Prof. dr hab. Tadeusz Studziński
Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 18 czerwca 2023 r.

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr inż. Piotra Adamczuka pt. „Efekt działania N-acetylo-L-cysteiny na układ antyoksydacyjny i docelowe cholinoesterazy w ostrym i podostrym zatruciu Pirymifosem metylowym" wykonanej pod promotorstwem profesora Instytutu Medycyny Wsi, dra hab. Grzegorza Raszewskiego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została zredagowana w przyjętym powszechnie stylu z podziałem treści na następujące rozdziały: Wstęp (1), Cel pracy (2), Materiał i metody (3), Wyniki (4), Dyskusja (5), Wnioski (6), Streszczenie (7), Summary (8), Piśmiennictwo (9), Tabele z wynikami (10) i Wykaz skrótów (11).

Cała rozprawa liczy 114 stron wydruku komputerowego, a w tym 30 stron wstępu, w którym przedstawiono współcześnie istniejący, bezustanny wzrost globalny populacji i przyśpieszający rozwój technologii produkcji rolniczej, powiązany z rosnącym zapotrzebowaniem na żywność. Ujawnia się to powszechnym stosowaniem pestycydów, herbicydów, intensywnym nawożeniem mineralnym, a także wprowadzaniem zmodyfikowanych genetycznie odmian roślin przemysłowo uprawianych. Wysokie plony i zbiory finalne, przetworzone w postaci półproduktów oraz przygotowanych komercyjnie ofert wprost do żywieniowego użytku dla ludzi oraz jako pasza dla zwierząt gospodarskich przybrały cechy pragmatycznej powszechności. Należy podkreślić, iż powyższe tendencje będą nie tylko utrzymane, ale nawet intensyfikowane w przyszłych dziesięcioleciach, objętych prognozowaniem ekspertów FAO. Wymusi to dalszą intensyfikację produkcji rolniczej i wzrost nawożenia gleb, a także wzrost stosowania pestycydów w ochronie upraw oraz przechowywania żywności i rolniczych produktów przemysłowych i ich ochronę przed chemicznymi i biologicznymi zagrożeniami.

Korzystnym efektom stosowania pestycydów w ochronie upraw rolno-spożywczych przeciwstawiono ich szkodliwe działanie na środowisko oraz zdrowie ludzi i zwierząt, włącznie z ostrymi zatruciami, liczonymi globalnie w milionach, a zejściami

śmiertelnymi w setkach tysięcy. W opisie grupy związków fosforoorganicznych (ZFO) uwzględniono również genezę historyczną syntezy i użycia chemicznych środków bojowych (ChŚB), takich jak tabun, sarin, cyklosarin oraz soman, a także Nowiczok.

Najwięcej uwagi skierowano na wszechobecne środowiskowe pestycydy i ich sprawczy wpływ na zmiany w bioróżnorodności, a także prawdopodobieństwo indukcji i oddziaływanie na ekspresję genów w okresie prenatalnego rozwoju i ich zmiany mające sprzężenia przyczynowe z neurotoksycznością, przewlekłymi i opóźnionymi w czasie chorobami neurologicznymi, a także białaczkami dziecięcymi i innymi zaburzeniami chorobowymi, które są obecnie poddawane badaniom w powiązaniu głównie z następstwami zarówno ostrych jak i opóźnionych i odległych w czasie chronicznego i trwałego oddziaływania na funkcje narządowe związków fosforoorganicznych, przy szczególnym uwzględnieniu centralnego i obwodowego układu nerwowego.

W kolejnych podrozdziałach opisano szczegółowo mechanizmy patofizjologicznego działania związków fosforoorganicznych (ZFO) warunkowane hamowaniem aktywności esterazy acetylocholinowej (AChE) w obrębie receptorów nikotynowych i muskarynowych z finalnym efektem wyzwalania syndromu (kryzysu) cholinergicznego, jako nieodwracalnego zatrucia i przyczyny zejść śmiertelnych powodowanych przez ZFO. Uwzględniono także w opisie „opóźnioną” neuropatię (OPIDN) warunkowaną hamowaniem aktywności neurotoksycznej esterazy (NTE) oraz znaczenie aktywności butyrylocholinoesterazy (BChE) oraz karboksyloesterazy (KbE) i esterazy neurotoksycznej NTE) w diagnozowaniu i działaniu patogennym związków fosforoorganicznych (ZFO). W prezentacji chronicznego narażenia na działanie związków fosforoorgancznych uwzględniono neurodegeneracyjne zmiany w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, a także neuropsychologiczne zaburzenia procesów poznawczych u ludzi, pamięci, zmian behawioralnych i indukcji stanów depresyjnych.

W kolejnym podrozdziale przedstawiono rolę i mechanizmy wyzwalania stresu oksydacyjnego, odpowiedzialnych za toksyczne oddziaływanie pestycydów i generowanie uszkodzeń przez wolne rodniki tlenowe i azotowe na poziomie struktur wewnątrzkomórkowych, genetycznych oraz funkcji immunologicznych i narządowych stanów zapalnych, a także indukcji apoptotycznej śmierci neuronów i inicjacji procesów nowotworowych. Uszkodzenia oksydacyjne oddechowych funkcji mitochondrialnych i wewnątrzkomórkowych struktur białkowych, lipidowych i węglowodanowych, powiązano z funkcjami wielopoziomowego układu enzymów obrony antyoksydacyjnej, prezentowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD), katalazę (CAT) i peroksydazę glutationową (Gpx), wraz z glutatationem (GSH). Wyszczególnienie

bezpośrednich wymiataczy wolnych rodników pełnionych przez kwas askorbinowy, tokoferole, flawonoidy i przeciwutleniacze tiolowe przedstawiono jako dopełnienie obrony antyoksydacyjnej.

Z uwagi na to, iż cele badań objętych ocenianą rozprawą były powiązane z wykorzystaniem perspektywicznym wyników doświadczeń na myszach z ich przeniesieniem porównawczym i odniesieniem również do innych gatunków zwierząt, a w tym także do ludzi, to w jednym z podrozdziałów wstępu (1. 2. 4.) przedstawiono współczesne metody stosowane w leczeniu zatruć związkami fosforoorganicznymi.

Opis metod swoistego leczenia farmakologicznego zatruć związkami fosforoorganicznym został rozpoczęty od prezentacji, już historycznej, a ciągle aktualnej, roli terapeutycznej atropiny, jako blokera postsynaptycznych receptorów cholinergicznych, zarówno muskarynowych jak i nikotynowych. Działanie terapeutyczne atropiny poszerzono o prezentację szeregu nowych, selektywnych antagonistów receptorów cholinergicznych, współcześnie stosowanych w leczeniu zatruć związkami fosforoorganicznymi, do których należy benaktyzyna, triheksylofenidyl i skopolamina.

W kolejnej prezentacji współczesnego leczenia farmakologicznego zatruć związkami fosforoorganicznymi przedstawiono rolę terapeutyczną związków oksymowych, których mechanizm działania polega na reaktywacji aktywności enzymatycznej zahamowanej AchE. Szczególnie ważne znaczenie kliniczne w terapii ciężkich zatruć związkami fosforoorganicznymi u ludzi udowodniono w stosowaniu takich oksymów jak pralidoksym, obidoksym, trimedoksym, metoksym i HI-6, w ich skojarzonym stosowaniu z atropiną.

W powiązaniu z indukcją stresu oksydacyjnego przez związki fosforoorganiczne poddano ocenie wyniki współczesnych badań nad działaniem ochronnym N-acetylocysteiny przed wolnymi rodnikami tlenowymi i ich metabolitami. Okazało się, iż N-acetylocysteina stabilizuje status oksydacyjno-antyoksydacyjny zarówno krwi jak i hamuje peroksydację lipidów o niskiej gęstości oraz stymuluje aktywność enzymów antyoksydacyjnych zwiększając zawartość wewnątrzkomórkowego glutationu, cysteiny i cystyny. Znana od wielu lat N-acetylocysteina, jako mukolityczny lek, stosowany w chorobach układu oddechowego i zatruciu paracetamolem, okazała się nie w pełni poznanym, a bezpiecznym antyoksydantem, którego objęcie badawczym podejściem w ocenianej rozprawie należy podkreślić jako w pełni uzasadnione i oryginalne. Jednym z dowodów wskazujących na słuszność takiej oceny wstępnej podjętych badań, mogą być właśnie zalecenia prewencyjnego i terapeutycznego stosowania N-acetylocysteiny w odniesieniu do Covidu-19, wirusowych infekcji, stabilizacji statusu antyoksydacyjnego, regulacji programowanej śmierci komórek (apoptoza), a także wielu innych zaburzonych funkcji metabolicznych, narządowych i systemowych w cytowanej publikacji: N-acetylcysteine and coronavirus disease

2019: May it work as a beneficial preventive and adjuvant therapy? A comprehensive review study J. Res. Med. Sci. 2020, 25, 109.

Finalny podrozdział Wstępu rozprawy przeznaczono na opis struktury chemicznej pirymifosu metylowego, mechanizmy toksycznego działania na organizmy zwierząt i ludzi oraz praktyczne wykorzystanie, jako pestycydu, w ochronie upraw i produkcji żywności przed szkodnikami. Główną uwagę skierowano na objawy ostrej toksyczności pirymifosu u zwierząt i ludzi, jako efektu hamowania aktywności cholinoesteraz podczas prac narażających ludzi na bezpośredni kontakt w czasie opryskiwania i mieszania z ziarnami oraz pomieszczeń składowania produktów rolno-spożywczych i utrzymywania zwierząt gospodarskich. Całość treści Wstępu stanowi prezentację wiedzy obejmującej współczesne publikacje specjalistyczne o roli związków fosforoorganicznych, jako pestycydów, szeroko stosowanych w ochronie produktów rolno-spożywczych i równoczesnego zanieczyszczenia, szeroko ujętego środowiska, a w tym gleby, wody, powietrza i pomieszczeń gospodarskich oraz środowisk ludzkiej pracy i życia. Ukazuje też konieczność prowadzenia dalszych badań, ukierunkowanych na poszerzone rozpoznanie nie w pełni poznanych, a ważnych praktycznie w stosowaniu metod postępowania terapeutycznego i profilaktycznego wobec ludzi i zwierząt.

Cele badań (2. Cel pracy) objętych rozprawą można umownie podzielić na dwie części: w pierwszej była to ocena wpływu N-acetylocysteiny na ostrą i podostrą toksyczność pirymifosu metylowego, mierzoną stopniem zahamowania aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) w mózgowiu i erytrocytach oraz butyrylocholinoesterazy osoczowej (BchE), a także na efekty skuteczności N-acetylocysteiny w indywidualnej i skojarzonej terapii farmakologicznej z atropiną i obidoksymem w badaniu na modelu myszy laboratoryjnej. W części drugiej celem badań była ocena wpływu N-acetylocysteiny na parametry stresu oksydacyjnego w ostrym i podostrym zatruciu myszy pirymifosem metylowym oraz efektów skuteczności farmakologicznej terapii w indywidualnym zastosowaniu N-acetylocysteiny oraz w skojarzeniu i współdziałaniem z atropiną i obidoksymem.

Opis badań zwierząt doświadczalnych (myszy albino Swiss), warunków utrzymania, żywienia i postępowań doświadczalnych jest zgodny z wymogami zasad obowiązujących i zgodnych z procedurami dopuszczającymi prowadzenie eksperymentów na zwierzętach (akceptacja Lokalnej Komisji Etycznej).

Opis metod badań, odczynników, metod badań aktywności cholinoesteraz, glutationu, wodoronadtlenków lipidowych, aktywności katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej oraz analizy statystyczne wyników są w pełni satysfakcjonujące.

W rozdziale czwartym – Wyniki – przedstawiono w formie 22 rycin w kolejnych 26 stronach tekstu pracy oraz w 7 tabelach umieszczonych na końcu pracy. Ryciny określano jako wykresy nadając im zwarte formy, prezentujące wielkość toksycznych obciążeń pirymifosem, aktywność cholinoesteraz w mózgowiu, erytrocytach i osoczu krwi oraz wartości i statystyczną istotność różnic między średnimi poszczególnych grup kontrolnych i doświadczalnych. Prezentację wyników badań rozpoczęto od wykazania zahamowanej aktywności cholinoesteraz w ostrym zatruciu pirymifosem, trwającym 2 i 72 godziny (Wykres 1 i Tab.1). Wyniki te, były podstawą do doświadczalnego badania wpływu atropiny, obidoksymu i N-acetylocysteiny, stosowanych pojedynczo (indywidualnie) i w skojarzonych układach podwójnych i potrójnych, określanych ogólnie jako terapie farmakologiczne, nadając im skrótową nominację literową (od T1 do T7). T1-oznacza stosowanie atropiny; T2-N-acetylocysteiny; T3-N-acetylocysteiny w skojarzeniu z atropiną; T4- obidoksymu; T5-obidoksymu wraz z atropiną; T6-obidoksymu z N-acetylocystiną; T7-obidoksymu z atropiną i N-acetylocysteiną.

Na rycinach 2, 5 i 8 przedstawiono efekty takiego farmakologicznego przeciwdziałania toksycznym wpływom ostrego i podostrego działania pirymifosu, trwającego 2 godziny i 72 godzin oraz 14 dni (podostry stan toksyczny) na podstawie oceny stopnia odzyskiwania aktywności acetylocholinoesterazy w mózgowiu myszy. Wyłączne i skojarzone z atropiną i obidoksymem stosowanie N-acetylocysteiny zwiększało skutecznie aktywność acetylocholinoestrezy w mózgowiu myszy, wskazując na zasadność pojedynczego i kojarzonego stosowania takich podejść terapeutycznych w badaniu toksycznego działania pirymifosu. Zarówno w indywidualnym działaniu N-acetylocysteiny, jak również w układach skojarzonych, szczególnie z obidoksymem w ostrej toksyczności stwierdzano zwiększenie aktywności acetylocholinoesterazy mózgowej. Należy podkreślić, że w podejściu doświadczalnym, o przedłużonym działaniu pirymifosu do 14 dni, połączonym z równoczesnym działaniem N-acetylocysteiny, uzyskano skuteczny wzrost aktywności acetylocholinoesterazy, potwierdzony statystyczną istotnością (Wykres 8.). Takiego efektu nie stwierdzono w badaniu aktywności acetylocholinoesterazy w erytrocytach, a także butyrylocholinoesterazy w osoczu krwi (Wykres 9 i 10).

W odniesieniu do rezultatów badań aktywności acetylocholinoesterazy erytrocytów i butyrylocholinoesterazy osocza krwi uzyskanych w identycznych podejściach eksperymentalnych do zastosowanych w badaniu mózgowia, to w uogólnieniu można powiedzieć, iż istnieje duże podobieństwo w ukierunkowaniu zarówno tendencji, jak i realnych wyników, które mieszczą się w niższej skali wartości (Wykres 3, 4, 6,7). Podkreślić należy jedynie istnienie wyższej aktywności acetylocholinoesterazy mózgowej pod działaniem N-acetylocysteiny przez 14 dni na toksyczny stan warunkowany w tym czasie pirymifosem (Wykres 8.) w porównaniu z aktywnością

w erytrocytach (Wykres 9) i aktywnością butyrylocholiny osoczowej (Wykres 10). Stwierdzenie to należy uznać za ważny poznawczo wynik o znaczeniu poznawczym, terapeutycznym, a także prewencyjnym w przeciwdziałaniu efektom trującego działania pirymifosu i innych związków fosforoorganicznych.

Celem badań - umownie części drugiej - była ocena wpływu N-acetylocysteiny na parametry stresu oksydacyjnego w ostrym i podostrym zatruciu myszy pirymifosem metylowym oraz ocena efektów skuteczności terapeutycznej w indywidualnej i skojarzonej z atropiną i obidoksymem współdziałaniem. Wyniki badań tej części, przedstawiono w 12 kolejnych rycinach (wykresy) o numeracji od 11 do 22 i tabelach Nr 5, 6 i 7. Część ta rozpoczyna się podrozdziałem 4.5, zatytułowanym *„Wpływ podania pirymifosu metylowego i zastosowanych terapii na parametry oceny układu antyoksydacyjnego w mózgu, w 2 godz. po zatruciu" i podtytułem „Poziom glutationu" (Wykres 11).*

Wyniki prezentowane na Wykresie 11. ukazują ważne efekty działania N-acetylocysteiny na tle pozostałych farmakologicznych czynników terapeutycznych zastosowanych w układzie przeciwdziałań toksycznym wpływom pirymifosu, trwającym w czasie 2 godzin, na układ obrony antyoksydacyjnej mózgowia, warunkowany aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, a mierzony zdolnością do utrzymania na wysokim poziomie homeostatycznym stężenia glutationu i zapewnienia stabilizacji funkcjonalnej układu antyoksydacyjnego. Spadek stężenia glutationu pod wpływem działania pirymifosu o ok. 70% w porównaniu z kontrolą, zmniejszał się pod wpływem działania N- acetylocysteiny do ok. 30%. Podobne efekty ochronnego działania wobec glutationu wykazało skojarzone działanie N-acetylocysteiny z atropiną i obidoksymem (Wykres 11, Tabela 5). Wykazane więc to ciekawe i ważne działanie poznawcze N-acetylocysteiny posiada również znaczenie aplikacyjne w terapii i prewencji zatruć związkami fosforoorganicznymi. Należy podkreślić, iż podobne efekty działania korzystnego N-acetylocysteiny wobec glutationu stwierdzono w warunkach przedłużonego działania pirymifosu do 72 godzin (Wykres 15, Tabela 6). Przedłużone działanie pirimifosu do 14 dni zachowało ten korzystny efekt stymulacji mechanizmu zapewniającego utrzymanie wyższego stężenia glutationu, świadczącego o większej zdolności działania antyoksydacyjnego (Wykres 19, Tabela 7).

Antyoksydacyjne działanie glutationu powiązane jest z detoksykacją nadtlenków organicznych, a w tym także powstających w trakcie peroksydacji lipidów wodoronadtlenków lipidowych, których stężenie jest uznane za wykładnik stanu układu antyoksydacyjnego, determinowanego przez glutation. Koncentracja zawartości wodorotlenków lipidowych była badana w identycznym układzie metodycznym, jaki zastosowano w ocenie zmian obejmujących

mózgowiową zawartość glutationu w ekspozycji myszy na działanie pirymifosu. Efekty działania pirymifosu w czasie dwu i 72 godzin oraz 14 dni przedstawiono na Wykresie 12, 16 i 20 oraz w Tabeli 5, 6 i 7. N-acetylocysteina obniżała zawartość wodorotlenków lipidowych mózgowia w każdym układzie zróżnicowanego długością czasu, toksycznego działania pirymifosu. Niezależnie od indywidualnego działania N-acetylocysteiny, czy skojarzonego z atropiną lub z obidoksymem, to efekty obniżania poziomu nadtlenków lipidowych mózgowia stwierdzone zostały w każdym podejściu metodycznym o różnym czasie toksycznego działania pirymifosu.

Z grupy enzymatycznych antyoksydantów wybrano katalazę i nadtlenkową dysmutazę do oceny stopnia udziału N-acetylocysteiny w aktywacji i stabilizacji układu antyoksydacylnrgo w warunkach ostrego i podostrego działaniu pirymifosu u myszy. N-acetylocysteina działająca indywidualnie oraz w skojarzonym układzie z atropiną i obidoksymem stymulowała wzrost aktywności katalazy zarówno w indywidualnym jak i skojarzonym układzie (Wykres 13 , 17 oraz Tabela 5, 6). Ten korzystny wpływ N-acetylocysteiny na aktywność katalazy przewyższał wartości indywidualnie i w skojarzeniu działając z atropiną i obidoksymem. Warto podkreślić, iż efekt ten był zaznaczony jeszcze w układzie 14 dni działania toksycznego pirimifosu w formie tendencji, lecz bez potwierdzenia istotności statystycznej różnicy między średnimi (Tabela 7).

W odniesieniu do nadtlenkowej dysmutazy stwierdzono duże podobieństwo w zmianach aktywności w porównaniu do zmian aktywności katalazy w identycznych układach doświadczalnego działania N-acetylocysteiny i pirymifosu (Wykres 14, 18, 22 oraz Tabela 5, 6,7). Należy jednak dodać, iż różnice wartości średnich aktywności dysmutazy ponadtlenkowej po 14 dniach toksycznego działania pirymifosu wskazywały na utrzymanie tej tendencji zmian do 14 dnia działania pirymifosu, mimo finalnego braku potwierdzenia statystycznej istotności tych różnic. Różnice te były jednak mniejsze niż porównywalne, a wykazane w badaniu aktywności katalazy (Tabela 7).

W uogólnieniu należy stwierdzić, iż zwarta prezentacja rezultatów badań w formie 22 wykresów oraz 7 tabel satysfakcjonuje spełnienie sześciu szczegółowych i ogólnego celu badawczego, potwierdzone w sześciu wnioskach, którym nadano merytoryczną zasadność, powiązaną ściśle z wynikami badań własnych ocenianej rozprawy (Rozdział 6. Wnioski).

W ocenie treści zawartych w rozdziale 5 (Dyskusja) podkreślenia wymaga poprawność interpretacyjna własnych wyników, wraz z nadaniem im narracyjnej i porównawczej oraz konfrontacyjnej zasadności z wynikami współczesnych publikacji ostatnich lat piśmiennictwa światowego.

Finalne treści rozprawy to Streszczenie (Rozdział 7) i Summary (Rozdział 8).

W skład piśmiennictwa (Rozdział 9) wchodzą 226 dobrze dobrane publikacje, obejmujące zarówno historyczne wyniki badań, jak również specjalistyczne prace światowego piśmiennictwa, współcześnie publikowane z zakresu fizjologicznych mechanizmów utrzymania i regulacji homeostatycznej stabilnego statusu oksydacyjno-antyoksydacyjnego komórek. Z wyników badań rozprawy można postulować pozytywne oddziaływanie N-acetylocysteiny nie tylko w odniesieniu do pirymifosu i związków fosforoorganicznych, jako pestycydów, ale także w wielu jednostkach chorobowych o nasilonym stresie oksydacyjnym i stosowaniu specyficznych terapii farmakologicznych.

W ocenie merytorycznej całości zawartych treści w ocenianej rozprawie, jej układu redakcyjnego, oryginalnych i nowatorskich wyników badań, podkreślić należy zaprezentowanie przez Autora szerokiego zakresu wiedzy teoretycznej i praktycznej wiedzy metodyczno-badawczej, wskazującej na umiejętność samodzielnego prowadzenia badań a także trafnego i ważnego podejścia koncepcyjnego. Skojarzone natomiast podejście terapeutyczne włączające N-acetylocysteinę do stosowanych dotychczas środków, stanowi możliwość nowego podejścia w postępowaniach terapeutycznych. Zastosowany model metodyczny w badaniach tej rozprawy ma tę dodatkową wartość, że można go stosować w podobnych koncepcyjnie, a zmienionych dostosowawczo do uwarunkowań i oczywistych ograniczeń w podejściach badawczych i terapeutycznych u innych gatunków zwierząt, włącznie z terapią farmakologiczną ludzi.

Z przyjemnością stwierdzam, że nie mam istotnych uwag krytycznych w odniesieniu do rozprawy doktorskiej mgr inż. Piotra Adamczuka, a błędy literowe i niektóre określenia niezręczne są do przemilczenia.

Merytorycznie rozprawa odpowiada w pełni wymogom stawianym ustawowo pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dziennik Ustaw z 2021 r., poz.478).

Na tej podstawie stwierdzam, iż dysertacja doktorska mgr inż. Piotra Adamczuka spełnia warunki ustawy o stopniach doktorskich i na tej podstawie przedkładam wniosek o dopuszczenie Autora rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 18. 06. 2023 r. Prof. dr hab. Tadeusz Studziński