

Warszawa, 31 lipca 2018r.

Dr hab. Michał Jank
Zakład Farmakologii i Toksykologii
Katedra Nauk Przedklinicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. wet. Dagmary Gadomskiej
pt. „Badania nad aktywnością przeciwnowotworową suszu z papryczek
habanero, zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* u
psów”.**

Rozprawa doktorska lek. wet. Dagmary Gadomskiej została przedstawiona do recenzji w postaci 91-stronicowej wersji drukowanej formatu A4 w sztywnej oprawie. Dysertacja przygotowana została w języku polskim, jej układ jest tradycyjny i zawiera spis treści, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, bibliografię oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozprawa zawiera 14 rycin, 12 tabel oraz 81 pozycji piśmiennictwa. Pod względem językowym praca napisana jest jasno i poprawnie.

Przedmiotem złożonej do recenzji pracy jest ocena aktywności przeciwnowotworowej suszu z papryczek habanero w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* u psów. Badania przeprowadzono w dwóch układach badawczych – *in vitro* na liniach komórkowych kostaniakomiesaka psów DAN i D-17 oraz *in vivo* na sukach z chorobą nowotworową gruczołu sutkowego.

O potrzebie prowadzenia badań nad farmakoterapią chorób nowotworowych nie trzeba nikogo przekonywać, a strategie leczenia onkologicznego stanowią obecnie przedmiot zainteresowań wielu ośrodków naukowych na całym świecie. Onkologia w medycynie weterynaryjnej przez wiele lat była traktowana jako potencjalny model do badań nad fizjologią i terapią guzów nowotworowych, jednak ogromne zmiany, jakie zaszły w podejściu człowieka do psów i kotów w ostatnich latach sprawiły, że stała się ona zagadnieniem samym w sobie i obecnie leczenie chorób nowotworowych u zwierząt towarzyszących jest bardzo ważnym i wymagającym elementem praktyki lekarsko-weterynaryjnej. Występowanie chorób nowotworowych u psów, w zależności od regionu świata, szacowane jest na od 200 do około 800 przypadków na 100 000 psów na rok. O ile jednak badania nad nowotworami u ludzi pochłaniają ogromne środki, prowadząc często do opracowywania stosunkowo kosztownych terapii celowanych, to w medycynie weterynaryjnej nakłady przeznaczone na onkologię są znacznie mniejsze, a dostępność nowoczesnych terapii przeciwnowotworowych jest ograniczona. Mimo tego właściciele zwierząt chorujących na choroby nowotworowe bardzo często kierując się związkiem emocjonalnym z własnym zwierzęciem starają się zrobić wszystko, co w ich mocy, aby przynajmniej podjąć próby leczenia nowotworu u własnego psa lub kota. Oczywiście wiodącą metodą terapii nowotworów u psów przez wiele lat była chirurgia, co częściowo było na pewno związane z stosunkowo częstym występowaniem nowotworów gruczołu sutkowego u suk, które usuwano chirurgicznie. Coraz częstsze wykorzystanie chemioterapii oraz radioterapii w weterynarii sprawiło jednak, że znacznie częściej są leczone obecnie nowotwory, takie jak choćby chłoniaki. W chemioterapii jednak najczęściej wykorzystywane są leki rejestrowane dla ludzi, a nie dla zwierząt, a jak dotychczas jedyną substancją czynną zarejestrowaną do leczenia konkretnego guza u psów jest masetynyb, przeznaczony do leczenia konkretnego rodzaju guza z komórek tucznych u

psów. Nie jest więc niczym zaskakującym, że stale prowadzone są poszukiwania innych substancji czynnych, których działanie przeciwnowotworowe u zwierząt będzie potwierdzone i zapewni co najmniej poprawę jakości życia leczonych pacjentów.

W tego rodzaju poszukiwania należy wpisać badania przeprowadzone przez lek. wet Dagmarę Gadomską, która postanowiła zweryfikować potencjalne działanie przeciwnowotworowe substancji czynnych znajdujących się w suszu z papryki habanero. Mając na uwadze, że w największych ilościach w papryce tej występuje kapsaicyna, stała się ona domyślnie główną substancją czynną znajdującą się w ocenianym surowcu, chociaż już na samym początku należy podkreślić, że badania składu ekstraktu z suszu przeprowadzone przez Doktorantkę wykazały, że znajdowało się w nim także kilka innych kapsaicynoidów, w tym dihydrokapsaicyna i to w ilości 75% kapsaicyny. W efekcie nie można surowca pochodzącego z papryki habanero rozpatrywać wyłącznie jako źródła kapsaicyny. Tym bardziej, że jak to zauważyła w swych badaniach Doktorantka, aktywność ekstraktu z suszu jest wyższa niż samej, czystej kapsaicyny. A to sugeruje aktywność także innych substancji czynnych znajdujących się w ekstrakcie. W opinii recenzenta jednak Doktorantka nie ustrzegła się kilku nieścisłości związanych z nazewnictwem substancji będącej przedmiotem badań. W tekście pracy jako źródło ocenianego surowca pojawia się najczęściej określenie papryczka habanero (*Capsicum chinense*), chociaż istnieją także określenie papryka habanero lub papryka chili. Nazwa polska *Capsicum chinense* to papryka habanero i chyba ta nazwa powinna funkcjonować w całej pracy. Precyzja nazewnictwa jest niezwykle istotna z punktu widzenia formalnej strony prowadzonych badań. Zakładając bowiem, że docelowo oceniana substancja ma być wprowadzona na rynek jako karma (mieszanka paszowa – jak podano w tabelach przedstawiających wyniki badań laboratoryjnych psów biorących udział w badaniu) uzupełniająca, to musi się ona znajdować w rejestrze materiałów paszowych lub dodatków paszowych obowiązującym na terenie Unii Europejskiej, a w obecnej chwili znajdują się w nich wyłącznie surowce pochodzące z *Capsicum annum* oraz *Capsicum frutescens*. Innymi słowy papryka habanero nie jest obecnie uznawana na terenie UE jako materiał lub dodatek paszowy, stąd jej powszechne stosowanie wymaga zgody i rejestracji European Food Safety Agency. Jeżeli z kolei przedmiotem badania byłaby czysta kapsaicyna, wyizolowana z papryki habanero, prawdopodobnie mielibyśmy do czynienia z lekiem, który powinien być oceniany w badaniach klinicznych, a takie badania wymagałyby zgody komisji etycznej oraz wpisu do rejestru badań klinicznych. Stąd wydaje mi się, że Doktorantka powinna uściślić, co jest przedmiotem badań – potencjalny lek czy potencjalna mieszanka paszowa.

Ponadto, tytuł pracy wskazuje sugeruje, że przedmiotem badań jest susz z papryki habanero, podczas gdy wszystkie badania *in vitro* zostały przeprowadzone na ekstrakcie z tego suszu. W tym przypadku różnica jest o tyle istotna, że ma ona bezpośrednie przełożenie na sposób dawkowania i podawania substancji. Przy publikacji pracy konieczne jest precyzyjne określenie badanej substancji.

We Wstępie do dysertacji Doktorantka zawarła zwięzłe informacje dotyczące charakterystyki papryki habanero, w tym także jej głównej substancji czynnej, czyli kapsaicyny – jej mechanizmu działania oraz efektów biologicznych działania w organizmie. Omówione zostały także potencjalne mechanizmy działania przeciwnowotworowego kapsaicyny – czyli indukowanie apoptozy, depolaryzacja mitochondriów oraz blokowanie procesu angiogenezy. Autorka omawia także wyniki jednej pracy oceniającej zastosowanie kapsaicyny w terapii guzów gruczołu sutkowego i gruczolakoraków okołoodbytowych u psów. To m.in. wyniki tej pracy skłoniły Doktorantkę do podjęcia własnych badań, których celem była ocena skuteczności przeciwnowotworowej suszu z papryki habanero w stosunku do dwóch linii komórek nowotworowych psów DAN (fibroblasty izolowane z kostniakomięsaka) oraz D17 (komórki epitelialne kostniakomięsaka pobrane z guzów przerzutowych z płuc), ocena skuteczności przeciwnowotworowej suszu z papryki habanero

w stosunku do nowotworów gruczołu sutkowego w psów w warunkach *in vivo* oraz określenie tolerancji psów na doustne podawanie suszu z papryki habanero.

Prace badawcze Doktorantka rozpoczęła od określenia zawartości kapsaicynoidów w suszu z papryki habanero, po ich uprzedniej ekstrakcji etanolowej. Uzyskana próbka ekstraktu rozdzielono chromatograficznie w warunkach podanych w Tabeli 1, chociaż należy zauważyć, że brak jest w niej podanych jednostek czasu, przez jaki wykorzystywano do rozdzielu poszczególne rozpuszczalniki. Przeprowadzona analiza wykazała obecność w próbce sześciu kapsaicynoidów, z których najważniejszymi była kapsaicyna, stanowiąca 56% ekstraktu oraz dihydrokapsaicyna, stanowiąca kolejne 39% ekstraktu. W efekcie można przyjąć, że ekstrakt z suszu z papryki habanero zawiera dwie główne substancje o potencjalnym działaniu biologicznym, co jest także znane w literaturze. Zdaniem Recenzenta ten fakt zasługiwałby na większą uwagę w prowadzonych badaniach, a Doktoranta powinna zwrócić uwagę na potencjalne działanie biologiczne dihydrokapsaicyny, jeżeli takowe opisano.

Tak uzyskany ekstrakt poddany został badaniom w warunkach *in vitro* i *in vivo*. W badaniach *in vitro* modelem były linie komórek kostaniakomiesaka (fibroblastów i komórek epitelialnych), w których oceniano ich przeżywalność i proliferację w teście MTT oraz żywotność z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Jako, że przeżywalność i proliferację komórek nowotworowych oceniano w teście MTT, to uwagę Recenzenta zwróciło dlaczego w przypadku proliferacji ekstrakt rozcieńczano w płynie hodowlanym z dodatkiem 10% surowicy płodowej bydlęcej (FBS), podczas gdy w przypadku oceny żywotności stosowano płyn z dodatkiem 1% FBS. Różnica jest istotna choćby z punktu widzenia sposobu wzrostu komórek w pożywce zawierającej 1% lub 10% FBS. Doktorantka wykorzystała w badaniach *in vitro* 6 różnych stężeń kapsaicyny – zaczynając od 10 do 200 mikromoli – co mając na uwadze było dawką od 3 mikrogramów/ml do 61 mikrogramów/ml pożywki. Takie przeliczenie dawkowania jest dość istotne, ponieważ pozwala na porównanie z dawkami użytymi w badaniach *in vivo*. Badania z użyciem testu MTT wykazały wyższą skuteczność ekstraktu niż kapsaicyny użytej jako standardu w stężeniach 50, 100 i 150 mikromoli – wyższa była zarówno cytotoksyczność jak i zdolność hamowania proliferacji komórek nowotworowych. Widoczne było także to, że ekstrakt w stężeniu 100 mikromoli posiadał działanie cytotoksyczne równe działaniu czystej kapsaicyny w stężeniu 200 mikromoli. Te wyniki jednoznacznie wskazują na możliwe działanie cytotoksyczne dihydrokapsaicyny. Do wyników uzyskanych z użyciem testu MTT recenzent ma jednak kilka pytań. W Metodocyce opisano, że ocenę cytotoksyczności prowadzono przez 24-72 godziny, podczas gdy w części Wyniki podano tylko wartości dla 24 i 48 godzin. Ponadto, jeżeli metodyka badań oceniających cytotoksyczność oraz proliferację linii komórkowych była właściwie identyczna, to dlaczego np. przy stężeniu 100 mikromoli kapsaicyny żywotność komórek D-17 po 24 godzinach inkubacji wynosiła około 35%, po 48 godzinach wynosiła około 20%, zaś po 96h ... 60%. Podobny trend zmian zaobserwowano także w przypadku komórek DAN, których żywotność po 96 godzinach inkubacji z ekstraktem w stężeniu 100 mikromoli wynosiła 40%, podczas gdy po 24h i 48h wynosiła 20% lub mniej.

Ciekawe wyniki dotyczące działania ekstraktu na komórki D-17 i DAN uzyskano także w badaniu z użyciem cytometru przepływowego i aż dziwne wydaje się, że Doktorantka ich nie dyskutuje. Wynika z nich bowiem, że ekstrakt faktycznie posiada silne działanie apoptotyczne na te komórki i od stężenia 50 mikromoli wzwyż odsetek komórek umierających śmiercią apoptotyczną jest coraz większy, podczas gdy w przypadku stosowania samego standardu kapsaicyny przy najwyższym stężeniu 200 mikromoli dominującą formą śmierci komórek jest martwica. To sugeruje nieco inny mechanizm działania substancji czynnych znajdujących w ekstrakcie niż samej czystej kapsaicyny.

Bez wątpienia kluczową częścią pracy były badania żywieniowe przeprowadzone na w sumie 55 psach, z których 35 chorowało na chorobę nowotworową (guz sutka), zaś 20 stanowiło grupę kontrolną. Doktorantka podzieliła zwierzęta na dwie grupy w zależności od wielkości – psy małe (poniżej 5 kg m.c.) oraz psy średnie i duże (powyżej 5 kg m.c.). Nie ma jednak informacji w tekście, dlaczego takiego podziału dokonano i dlaczego przyjęto 5 kg m.c. jako wartość graniczną. Jest o tyle istotne, że psy małe otrzymały ekstrakt z papryki habanero (prawdopodobnie inny niż ten stosowany w badaniu *in vitro* – nie ma tutaj jasnej informacji) w dawce wyższej w przeliczeniu na kg m.c. niż psy średnie i duże i to o ponad 30%. Stąd istotne wydaje się pytanie – skąd taka różnica. Interesujące było by także porównanie lub próba odniesienia wielkości dawki użytej *in vitro* do dawek użytych *in vivo*.

W badaniu wykorzystano także w sumie 20 psów zdrowych, którym podawano kapsułki z ekstraktem przez okres 180 dni i regularnie pobierano od nich krew. Wydaje się więc, że Doktorantka powinna się odnieść w pracy do regulacji prawnych związanych z wykorzystaniem zdrowych zwierząt nie będących zwierzętami laboratoryjnym we własnych badaniach. Oczywiście jest zgoda ich właścicieli na udział w badaniach, o czym w pracy wspomniano, jednak tego rodzaju badania są w Polsce regulowane prawnie i istotne znaczenie ma informacja czy np. krew od psów zdrowych pobierano w ramach czynności lekarsko-weterynaryjnych czy wyłącznie do celów badawczych.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania *in vivo* dostarczają w sumie najwięcej informacji na temat tolerancji ekstraktu z papryki habanero przez zwierzęta i należy zauważyć, że podczas 180 dniowego okresu stosowania ekstraktu występowało relatywnie dużo objawów ubocznych, zarówno u zwierząt z chorobą nowotworową jak i zwierząt zdrowych. Objawy te najczęściej były niespecyficzne (biegunka, wymioty, wylizywanie odbytu) i z większą częstością występowały u psów małych. Może przyczyną tego była wyższa dawka ekstraktu w przeliczeniu na kg masy ciała? Na pewno także istotnym objawem ubocznym podawania ekstraktu z papryki habanero jest wzrost aktywności enzymów AST, ALT i ALP, zarówno u psów z chorobą nowotworową jak i u psów zdrowych, przy czym u zwierząt ras małych zmiany te utrzymywały się przez cały okres badania także u zwierząt zdrowych. Ta obserwacja bez wątpienia wymaga dalszych badań, ponieważ jasno pokazuje, że susz z papryki habanero nie jest obojętny dla organizmu. Wydaje się, że konieczne jest przeprowadzenie badań nad wielkością dawki dla zwierząt. Wyniki przeprowadzonych badań laboratoryjnych wszystkich psów zawarto w tabelach, ale chyba jednak warto byłoby przeprowadzić analizę statystyczną wyników z poszczególnych punktów pomiarowych, gdyż w przypadku np. enzymów wątrobowych wydaje się, że wzrost ich aktywności już po 30 dniach podawania ekstraktu może być istotny statystycznie.

W niejasny sposób zostały z kolei przedstawione wyniki pomiarów wielkości guzów. Doktorantka nie podała konkretnych wyników pomiarów, zasugerowała istotne zmniejszenie ich wielkości pod wpływem stosowania ekstraktu z papryki habanero odwołując się do Tabeli 11, 12 i Ryc. 14. W tabelach tych podano jednak zmianę wielkości w %, dlatego ważne jest, w jaki sposób została wyliczona istotność statystyczna – czy na podstawie wartości wyrażonych w % czy w jakiś inny sposób. Wydaje mi się także, że dane na Ryc. 14 przedstawiające zmianę mediany wielkości guzów nie są do końca jasne, ponieważ brakuje tam oznaczenia jednostki na osi pionowej, a przy braku danych dotyczących rzeczywistych wielkości guzów trudno faktycznie oszacować znaczenie przedstawianych wyników. Nie jest także jasne, dlaczego przedstawiono wykres z medianami wielkości guzów.

Z przeprowadzonych badań Doktorantka wyciąga sześć wniosków, ale niektóre ze stwierdzeń w nich zawartych są zdaniem Recenzenta nie do końca uzasadnione. Trudno zgodzić się z twierdzeniem, że ekstrakt jest dobrze tolerowany (wniosek nr 2) przez psy, kiedy u większości z nich występują objawy uboczne jego stosowania. W przypadku wniosku nr 3, mówiącego o wzroście aktywności enzymów wątrobowych, całkiem możliwe jest, że

aktywność tych enzymów zmierzona przed rozpoczęciem podawania ekstraktu powinna być czynnikiem decydującym o rozpoczęciu lub nie suplementacji. Taką informację może warto byłoby umieścić w tekście. Wydaje mi się także, że zbyt daleko idące jest sugerowanie tego, że ekstrakt z suszu z papryki habanero może być alternatywą dla chemioterapii lub radioterapii badanych nowotworów (wniosek 4). W swojej pracy bowiem Doktorantka nie porównywała badanej substancji z chemioterapią czy radioterapią, stąd brak jest podstaw do takiego wnioskowania. Interpretując wyniki badań *in vivo* przydatne byłoby chyba także ustalenie kryteriów sukcesu w odniesieniu do efektów suplementacji – czy sukcesem jest brak dalszego wzrostu guza czy też spadek jego wielkości? Tutaj także duża wartość miałoby użycie markerów zahamowania wzrostu lub resorpcji guzów, aby można było w sposób dokładniejszy niż tylko fizyczny pomiar wielkości określić wpływ ekstraktu na biologię guza. To mogłoby pomóc zinterpretować uzyskane wyniki, jako że w przypadku większości psów wielkość guza nie uległa zmianie. Otwarte jest więc pytanie czy u takich pacjentów bardziej racjonalny nie byłaby np. zabieg chirurgiczny wykonany sześć miesięcy wcześniej?

Analizując pracę jako całość recenzent ma także kilka uwag natury ogólniejszej. Wydaje mi się, że przed publikacją pracy warto ujednolicić nazwę badanej substancji: czy jest to wyciągu z suszu, czy sam susz, czy preparat z papryki habanero czy mieszanka paszowa. Wszystkie te nazwy pojawiły się w tekście. Ponadto wszystkie ryciny i tabele muszą być podpisane w taki sposób, aby po ich wyjęciu z tekstu było wiadomo, co przedstawiają – zgodnie z zasadą, że każda rycina i tabela musi żyć własnym życiem. W tabelach z wynikami badań laboratoryjnych raz podawane jest, że drugi pomiar wykonano po 28 dniach, a w innym miejscu, że po 30 dniach. Trzeba to ujednolicić. W tekście zdarzają się także drobne nieścisłości językowe, jak np. określenie gruczoł mlekowy, który jest w innych częściach pracy gruczołem sutkowym. Ponadto patrząc na pracę jako całość wydaje się, że w części *in vitro* można było wykorzystać także inną substancję o znanym działaniu cytotoksycznym (chemioterapeutyk?) jako kontrolę dodatnią, aby ocenić siłę działania kapsaicyny lub ekstraktu z papryki habanero.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska, choć nie wolna od drobnych błędów lub uchybień stanowi wartościowy materiał do rozpoczęcia badań *in vivo* nad przeciwnowotworowym działaniem substancji czynnych zawartych w ekstrakcie z papryki habanero. Ponieważ wybrany model badawczy, czyli choroba nowotworowa stanowi poważny problem medyczny, niczym zaskakującym nie powinny być pytania stawiane Doktorantce ani wątpliwości związane z uzyskanymi wynikami. Im większe są oczekiwania wobec substancji czynnych poddawanych badaniom, tym więcej będzie wątpliwości, uwag i wskazówek, które mają pomóc w weryfikacji wartości uzyskanych wyników. A w przypadku chorób nowotworowych zawsze to właśnie korzystne wyniki badań wzbudzają najwięcej nieufności. Doktorantka kończąc pracę słusznie zauważa, że uzyskane w niej wyniki wymagają dalszych badań, a jednocześnie niniejsza Rozprawa doktorska doskonale pokazuje, że przenoszenie nawet najbardziej obiecujących wyników badań uzyskanych *in vitro* na realne warunki kliniczne u konkretnych pacjentów nie zawsze daje powtarzalne i jednoznaczne wyniki.

Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą dokorską lek wet Dagmary Gadomskiej uważam, że Autorka pracy wystarczająco dobrze posługuje się nowoczesną metodyką badawczą, roztropnie wykorzystuje ją w pracy eksperymentatorskiej, a otrzymane wyniki logicznie interpretuje. Należy bezwzględnie podkreślić ogrom pracy wykonanej w ramach niniejszej rozprawy, szczególnie zaś dużą wartość badań *in vivo*. Doktorantka w swojej pracy przeprowadziła unikatowe badania na rzadko stosowanym modelu badawczym, dlatego

uzyskane wyniki są świetnym materiałem na publikację. Wszelkie uwagi krytyczne i wątpliwości Recenzenta nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej dysertacji, mają jedynie przypomnieć i podkreślić konieczność stosowania pewnych nawyków, jakich oczekuje się od przyszłego naukowca, przede wszystkim konieczności weryfikacji i porównywania własnych wyników z wynikami uzyskanymi przy użyciu substancji uznawanych za dodatnie standardy kontrolne w wybranych modelach badawczych. Mając powyższe na uwadze pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani lek. wet. Dagmary Gadomskiej pt. „Badania nad aktywnością przeciwnowotworową suszu z papryczek habanero, zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* u psów” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnoszę do Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Dagmary Gadomskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

