierającym wszystkie niezbędne składniki pokarmowe.

Uszkodzenia błony śluzowej języka i dziąsła zostały wywołane za pomocą kwasu octowego. Przez kolejne 6 dni zwierzęta otrzymywały dwa razy dziennie sól fizjologiczną lub obestatynę w dawce 4, 8 lub 16 nmol/g/dawkę. Zwierzęta, u których nie wywoływano owrzodzeń, zostały poddane operacji pozorowanej a następnie przez 6 dni otrzymywały sól fizjologiczną. Pomiar przepływu krwi przez błonę śluzową i ocenę makroskopową przeprowadzano przez 6 kolejnych dni. Efekt przyspieszenia gojenia wrzodów osiągnął znamienność statystyczną, dla wszystkich zastosowanych dawek obestatyny, ale dawki 8 i 16nmol/kg/dawke wywołały podobny znacznie silniejszy efekt.

W rozdziale *Wyniki badań,* Doktorantka zamieściła omówienie kolejnych etapów swojej pracy. Na podstawie rycin przedstawiono wyniki wpływu podawania obestatyny na gojenie przewlekłych wrzodów błony śluzowej jamy ustnej, na przepływ krwi w błonie śluzowej jamy ustnej. Wpływ obestatyny na parametry stresu oksydacyjnego, na stężenie pro-zapalnej interleukiny-1β oraz ocenę makroskopową i histologiczną. Efektom terapeutycznym towarzyszyły zmiany parametrów w błonie śluzowej dziąsła i języka: spadek poziomu interleukiny 1β, zwiększenie przepływu krwi, zmniejszenie aktywność MPO, zwiększenie aktywności SOD oraz spadek stężenia MDA.

Uzyskane, przez Doktorantkę wyniki świadczą o ochronnym i leczniczym wpływie peptydów kodowanych przez gen greliny na rozwój i przebieg zapalenia błony śluzowej jamy ustnej, w zastosowanym modelu badawczym. Obserwacje te wskazują na potencjalną możliwość zastosowania obestatyny w leczeniu zapalenia błony śluzowej jamy ustnej w warunkach klinicznych.

W *Dyskusji* Doktorantka analizuje wyniki własnych badań i konfrontuje je z danymi zawartymi w piśmiennictwie, w sposób wskazujący na znajomość przedmiotu i krytyczne podejście do obu źródeł informacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto 8 *Wniosków*, znajdujących podstawę w przedstawionych wynikach znacznie, wzbogacając naszą wiedzę na badany temat. Doktorantka wyciągnięte przez siebie wnioski ujmuje w streszczeniu w sposób bardziej syntetyczny, co moim zdaniem jest korzystniejsze. Autorka stwierdza, że obestatyna wykazuje efekt leczniczy, łagodzi przebieg i przyspiesza gojenie owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej. Efekt ten jest związany z przeciwzapalnym działaniem obestatyny w mechanizmie śluzówkowego zmniejszenia stężenia interleukiny 1β, zmniejszenia aktywność mieloperodsydazy oraz zwiększenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w błonie śluzowej jamy ustnej.

Czytelnik nie ma wątpliwości jaki był zakres badań i zastosowane przez Doktorantkę metody analizy statystycznej.

Treść przedstawionego rozdziału potwierdza bardzo dobre i dokładne przygotowanie Doktorantki do podjęcia pracy naukowej. Jest odpowiedzialna i świadoma wartości swojej pracy.
Cytowane *Piśmiennictwo* jest starannie dobrane i pochodzi głównie z ostatnich lat.

Po gruntownym zapoznaniu się z całością. pracy, mogę z pełnym przekonaniem stwierdzić, że nie mam żadnych istotnych uwag krytycznych mogących podważyć jej wartość.
Z obowiązku Recenzenta zgłaszam drobne uwagi dotyczące błędów literowych, stylistycznych lub wynikających z automatycznej korekty przez program komputerowy. Praca jest napisana przejrzyście, a samo opracowanie wykonane bardzo estetycznie. Dobrze oceniam zarówno koncepcję badań, ich wykonanie, jak i interpretację uzyskanych wyników.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska lek. dent. Agnieszki Ewy Stempniewicz pt.: „Leczniczy wpływ obestatyny na gojenie doświadczalnych uszkodzeń błony śluzowej jamy ustnej" spełnia wszystkie wymogi określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, stawiane rozprawom doktorskim. Mam przyjemność wnioskować do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego, o dopuszczenie lek. dent. Agnieszki E. Stempniewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto uważam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja doktorska stanowi wkład Doktorantki w zagadnienia związane z poszukiwaniem rozwiązań dotyczących ochronnego i leczniczego działania obestatyny w eksperymentalnych modelach uszkodzenia błony śluzowej jamy ustnej, dlatego wnoszę ***o wyróżnienie pracy.***

dr hab. n. med. Renata Polaniak