

Dr hab. Piotr Religa
Associate Professor
Department of Medicine | Karolinska Institutet
171 76 Stockholm |

Stockholm 2018-01-22

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Andrzeja Wasilewskiego:

Aktywność układu opioidowego i kanabinoidowego w patogenezie i terapii wybranych chorób zapalnych i czynnościowych układu pokarmowego

napisana pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Jakuba Fichny

Podstawa opracowania recenzji

Podstawą opracowania recenzji jest pismo Prof. Dr hab Agnieszki Wierzbowskiej, Prodziekan ds Nauki, Wydziału Lekarskiego UM w Łodzi z dnia 05.01.2018 w sprawie przyjęcia mandatu recenzenta pracy doktorskiej. Wyniki mojej oceny przedstawiam w poniższej recenzji.

Recenzowany doktorat obejmuje pięć prac oryginalnych, w których mgr Andrzej Wasilewski jest pierwszym autorem oraz jedną pracę przeglądową. Przedstawiona monografia stanowi skrócone podsumowanie prac:

I. Wasilewski, A.; Leśniak, A.; Bujalska-Zadrozny, M.; Sadowski, B.; Fichna, J.;

Sacharczuk M. The effect of opioid agonists and antagonists on gastrointestinal motility in mice selected for high and low stress-induced analgesia. *Neurogastroenterology and Motility* 28(2): 175-185, 2016

II. Wasilewski, A.; Misicka, A.; Sacharczuk, M.; Fichna, J. Prosecretory effect of loperamide in ileal and colonic mucosae of mice displaying high or low swim stress-induced analgesia associated with high and low endogenous opioid system activity. *Neurogastroenterology and Motility* 2017 doi: 10.1111/nmo.13166

III. Wasilewski, A.; Misicka, A.; Sacharczuk, M.; Fichna, J. Modulation of the endocannabinoid system by the fatty acid amide hydrolase, monoacylglycerol and diacylglycerol lipase inhibitors as an attractive target for secretory diarrhoea therapy. *Journal of Physiology and Pharmacology* 68(4): 591-596, 2017

IV. Wasilewski, A.; Krajewska, U.; Owczarek, K.; Lewandowska, U.; Fichna, J. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor PF-3845 reduces viability, migration and invasiveness of human colon adenocarcinoma Colo-205 cell line: an in vitro study.

Acta Biochimica Polonica 64(3): 519-525, 2017

V. Wasilewski, A; Lewandowska, U.; Mosinska, P.; Watala, C.; Storr, M.; Fichna, J.;

Venkatesan, T. Cannabinoid Receptor Type 1 and mu-Opioid Receptor

Polymorphisms Are Associated With Cyclic Vomiting Syndrome. *American*

Praca przeglądowa:

VI. Wasilewski, A.; Storr, M.; Zielińska, M.; Fichna, J. Role of G protein-coupled orphan receptors in intestinal inflammation: novel targets in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* 21(3): 666-673, 2015

W przesłanej monografii autor przedstawił podsumowanie metod użytych w doktoracie, oraz podsumowanie uzyskanych wyników.

Ocena wyboru tematu pracy, celu i hipotez badawczych

Autor podjął w rozprawie próbę analizy związku pomiędzy zróżnicowaniem aktywności (ang. *endogenous opioid system*; EOS i endogennym układem kanabinoidowy (ang. *endocannabinoid system*; ECS) a jego wpływem na motorykę przewodu pokarmowego, przez nabłonkowy transport jonów w jelicie cienkim i grubym oraz wzrost i przeżywalność komórek nowotworowych linii Colo-205. Autor badał także rolę zróżnicowanej aktywności EOS i ECS w patogenezie i terapii chorób zapalnych przewodu pokarmowego. Badania te zostały zaplanowane w sposób spójny i zaplanowane jako publikacje. Ponadto autor wyróżnił w monografii cele szczegółowe.

Cel badawczy przyjęty w doktoracie obejmuje cele, które wypełniają kryteria dla prac oryginalnych. W pracy jest przedstawione poprawne wnioskowanie wcześniej uzyskanych wyników i dalsze oparte na oryginalności budowanie celów badawczych.

Ocena poprawności struktury rozprawy oraz jej zawartości merytorycznej

Autor podsumował własną pracę opisując skrótowo metodologię oraz wyniki:

Materiały i metody: Do badań w obrębie EOS wykorzystano dwie linie myszy selekcyonowane rozbieżnie w kierunku wysokiej (ang. *high analgesia*; HA) i niskiej (ang. *low analgesia*; LA) analgezji postresowej (ang. *stress-induced analgesia*; SIA), które charakteryzują się odpowiednio wrodzoną hiperaktywnością i normoaktywnością układu opioidowego. Do badań wykorzystano wybranych agonistów i antagonistów receptorów opioidowych, wykazujących działanie ośrodkowe (morfina, nalokson) lub obwodowe (loperamid, metylojodek naloksonu). Dokonano oceny wpływu wybranych agonistów i antagonistów na motorykę przewodu pokarmowego myszy linii HA i LA *in vivo* oraz scharakteryzowano ich efekt w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych. Oceniono również wpływ agonistów i antagonistów na przez nabłonkowy transport jonów w jelicie cienkim i grubym *in vitro* z wykorzystaniem komórek Ussinga. Do badań w obrębie ECS wykorzystano związki PF-3845, JZL-184 i RHC-80267, będące inhibitorami hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych (ang. *fatty acid amide hydrolase*; FAAH), lipazy monoacyloglicerolu (ang. *monoacylglycerol lipase*; MAGL) i lipazy diacyloglicerolu (ang. *diacylglycerol lipase*; DAGL), biorących udział w syntezie i degradacji kanabinoidów. Oceny działania wybranych inhibitorów dokonano *in vitro* z wykorzystaniem komórek Ussinga oraz w ludzkim modelu komórkowym gruczołakoraka okrężnicy (linia Colo-205). Badanie wariantów polimorficznych w obrębie EOS i ECS wykonano na ludzkim materiale genetycznym uzyskanym z próbek śliny pacjentów z CVS, przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie

rzeczywistym – Real-Time PCR i oligonukleotydowych sond znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym, odpowiednio VIC/FAM na końcu 5'.

Wyniki badań: W badaniach z wykorzystaniem myszy linii HA i LA wykazano, że różnice w aktywności EOS odpowiadają za zmiany motoryki przewodu pokarmowego. W badaniach przy użyciu komór Ussinga zaobserwowano prosekrecyjny efekt działania loperamidu u myszy linii HA oraz prosekrecyjny efekt naloksonu u obu linii myszy, co wskazuje, że wrodzone różnice w aktywności EOS mogą wpływać na skuteczność terapii podczas leczenia opioidami. Ponadto wykazano, że hamowanie aktywności enzymów FAAH i MAGL wywołuje efekt antysekrecyjny. Hamowanie FAAH zmniejsza również żywotność, migrację i inwazyjność ludzkich komórek nowotworowych linii Colo-205. Udowodniono również bezpośrednią korelację między zmianami genetycznymi w genach kodujących receptory EOS i ECS a ryzykiem zachorowania na CVS oraz skutecznością stosowanej terapii.

Wnioski: Wykazano, że zróżnicowana aktywność endogennego układu opioidowego i kanabinoidowego może odgrywać ważną rolę w patofizjologii oraz przebiegu chorób zapalnych i czynnościowych przewodu pokarmowego. Ponadto wykazano, że modulowanie aktywności EOS i ECS może stanowić nowy cel farmakologiczny w leczeniu tych chorób.

W prezentowanej pracy doktorskiej wykorzystano głównie modele zwierzęce, mysie do badania agonistów i antagonistów receptorów opioidowych. Na modelach tych badano pasaż przewodu pokarmowego. Innym rodzajem modelu jest model, który został wykorzystany do badania biegunki. Ponadto były także wykorzystane modele *in vitro*. W tych modelach badano wyizolowane jelito. Część doświadczeń przeprowadzono na hodowlach komórkowych. W badaniach także wykorzystano techniki biologii molekularnej takie jak PCR.

Ważne jest podkreślenie różnorodności użytych metod do weryfikacji hipotezy badawczej. Dzięki temu prezentacja wyników oraz wnioskowanie jest prawidłowe. Strukturę rozprawy doktorskiej należy uznać za poprawną, a zastosowaną metodologię, sposób opisanie i analizy wyników oraz wnioskowania za spełniający kryteria pracy doktorskiej.

Ocena wykorzystanych materiałów źródłowych oraz strony formalnej rozprawy

W przedstawionej monografii, która liczy 60 stron wykorzystano 50 cytowań. Należy zauważyć, że całkowita liczba cytowanych prac jest znacznie większa, gdyż obejmuje cytowania w każdej publikacji i np. liczba cytowań w pracy poglądowej *Role of G protein-coupled orphan receptors in intestinal inflammation: novel targets in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* 21(3): 666-673, 2015* wynosi 141. Prace te były wcześniej recenzowane w czasopiśmie o średnim i wysokim ang. Impact factor IF. Wskazuje to także na to, że znalazły uznanie u innych badaczy będących ekspertami w dziedzinie.

Syntetyczna ocena rozprawy i konkluzja końcowa

Rozprawa doktorska mgr. Andrzeja Wasilewskiego stanowi oryginalne rozwiązanie hipotezy naukowej. Oparta jest na opublikowanych pracach naukowych, w których doktorant jest pierwszym autorem. Należy podkreślić, że wszystkie publikacje pochodzą z czasopism o średnim i wysokim IF. Jest to standard jak na najlepszych uniwersytetach medycznych.

Jedyny niedosyt czuję w sposobie prezentowania metodologii i prowadzenia dyskusji w części monograficznej doktoratu. Uważam, że prezentowana metodologia w monografi, powinna zawierać dyskusję z wyjaśnieniem dlaczego taka metodyka została wykorzystana oraz jakie są alternatywne metody. Ponadto w monografi brakuje krytycznej dyskusji osiągniętych wyników, ich znaczenia dla przyszłego rozwoju nauki oraz planowanych badań. Sądzę, że doktorant może odnieść się do tych problemów podczas publicznej obrony doktoratu i zaprezentować swoje poglądy.

W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr. Andrzeja Wasilewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję o **przyznanie wyróżnienia** dla prezentowanej pracy doktorskiej.

Z poważaniem

Piotr Religa

