Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Dr. hab. Bernadeta Szewczyk, prof. IF PAN
Zakład Neurobiologii
ul. Smętna 12
31-343 Kraków

Kraków 28.08.2023 r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Jaros
pt. „Ocena aktywności przeciwzapalnej cynkowych pochodnych kwasów ksantonylooksyalkanowych"
wykonanej pod opieką promotora Pana dr hab. n. farm. Tadeusza Librowskiego, prof. UJ

Tematyka pracy. Przewlekły stan zapalny jest obserwowany w przebiegu wielu schorzeń. Jest czynnikiem rozwoju chorób serca, cukrzycy, chorób autoimmunologicznych, nowotworowych. Stosowane powszechnie niesteroidowe leki przeciwzapalne obok niewątpliwych korzyści wywołują działania niepożądane, szczególnie ze strony przewodu pokarmowego i układu krążenia. Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Anny Jaros wpisuje się w trendy badawcze poszukiwania nowych skuteczniejszych i pozbawionych efektów ubocznych leków przeciwzapalnych. Doktorantka oceniła w swojej pracy przeciwzapalne własności cynkowych pochodnych kwasów ksantonylooksyalkanowych w odniesieniu do macierzystych związków jak również wybranych leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Połączenie cynku i kwasów ksantonylooksyalkanowych w formę kompleksu w celu zwiększenia efektywności działania i ograniczenia występowania skutków ubocznych stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego a otrzymane wyniki mają potencjał translacyjny.

Strona edytorska. Praca liczy 110 stron. Treść rozprawy została podzielona na 8 rozdziałów (wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, bibliografia oraz spis rycin i tabel). Praca zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów. Bibliografia zawiera 136 pozycji literaturowych. Praca została zilustrowana 48 rycinami. W pracy zostało również zamieszczonych 6 tabel. Praca została przygotowana starannie graficznie jednak zawiera pewne błędy językowe.

Wstęp. Wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie w tematykę rozprawy doktorskiej. Doktorantka podzieliła wstęp na trzy główne części. W pierwszej części opisała fizjologiczną rolę cynku; scharakteryzowała białka odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy cynku; rolę cynku w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego i immunologicznego; procesach zapalnych; mechanizmach działania antyoksydacyjnego. W drugiej części omówiła budowę i właściwości ksantonów oraz ich pochodnych. Wspomniała również o potencjale antyoksydacyjnym, przeciwzapalnym i przeciwnowotworowym tych związków. Trzecia część została poświęcona charakterystyce procesów zapalnych w tym mediatorów zapalenia oraz działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Ryciny i schematy w tym rozdziale stanowią wartościowe uzupełnienie tekstu.

Wstęp jest obszerny i świadczy o dużej znajomości literatury przedmiotu i wiedzy ogólnej Doktorantki, jednak niektóre rozdziały czy podrozdziały są zbyt szczegółowe i nieco odbiegające od tematyki rozprawy jak choćby fragmenty wstępu dotyczące struktury i funkcji palców cynkowych czy aktywności przeciwnowotworowej pochodnych ksantonowych.

Cel rozprawy. Głównym celem rozprawy było określenie aktywności przeciwzapalnej cynkowych pochodnych kwasów ksantonylooksyalkanowych. Dla zrealizowania w/w celu zostały wybrane modele *in vitro* oraz *in vivo*. Doktorantka wyznaczyła sobie sześć celów szczegółowych. Pytania badawcze zostały postawione prawidłowo. W moim odczuciu, w tym rozdziale brakuje jedynie krótkiego uzasadnienia wyboru w/w celu badań.

Materiały i metody. Doktorantka przebadała własności pięciu cynkowych pochodnych kwasów ksantonylooksyalkanowych (MH-106, MH-107, MH-108, MH-109 oraz MH-110). Naproksen, ketoprofen zostały wybrane jako związki referencyjne. Doktorantka wykonała badania *in vitro* z wykorzystaniem czterech linii komórkowych (mysich komórek mikrogleju BV-2, ludzkich nowotworowych hepatocytów HepG2, mysich makrofagów RAW 164.7 oraz mysich embrionalnych fibroblastów 3T3-L1). Badania *in vitro* obejmowały ocenę: a) cytotoksyczności badanych związków; b) poziomu tlenku azotu; c) poziomu reaktywnych form tlenu; d) poziomu ekspresji wybranych genów oraz białek. W badaniach *in vivo* Doktorantka sprawdziła: a) działanie przeciwobrzękowe; b) działanie przeciwbólowe oraz potencjalne działanie uszkadzające błonę śluzową żołądka badanych substancji.

Opis procedur i czynności przeprowadzonych badań zarówno *in vitro* jak i *in vivo* jest szczegółowy i nie ma wątpliwości, że Doktorantka w pełni opanowała warsztat badawczy oraz że wszystkie eksperymenty zostały wykonane prawidłowo. Uwagi do tego rozdziału: a) rozdział 3.2 zamiast hodowle komórkowe powinien być zatytułowany „Eksperymenty *in vitro*" gdyż hodowle komórkowe były narzędziem w tych eksperymentach, b) brak wyjaśnienia dlaczego w eksperymentach *in vivo* stosowane były zarówno podania dożołądkowe i dootrzewnowe badanych związków, c) dawki stosowanych związków w przypadku podania dożołądkowego podane są w mg/mg m.c. podczas gdy w przypadku podania dootrzewnowego w mg/kg m.c. i jeśli to nie błąd edytorski to dawki bardzo się od siebie różnią- ta kwestia wymaga wyjaśnienia, d) brak informacji

wskazujących skład ilościowy cynku oraz kwasów ksantonylooksyalkanowych w badanych kompleksach.

Wyniki. Badania *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych wykazały z jednej strony brak działania cytotoksycznego badanych związków a z drugiej, wysoki potencjał antyoksydacyjny (zmniejszenie ilości tlenku azotu oraz reaktywnych form tlenu) oraz przeciwzapalny [zmniejszenie poziomu prozapalnych białek COX-2, cPGES, receptora FP, TLR4, obniżenie ekspresji genów kodujących COX-2 (*Ptgs2*) i PA2 (*Pla2g4a*)]. We wszystkich komórkach zaobserwowano wzrost poziomu Nrf2 co dodatkowo świadczy o potencjale antyoksydacyjnym badanych związków. Wyniki otrzymane z badań *in vivo* potwierdziły aktywność przeciwzapalną cynkowych pochodnych kwasów ksantonylooksyalkanowych oraz wykazały ich potencjał przeciwbólowy przy czym efekty te były zróżnicowane w zależności od badanego związku. Otrzymane wyniki pokazały również, że zastosowane cynkowe pochodne kwasów ksantonylooksyalkanowych nie uszkadzają śluzówki żołądka co zwiększa ich potencjał terapeutyczny.

Wyniki zostały przedstawione w formie tabel i wykresów. Legendy do tabel i rycin są czytelne i zawierają podstawowe informacje pozwalające na swobodną analizę przedstawionych wyników. Niestety w tej części rozprawy pojawia się najwięcej błędów. Odniosę się tylko do wybranych. W opisie tabeli 5 znajduje się informacja, że komórki HepG2 były inkubowane m.in. z naproksenem i ketoprofenem podczas gdy w tabeli podane są wartości oceny żywotności komórek dla astemizolu ale nie w/w leków. Na niektórych wykresach zabrakło oznaczeń wskazujących statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami (ryc. 9, 10) a na niektórych (ryc. 12-15) istotności zostały oznaczone wybiórczo. W opisie wyników na stronie 57 i 61 Doktorantka pisze o wpływie cynkowych pochodnych kwasów ksantonylooksyalkanowych podczas gdy badany był tylko jeden związek MH-109. W opisie do rycin 28-29 Doktorantka wymienia poziomy istotności statystycznej vs kontrola ale na wykresie zaznaczone są również równice pomiędzy dawkami związku MH-106 w drugiej godz. działania.

Dyskusja. Dyskusja zawiera podsumowanie otrzymanych wyników oraz ich interpretację w świetle dostępnych danych z literatury przedmiotu. Doktorantka na ich podstawie zbudowała hipotezy dotyczące mechanizmu działania przeciwzapalnego cynkowych pochodnych kwasów ksantonylooksyalkanowych. Wskazała również na mechanizmy, które wpływają na korzystniejsze działanie badanych związków w stosunku do leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Sposób prowadzenia dyskusji świadczy o dużej łatwości w analizowaniu wyników oraz znajomości literatury przedmiotu przez Doktorantkę. Zabrakło jednak kilku zdań konkluzji, podsumowujących opisane w pracy badania jak również wcześniejsze badania zespołu na temat potencjalnej wyższości badanych pochodnych cynkowych kwasów ksantonylooksyalkanowych w odniesieniu do działania samego cynku czy samych kwasów, jak również możliwości ich zastosowania. Myślę, że obrona pracy będzie dobrym momentem do wyrażenia własnej opinii Doktorantki na ten temat.

Podsumowanie. Doktorantka trafnie wybrała najistotniejsze wyniki uzyskane z badań *in vitro* oraz *in vivo*. Podkreśliła, że badane związki wykazują własności przeciwzapalne oraz przeciwbólowe ale nie wykazują własności ulcerogennych co zwiększa ich potencjalne zastosowanie terapeutyczne. Autorka wskazała również na działanie antyoksydacyjne jako potencjalny mechanizm odpowiedzialny za w/w aktywność badanych związków. Podsumowanie jest zwięzłe i bardzo merytoryczne i wskazuje na dużą samodzielność Doktorantki w analizie i interpretacji otrzymanych wyników. Wartościowym uzupełnieniem podsumowania byłoby bardziej wyraźne wskazanie związków, które w większości testów wykazywały najlepsze efekty i mogą stanowić tzw. bazę do poszukiwania nowych kompleksów o większym potencjale farmakologicznym. Doktorantka otrzymała wiele wyników, wartością dodaną tego podrozdziału byłaby również tabela podsumowująca uzyskane wyniki.

Bibliografia. Doktorantka powołała się na 136 pozycji naukowych z czego w samej dyskusji odwołała się do ponad 50 doniesień. Świadczy to o dużej umiejętności wykorzystania przez Autorkę literatury przedmiotu. Publikacje z ostatnich 10 lat stanowią prawie 60% całości literatury i zostały dobrane prawidłowo.

Podsumowując, stwierdzam iż praca doktorska mgr Anny Jaros ma charakter nowatorski. Badania są oryginalnym rozwiązaniem problemu, jakim jest znalezienie skutecznych i w pełni bezpiecznych leków przeciwzapalnych i przeciwbólowych. Badania zostały wykonane z wykorzystaniem wielu testów, modeli i metod co wskazuje na znaczne umiejętności badawcze Doktorantki i potwierdza jej umiejętności w samodzielnym prowadzeniu pracy naukowej. Całościowo, treść rozprawy wskazuje na ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauki farmaceutyczne i medyczne. Warto również zwrócić uwagę na fakt, iż jest ona współautorem 13 publikacji naukowych co stanowi znaczne osiągnięcie jak na młodego naukowca.

Wymienione powyżej uwagi i sugestie, czy wskazane błędy nie zmieniają mojej pozytywnej oceny pracy.

W mojej opinii rozprawa doktorska Pani mgr Anny Jaros spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r., poz. 1789 z późn. zm. W związku z tym zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki farmaceutyczne UJ o dopuszczenie mgr Anny Jaros do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

B. Szewczyk

Dr hab. Bernadeta Szewczyk, prof. IF PAN