

Prof. dr hab. Krystyna Koziec  
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt  
Uniwersytet Rolniczy  
Kraków

### Recenzja

rozprawy doktorskiej pt **"Wpływ jonów cynku na aktywność niektórych niesterydowych leków przeciwzapalnych (NLPZ)"** wykonanej przez Panią mgr **Magdalenę Jarosz** w Zakładzie Radioligandów Katedry Farmakobiologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum pod kierunkiem Promotora **Pana dr hab. Tadeusza Librowskiego, prof.UJ** oraz Promotora pomocniczego **Panią dr hab. Katarzynę Młyniec**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne stawiane tego rodzaju dziełom naukowym; stanowi zbiór pięciu publikacji opatrzonych obszernym opisem celu, metodyki i wyników. Wszyscy współautorzy publikacji (w liczbie 20) złożyli odpowiednie oświadczenia o istotnym udziale Doktorantki w planowaniu eksperymentów, ich wykonaniu i interpretacji wyników. Publikacje zostały wydane w latach 2013-2017, w czterech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem.

Niesteroidowe leki przeciwzapalne, których działanie jako inhibitorów cyklooksygenazy prostaglandynowej, zostało scharakteryzowane przez Johna Vane ponad 45 lat temu, są grupą specyfików przeciwzapalnych, przeciwbólowych i przeciwgorączkowych. Należy jednak podkreślić, że pomimo ogromnych zalet, leki te mogą wywołać różne skutki uboczne wynikające nie tylko z zahamowania bądź całkowitego wyeliminowania fizjologicznie aktywnych prostaglandyn i tromboksanów, ale także z bezpośredniego działania miejscowego. Dotyczy to przede wszystkim układu krwionośnego oraz przewodu pokarmowego, gdzie długotrwałe stosowanie NLPZ może wywołać uszkodzenia komórek, a nawet zmiany krwotoczne. Ze względu na różnorodność tych preparatów, powszechną dostępność i niestety, także propagowanie tylko ich zalet, nastąpiło niekontrolowane nadużywanie leków nawet przez dzieci i osoby w podeszłym wieku.

Naukowcy z wielu ośrodków badawczych wciąż poszukują nowych form tych leków i zwracają większą uwagę na konieczność zmniejszania ich dawek oraz jednoczesne stosowanie preparatów ochronnych. Jednym z takich preparatów może być cynk, niezbędny w wielu procesach fizjologicznych, a w ostatnich latach będący wszechstronnie badany. Jednak, wyniki badań opublikowanych w najnowszych pracach wyraźnie wskazują na konieczność starannego doboru formy i dawki podawanego specyfiku, którego nadmiar może powodować utratę miedzi i często przyczynić się do zwiększonej zawartości potencjalnie szkodliwych metali w organizmie.

Dlatego też uznaję podjęcie przez Panią mgr Magdalenę Jarosz próby poznania i oceny skutków podawania NLPZ oraz ochronnego działania preparatów cynku za istotne i

mogące przyczynić się poszerzenia wiedzy o ich działaniu w różnych procesach fizjologicznych.

Pani mgr Jarosz postawiła sobie za cel zbadanie wszechstronnego działania cynku w organizmie szczurów traktowanych różnymi niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ).

Zrealizowanie tego celu Doktorantka oparła na kilku eksperymentach, logicznie zaprojektowanych, których wyniki miały ocenić wpływ cynku na:

1. osłabienie stopnia indukowanego procesu zapalnego;
2. potęgowanie przeciwbrzękowego i przeciwbólowego działania ketoprofenu, ibuprofenu i naproksenu;
3. łagodzenie gastrotoksycznego działania tych leków;
4. porównanie działania cynku podawanego w formie mieszanek z lekami z efektem wywołanym przez zsyntetyzowane kompleksy cynku i ibuprofenu oraz cynku i naproksenu;
5. ocenę stopnia akumulacji przewlekle stosowanego cynku w surowicy krwi i zmineralizowanych fragmentach żołądka.

Wszystkie eksperymenty zostały wykonane z użyciem modelu zwierzęcego szczurów szczepu Wistar pochodzących z certyfikowanej hodowli. Należy podkreślić, że zwierzęta były w okresie wzrostu, a więc ewentualne zmiany wywołane stosowanymi preparatami mogły być szybko zauważone. Preparaty cynku oraz kompleksy Zn i leków NLPZ podawane były różnymi drogami: dożołądkowo i dootrzewnowo, w dawkach od 14,37 do 60 mg/kg, jednorazowo, 3-4 krotnie, lub przewlekle przez 14 dni. Badano działanie trzech NLPZ - ketoprofenu ( w 3 dawkach), ibuprofenu i naproksenu w jednej dawce.

Kompleksy cynku i ibuprofenu oraz cynku i naproksenu przygotowano w Zakładzie Chemii Bioorganicznej UJ CM uzyskując 2 mole związków wyjściowych na 1 mol cynku, weryfikację uzyskanych związków przeprowadzono przy użyciu analizy krystalograficznej.

Pani mgr Jarosz zastosowała kilka sprawdzonych, uznanych metod do oceny reakcji przeciwbólowej, przeciwbrzękowej i przeciwwrzodowej u szczurów traktowanych różnymi czynnikami doświadczalnymi.

Działanie przeciwbólowe oceniano stosując metodę Randalla i Sellitto w teście karageninowym, w którym stopień reakcji bólowej określa się po wystąpieniu odruchu cofania i/lub wokalizacji. Działanie przeciwbrzękowe oceniano metodą Wintera i wsp. w teście karageninowym w ciągu 4 godzin. Działanie gastrotoksyczne stosowanych specyfików badano przy użyciu metody Komatsu i wsp. po upływie 24 godzin od testu karageninowego, stosując sześciopunktową skalę do oceny stopnia uszkodzenia błony śluzowej i zmian w unaczynieniu ścian żołądka. Dodatkowo, Autorka podjęła trud określenia stężenia Zn w surowicy krwi oraz w zmineralizowanej tkance żołądka po przedłużonym podawaniu preparatu cynku. Badania te wykonano przy użyciu techniki atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu F-AAS.

Pani mgr Jarosz oceniała efekty stosowanych leków, cynku i kompleksów cynku z lekami w zależności od dawki, czasu i sposobu podawania.

Użyte metody są sprawdzone i odpowiednie do oznaczeń badanych parametrów. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie nowoczesnej metody AAS i częściowo zmodyfikowanej metody analitycznej Sadlika i wsp.

*Ze względu na wcześniejszą ocenę uzyskanych wyników przez recenzentów każdej z pięciu publikacji nie będę ich ponownie dogłębnie analizować. Uznaję jednak za stosowne pozytywnie zaopiniować cały zbiór prac, których dobór jest logiczny i wystarczający do określenia ważności problemu naukowego stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej. Pozytywnie oceniam także metody wybrane do osiągnięcia założonego celu naukowego.*

### **Krótkie podsumowanie osiągniętych wyników opublikowanych w kolejnych pracach naukowych**

W pierwszej publikacji zatytułowanej "Influence of zinc hydroaspartate on the anti-inflammatory and gastric activity of ketoprofen in rats" Gawęł M. i wsp., Pharmacol. Rep. 2013, stwierdzono, że cynk podawany przez krótki czas wspomagał przeciwobrzękowe, przeciwbólowe działanie ketoprofenu. Ponadto, zasugerowano ochronne działanie cynku podawanego dożołądkowo i dootrzewnowo na śluzówkę żołądka.

W drugiej publikacji pt. "Chronic treatment with zinc hydroaspartate induces anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activity in rats", Gawęł i wsp., Pharmacol.Rep.2014, potwierdzono przeciwrzodowe (ochronne) i przeciwzapalne działanie chronicznie podawanego preparatu cynku łącznie z ketoprofenem. Praca demonstrowała także odpowiednio zilustrowane zmiany w śluzówce żołądka oraz wyniki dotyczące braku wzrostu stężenia Zn w surowicy krwi i fragmentach zmineralizowanego żołądka.

W trzeciej publikacji Doktorantka nie była pierwszym autorem, ale opisane wyniki dotyczyły porównania skutków podawania preparatów cynku i ketoprofenu przez 14 i 28 dni. Wbrew oczekiwaniom, przedłużenie podawania tych związków o 14 dni nie zwiększyło obserwowanych skutków w porównaniu do efektów obserwowanych w krótszym czasie podawania preparatów. Autorzy zadali pytania dotyczące przyczyn takich rezultatów, ale kierowali swoje zainteresowania raczej w stronę poszukiwania innych preparatów cynku i modeli doświadczalnych. Szkoda, że nie próbowano skupić się bardziej na poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie o nadmierną akumulację metalu lub brak obniżenia stopnia wchłaniania cynku, a co za tym idzie zmianami między innymi w aktywności wybranych enzymów i/lub zaburzeniu stosunku Zn/Cu. Praca została opublikowana pt. "Differential effects of zinc supplementation on the anti-inflammatory activity of ketoprofen in rats", Lipkowska A., Gawęł M., i wsp. Acta Biol.Cracov. ser Zool. 2014.

W 2017 roku w Inflammopharmacology ukazała się praca przeglądowa pt. "Antioxidant and antiinflammatory effects of zinc. Zinc dependent NF-kB signaling" autorstwa Jarosz i wsp. Będąc pierwszym autorem tej pracy przeglądowej, Doktorantka udowodniła swoją szeroką wiedzę dotyczącą aktywności i znaczenia biologicznego cynku na poziomie ustrojowym, narządowym i komórkowym. W interesujący sposób przedstawiono udział cynku w mechanizmach antyoksydacyjnych i interakcji z innymi związkami zaangażowanymi w te procesy. Należy podkreślić odpowiedni wybór procesów i adekwatny do nich dobór publikacji począwszy od klasycznych opracowań sprzed półwiecza, a skończywszy na tych z ostatnich lat.

Także w tym roku, 2017, Doktorantka wraz ze wsp. opublikowała w *Inflammopharmacology* piątą pracę pt. "Evaluation of anti-inflammatory and ulcerogenic potential of zinc-ibuprofen and zinc-naproxen complexes in rats", w której porównano w/w efekty cynku podawanego w formie kompleksów lub mieszanek z NLPZ. Interesującym jest wykazanie istotnego efektu przeciwrzodowego kompleksów cynku z lekami po jednorazowej suplementacji. Natomiast podany związek cynku po trzykrotnym zastosowaniu ibuprofenu i naproksenu (czyli w formie mieszanek) był bardziej skuteczny niż w formie kompleksów. Należy także podkreślić istotne, z punktu widzenia potencjalnego pacjenta, wysnute wnioski o możliwości zmniejszenia dawki z jednoczesnym wzrostem efektywności podawanych preparatów.

Tak jak i w innych pracach, nasuwa się myśl, aby wreszcie ujednoczyć definicję czasu stosowania czynnika eksperymentalnego-subchronicznego, przewlekłego, chronicznego. Pani mgr Jarosz używa sformułowania „subchroniczny” do podawanych 3-4 dawek, a „chroniczny” do 14-dniowego suplementowania cynku bądź leków. Według innych autorów 3-4 dawki nie powinny być określane jako subchroniczne stosowanie. Podobnie też, stosowanie leku/czynnika do 14 dni powinno określać się raczej terminem –„przedłużone”. Dopiero dłuższe, ponad czternastodniowe doświadczenie może być traktowane jako chroniczne. Ale dyskusje na ten temat trwają od lat i wciąż naukowcy z różnych dziedzin stosują zróżnicowaną nomenklaturę. W przypadku leków przeciwbólowych, przeciwzapalnych, których stosowanie jest zalecane dla pacjentów nieraz przez wiele lat dobrze byłoby wyraźnie określić jakie znaczenie ma termin „chroniczne stosowanie”.

Po dokładnej analizie wszystkich wyników można wysnuć następujące wnioski:

1. Preparaty cynkowe wspomagają procesy leczenia wrzodów przewodu pokarmowego prawdopodobnie poprzez zmniejszanie wydzielania kwasu solnego, poprawiają syntezę metalotionein i prostaglandyny PGE<sub>2</sub>;
2. Cynk wykazywał różny stopień efektu protekcyjnego i wspomagał aktywność wybranych NLPZ w zależności od drogi podawania, dawki i czasu działania;
3. Suplementacja cynku może zabezpieczyć odpowiedni poziom tego metalu niezbędnego w procesach antyoksydacyjnych oraz modulowaniu układu immunologicznego i endokrynnego;
4. Wyniki prezentowanych eksperymentów wyraźnie wskazują na szybki metabolizm podawanych preparatów cynkowych, które nie zostały zakumulowane w organizmie szczurów;
5. Należy dokładnie zbadać procedurę podawania kompleksów bądź mieszanin cynku z przeciwzapalnymi lekami i uzależnić ją od czasu podawania leków;
6. Dokładna ocena przemian zachodzących w organizmie po podawaniu cynku i NLPZ może być przydatna w prewencji i łagodzeniu skutków ubocznych leków.

Podsumowując, uważam rozprawę doktorską za oryginalną, o uznanej wartości poznawczej, wnosząca interesujące i unikatowe wyniki do pełniejszego poznania roli cynku w modulowaniu pozytywnych i negatywnych skutków stosowania NLPZ.

Ponadto, wnioski wysnute przez Doktorantkę w każdej publikacji mogą być pomocne dla dobrania odpowiednich dawek, formy i czasu podawania farmaceutyków, co będzie istotne zarówno z medycznego jak i ekonomicznego punktu widzenia. Dlatego też pozytywnie oceniam wysiłek Doktorantki i Promotorów włożony w prowadzenie eksperymentu, analiz z użyciem nowoczesnej aparatury i przygotowanie kilku publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Uwagi, które umieściłam w recenzji wynikały z obowiązku recenzenta, nie umniejszają one mojej pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej

**Uważam, że oceniana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie nr 595 o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych oraz Tytule i Stopniach Naukowych w Dziedzinie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U.Nr 65 z dnia 14.04.2003r.) wraz z późniejszymi zmianami.**

**Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum z prośbą o dopuszczenie mgr Magdaleny Jarosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Biorąc pod uwagę nowatorskie podejście do roli Zn w modulowaniu aktywności wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych, kompleksowość zagadnień objętych badaniami, których wyniki stanowią podstawę rozprawy doktorskiej, pracowitość, staranność oraz umiejętność współpracy z innymi ośrodkami naukowymi poddaję pod obrady Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego wniosek o wyróżnienie niniejszego dzieła naukowego.

*Magdalena Jarosz*

*Kraków 14.06.2017 r.*