



**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej pt.:**  
**”Ocena wpływu preparatów toksyny botulinowej typu A na wybrane funkcje**  
**fibroblastów skóry ludzkiej”**  
**Autor: lek. Marlena Jamiołkowska-Stawowska**

Minęło już ponad 100 lat od pojawienia się prac o botuliźmie autorstwa Ernesta C. Dickson’a, który opisywał zatrucia tzw. jadem kielbasianym i wskazywał aby np. „w żadnym wypadku nie powinien być domowym jedzeniem produkt (np. konserwa domowa), który wykazuje oznaki zepsucia, nie należy go jeść ani nawet smakować”. Dzisiaj doskonale wiemy, że te zatrucia są wywoływane obecnością laseczek jadu kielbasianego - *Clostridium botulinum*, ze względu na uwalnianie jednej z najsilniejszych toksyn biologicznych dla człowieka, znanej botuliną, prowadzące do zwiótnienia mięśni szkieletowych, na skutek zahamowania uwalniania acetylocholino z zakończeń presynaptycznych włókien nerwowych w obrębie układu nerwowego, głównie poprzez blokowanie funkcji motorycznej złącza nerwowo-mięśniowego. Botulizm jest chorobą kręgowców, w tym oczywiście ludzi, jednakże to schorzenie jest obecnie jest generalnie stosunkowo rzadkie np. ze względu na ulepszone techniki przygotowywania i przechowywania żywności, które zapobiegają wzrostowi tych beztlenowców, chociaż wciąż badania nad tą chorobą trwają (Cochrane Database of Systematic Reviews. 4:CD008123, 2019 04 17). W latach siedemdziesiątych, dzięki pionierskim badaniom na małpach, a potem u ludzi, przeprowadzonym przez Scotta i współpracowników, zaczęto stosować botulinę do leczenia zęza. Te badania stały się wskazówką do terapeutycznego stosowania tej toksyny w szerokim zakresie zaburzeń charakteryzujących się nadaktywnością zakończeń nerwowych niezależnie od pochodzenia. Ponieważ botulina nie tylko wpływa na działanie płytki nerwowo-mięśniowej, ale również działa pośrednio na unerwienie autonomiczne, stąd pojawiło się wiele możliwości jej stosowania (Pirazzini i wsp. Pharmacol. Rev., 2017, 69, 200–235) np. zaburzeniach neurologicznych (spastyczność, dystonie z najbardziej znaną formą choroby - kręczem karku), leczeniu bólu w tym neuropatycznego, zaburzeń urologicznych (np. leczenie zespołu nadreaktywnego pęcherza moczowego), a nawet rozważane jest jej stosowanie w leczeniu depresji. Obecnie wskazań do stosowania tego leku

jest bardzo wiele z tym, że aktualne szacunki wskazują na to, iż około połowa zużywanych preparatów zawierających botulinę jest używana w medycynie estetycznej. Wiadomo bowiem, że tzw. estetyczne dermatologiczne zastosowania neurotoksyny botulinowej były np. najczęstszymi niechirurgicznymi zabiegami kosmetycznymi w USA w 2017 r. (Kerscher i. wsp. *Journal of Drugs in Dermatology*, 2019, 18(1), 52-57). Niemniej jednak, botulina ciągle jest przedmiotem różnych badań, a jej właściwości kosmetyczne mają być związane nie tylko z wpływem na złącze nerwowo-mięśniowe, ale również na działanie skóry.

Na tym tle, będące przedmiotem ocenianej dysertacji, wykonane przez Autorkę badania nad określeniem wpływu preparatów Botox (onabotulinumtoxin A) i Bocouture (incobotulinumtoxin A) na możliwość regulacji funkcji fibroblastów skóry i tym samym ewentualnego wspomaganie procesów regeneracji i odmłodzenia skóry wydają się celowe i merytorycznie uzasadnione.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch różnych preparatów botuliny tj. preparatu zawierającego białka kompleksujące (Botox) oraz pozbawionego tych białek (Bocouture) w dwóch dawkach (2 i 4 j.m.), często używanych klinicznie, na funkcje fibroblastów skóry ludzkiej w zakresie ich przeżywalności, wpływu na syntezę DNA, stężenie całkowitego białka, kwasu hialuronowego i moczowego, oceniając również całkowity status antyoksydacyjny oraz aktywność peroksydazy glutationowej.

Układ pracy jest typowy dla prac eksperymentalnych. Materiał recenzowanej pracy doktorskiej Autorka zamieściła w 12 rozdziałach na 194 stronach numerowanych. W rozdziale pierwszym (str. 4-10) przedstawiono bardzo obszerny wykaz użytych w pracy skrótów, następnie przedstawiono wstęp (str. 11-24), w którym opisano budowę toksyny botulinowej, jej mechanizm działania, zastosowanie tego leku w medycynie ze szczególnym uwzględnieniem stosowania w dermatologii i medycynie estetycznej. Opisano również w tym miejscu znane preparaty zawierające tę toksynę oraz szerzej omówiono wpływ toksyny botulinowej na skórę. W kolejnych rozdziałach przedstawiono cel pracy (str. 25), szczegółowo omawiając metodykę badań wraz ze stosowanymi metodami (str. 26-38), które znalazły zastosowanie w przeprowadzonych eksperymentach tj. opis hodowli fibroblastów, podział na grupy badawcze wraz z informacjami dotyczącymi użytych metod analitycznych oznaczania białka całkowitego, całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAS), kwasu moczowego (UA), kwasu hialuronowego (HA), aktywności specyficznej peroksydazy (GPx), przeżywalności fibroblastów (test MTT) oraz proliferacji fibroblastów (na podstawie syntezy DNA z użyciem znakowanej tymidyny).

Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń umieszczono na 85 rycinach (Ryciny 7-92) i w 85 tabelach (Tabele 2-87), zamieszczając je wraz z ich szczegółową analizą w rozdziale zatytułowanym „Wyniki” (str. 39-149). Otrzymane dane dogłębnie przedyskutowano w rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” (str. 150-162).

Spis cytowanych prac (str. 168-177) obejmuje 134 pozycje piśmiennictwa opublikowane w latach 1918 (jedna z prac o botulinizmie opublikowana przez Ernest C. Dickson'a) - 2019, w tym 54 w ostatnich 10 latach, głównie pochodzące z czasopism specjalistycznych, 12 podręczników i monografii oraz 10 wejść do stron internetowych, które ściśle są związane z tematyką przedstawianą tak we wstępie, jak i umiejętnie wykorzystywane w dyskusji.

Na podstawie otrzymanych wyników Autorka sformułowała pięć wniosków (str. 163), stwierdzając m.in., iż „Preparat Bocouture i Botox różnią się wpływem na przeżywalność fibroblastów i syntezę DNA zależnym głównie od czasu ekspozycji” oraz „(...) mają podobną dynamikę wpływu na przeżywalność i syntezę DNA porównywalną dla obu stosowanych dawek”, że „Stężenie kwasu hialuronowego w fibroblastach zwiększa (zapewne tu winno być dodane słowo „podawanie”) Bocouture (...)”, a „Antyoksydacyjną mobilizację fibroblastów odnotowano po Bocouture, a osłabioną po zastosowaniu Botox (...). Ostatni piąty wniosek stanowi pewne podsumowanie otrzymanych wyników.

W pracy zamieszczono również streszczenie w języku polskim (str. 164-165) i angielskim (str. 166-167) oraz spis rycin (str. 178-186) i tabel (str. 187-194)..

Dysertacja ta wyróżnia się nie tylko dobrze opracowanym, opartym na aktualnym, światowym piśmiennictwie wstępie, ale również odniesieniem otrzymanych wyników do wpływu na przeżywalność czy proliferację fibroblastów otrzymywanych przez innych autorów. Autorka m.in. stwierdziła występowanie względnie krótko trwającego, ale znamiennego działania preparatu Bocouture (2 j.m.) powodującego zmniejszenie przeżywalności fibroblastów skóry, a nasilenie w nich syntezy DNA związane z nasileniem proliferacji, co może mieć znaczenie jako, że jak sama Autorka pisze „(...) nasilenie proliferacji fibroblastów może powodować efekt odmładzający” (str. 150). Stąd spostrzeżenia zawarte w pracy na temat przeżywalności tych komórek pod wpływem dwóch różnych badanych preparatów zawierających botulinę, wpływu na stężenie kwasu hialuronowego, powiązanego z ewentualnym hipotetycznym nawodnieniem macierzy zewnątrzkomórkowej oraz regulacji procesów metabolicznych fibroblastów wydają się być ciekawe, chociaż niełatwe w interpretacji względem różnic otrzymanych dla obu różnych preparatów, stosowanej dawko-zależności oraz czasu trwania otrzymanych efektów. Podobnie ważne było przebadanie

wpływu obu preparatów na parametry związane ze stresem oksydacyjnym, o czym słusznie sama Autorka pisze, iż „Jest on odpowiedzialny za starzenie skóry, a także promocję procesów patologicznych” (str.156). Niemniej znalezienie przyczyn uzyskanej odmiennej odpowiedzi fibroblastów w czasie w zakresie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na podanie preparatów Bocouture i Botox niewątpliwie nie jest łatwe i wymaga dalszych badań. Należy jednak wyraźnie wspomnieć, że badania nad działaniem botuliny przeprowadzone przez Autorkę były prowadzone w obszarach, w której tego typu badania są naprawdę nieliczne, co znalazło również wyraz w dyskusji (np. str. 153).

Stąd przeprowadzone badania, otrzymane wyniki i wyciągnięte na ich podstawie wnioski stanowią oryginalny udział Autorki w lepszym zrozumieniu skomplikowanego działania botuliny w zakresie możliwości regulacji funkcji fibroblastów i ewentualnego przyszłościowego wspomagania przez nią procesów regeneracji i odmłodzenia skóry.

Mimo bardzo dobrej treści jak i formy tej pracy, nie uniknięto też pewnych, acz nielicznych, nieścisłości bądź uchybień w większości o charakterze redakcyjnym.

Analizę wyników zamieściła Autorka z podziałem na badanie dawko-zależności (Tabele 2-32 , Ryciny 7-37,), wpływu czasu trwania doświadczenia (Tabela 33-56, Ryciny 38-61) oraz oceny efektów działania preparatów (Tabele 57-87, Ryciny 62-92). Taki układ pozwala śledzić kolejno wpływ tych trzech czynników, chociaż niewątpliwie liczbę tabel i rycin można by ograniczyć, bowiem dane dotyczące dawko-zależności jak i oceny działania preparatów są tożsame i zawierają te same dane np. „Tabela 2. Całkowita zawartość białka (mg/mL) w medium hodowli fibroblastów poddanych przez 24 godziny działaniu różnych dawek preparatów toksyny botulinowej” w porównaniu do np. „Tabela 57. Całkowita zawartość białka (mg/mL) w medium hodowli fibroblastów poddanych działaniu różnych dawek preparatów toksyny botulinowej po 24 godzinach eksperymentu”. A więc Tabele 2-32 czy Ryciny 7-37 kolejno przedstawiane zawierają te same dane co wyniki zamieszczane sukcesywnie w Tabelach 57-87 czy Rycinach 62-92. Zawarte w nich dane różnią się tylko kolejnością umieszczania poszczególnych grup w tabeli czy na rycinie. Niewątpliwie więc, można by przeprowadzić analizę wpływu grupy (działanie danego preparatu) oraz dawki na podstawie danych zamieszczonych w jednej z tych tabel czy rycin np. Tabeli 2 czy Ryciny 7, bez konieczności przedstawiania np. Tabeli 57 i Ryciny 62, wprowadzając np. odpowiednie indeksy zaznaczające tzw. znamiennosć względem odpowiedniej grupy kontrolnej (badając efekt grupy – określone przez Autorkę jako „Porównanie wartości badanych parametrów pomiędzy preparatami toksyny botulinowej” (tabele 57-87, ryciny 62-92)) czy danej dawki, pozwalając tym samym bardziej sumarycznie przedstawiać rezultaty wynikające z przeprowadzonej analizy statystycznej.

Co do przeprowadzonej dyskusji i wyciągniętych wniosków, to o ile można zgodzić się z wnioskiem 1, bowiem preparat Bocouture w dawce mniejszej zmniejszał przeżywalność po 6 i 48 godzinach (efektu tego jednak nie zaobserwowano dla dawki 4 j.m.), podczas gdy dla Botox nie stwierdzono tego efektu, to sentencja zawarta we wniosku 2 nie jest jednoznaczna. Jeśli bowiem Autorka miała na myśli efekty określające przeżywalność względem czasu, to działanie obu preparatów w niższej dawce przedstawione w Tabeli 53 i odpowiadającej jej Rycinie 58 oraz dla dawki wyższej (Tabela 54 i Rycina 59) jest praktycznie wynikiem obserwowanych zmian w grupie kontrolnej. Podobną uwagę można odnieść do wpływu obu preparatów w obu stosowanych dawkach na syntezę DNA w fibroblastach w zależności od czasu (Tabele 55, 56 i odpowiadające im Ryciny 60 9 61), gdzie obraz zmian jest praktycznie tożsamy ze zmianami obserwowanymi w grupie kontrolnej, a otrzymane różnice stanowiły przesłankę na podstawie której sformułowano wniosek 1. Natomiast do wniosku 3 proponowałbym dodać, że preparat Botox obniża stężenie kwasu hialuronowego w fibroblastach. We wniosku 5, który jak już wspominałem stanowi pewne podsumowanie otrzymanych wyników, mam wrażenie, na podstawie treści zawartych we wniosku 3 oraz przedstawionych danych, że zamiast HA (kwas hialuronowy), chodziło o wpływ kwasu moczowego (UA).

W pracy nie uniknięto też pewnych sformułowań, które mają wydźwięk nieco humorystyczny, bowiem niekoniecznie można zgodzić się z sformułowaniem „W badaniach przeprowadzonych na skórze szczura, która jest bardzo podobna do skóry ludzkiej (...),” (str. 23, wiersz 6-7 od dołu).

Ponadto znaleziono w tekście pracy pewne dziwne wyrazy wynikające zapewne z uchybień redakcyjnych np. „nadosodowy” zapewne miało być ”nadosadowy” (str. 26, wiersz 9 od góry), „fibroblasach” zapewne miało być ”fibroblastach” (Tabela 35, Rycina 40) czy „dawi” zapewne miało być „dawki” (str. 116, wiersz 2 od góry), „hialrunonowy” zapewne miało być „hialuronowy” (str. 154, wiersz 1 od góry).

W zdaniu „Inna koncepcja wskazuje na działanie HA zależne od stężenia - w stężeniach fizjologicznych działanie antyoksydacyjne, w podwyższonych prooksydacyjne [118] lub od lokalizacji - przeciwoksydacyjne w środowisku zewnątrzkomórkowym, w komórkach uszkodzające [119, 120]” (str. 158-159, wiersze - dwa ostatnie – str. 158 i dwa pierwsze – str. 159) zapewne zamiast HA (kwas hialuronowy) chodziło o kwas moczowy (UA), na co wskazują użyte pozycje z cytowanego piśmiennictwa. .

Przedstawione wyżej uwagi są jednak nieliczne, stąd nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji pracy, którą oceniam bardzo wysoko, a uzyskane wyniki,

stanowiące oryginalne osiągnięcia Autorki, mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia działania botuliny na aktywność fibroblastów zawartych w skórze człowieka.

Podsumowując, przedstawiona do oceny praca odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.: Dz.U. Nr 84 poz. 455 oraz Dz.U. 2014 poz. 1383, 1852, Dz.U. z 2015 poz. 249, 1767), stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie naukowej – medycyna, jak i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani lek. Marleny Jamiołkowskiej-Stawowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę obszerny zakres badań opisanych w rozprawie oraz duży wkład pracy Doktorantki w przeprowadzenie doświadczeń wymagających stosowania różnych technik badawczych w obszarze, w którym podobnych prac praktycznie nie ma, uważam, że dysertacja przedstawiona przez Panią lek. Marlenę Jamiołkowską-Stawowską zasługuje na wyróżnienie.

Poznań, 15.07.2019

  
Prof. dr hab. Przemysław Mikołajczak