



Kraków 29.08.2022

**Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika
Zakład Farmakologii Bólu
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**lek. med. Agata Szymaszkiewicz
zatytułowanej**

**„Rola endogennego układu opioidowego w patogenezie i leczeniu
zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego
ze szczególnym uwzględnieniem wpływu starzenia się organizmu”**

Przedstawiona do oceny praca doktorska lek. med. Agaty Szymaszkiewicz wykonana pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. n. med. Jakuba Fichny oraz Promotora pomocniczego dr hab. n. med. Marty Zielińskiej, bardzo dobrze wpisuje się w tematykę badawczą Zakładu Biochemii, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego pojawiają się zarówno w zespole jelita drażliwego, w biegunkach czynnościowych, a także w zaparciach czynnościowych oraz również są wywołane przez leki opioidowe. Badania ostatnich lat sugerują związek pomiędzy zaburzeniami w funkcjonowaniu endogennego układu opioidowego a występowaniem chorób zapalnych jelit, jednakże dotychczas opublikowane dane nie uwzględniają tak ważnego aspektu jakim jest starzenie się organizmu. Natomiast, najnowsze dane wskazują, że aż około 20% pacjentów w wieku podeszłym zmaga się z zaparciami o podłożu czynnościowym. Dlatego w mojej ocenie tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej wydaje się bardzo trafna i potrzebna.

Celem rozprawy doktorskiej było zbadanie znaczenia endogennego układu opioidowego w patogenezie i leczeniu zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego z wykorzystaniem modeli zwierzęcych umożliwiających ocenę perystaltyki przewodu pokarmowego oraz co ważne

materiału biologicznego pobranego od pacjentów z zaparciami o podłożu czynnościowym. Prowadzone badania są niezwykle cenne, ponieważ ich wyniki mogą zostać wykorzystane w codziennej praktyce klinicznej.

Cykl prac stanowiący podstawę postępowania doktorskiego, składa się z 4 publikacji (2 przeglądowych oraz 2 oryginalnych). Doktorantka przedstawiła oświadczenia współautorów świadczące o Jej znaczącym udziale w przygotowaniu publikacji będących podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej. Ponadto, wszystkie badania zostały wykonane zgodnie z zasadą 3R po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (#47/ŁB73/2017) oraz Komisji Bioetyki ds. Badań na Ludziach (RNN/288/17/KE).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z typowych rozdziałów takich jak: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wprowadzenie, założenia i cele badawcze, materiały i metody, publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, wyniki i dyskusja, oraz podsumowanie. W kolejnych rozdziałach przedstawiono źródła finansowania badań, spis bibliografii oraz uzyskane zgody Komisji Etycznej i Bioetycznej, a także oświadczenia współautorów. Dzięki temu lek. med. Agata Szymaszkiwicz uzyskała logiczny układ i poprawny styl w swojej pracy. Pragnę podkreślić, że zarówno sposób dyskusji wyników opublikowanych w 2 oryginalnych pracach, jak również cytowania literatury wskazują na bardzo dobrze opanowaną przez Doktorantkę umiejętność pracy naukowej.

W pierwszym rozdziale, czyli we Wprowadzeniu, Doktorantka dokonuje w sposób klarowny przeglądu literaturowego i opisuje najpierw zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego, a następnie możliwości ich leczenia. Następnie omawia endogenne układy opioidowe, a w szczególności jego znaczenie w leczeniu zaburzeń czynnościowych jelit, z uwzględnieniem zjawiska opioidowej tolerancji i fizycznej zależności.

W rozdziale drugim Doktorantka przedstawia szczegółowe bardzo ambitne założenia pracy. Celem badań przeprowadzonych u myszy było określenie 1) wpływu interakcji pomiędzy receptorami opioidowymi i kanabinoidowymi na rozwój tolerancji i fizycznej zależności na działanie związków opioidowych w przewodzie pokarmowym, 2) wpływu starzenia się organizmu na perystaltykę przewodu pokarmowego, 3) zmian zachodzących z wiekiem w aktywności endogenne układu opioidowego w przewodzie pokarmowym poprzez scharakteryzowanie wpływu selektywnych agonistów receptorów opioidowych na funkcje przewodu pokarmowego w warunkach *in vitro* i *in vivo*, oraz 4) ekspresji składowych endogenne układu opioidowego w różnych odcinkach przewodu pokarmowego. Ponadto co ważne Doktorantka także u pacjentów zmagających się z zaparciami o podłożu czynnościowym postanowiła zbadać zależne od wieku zmiany receptorów opioidowych w jelicie grubym.

W rozdziale trzecim Doktorantka zawarła najistotniejsze bardzo pomocne informacje dotyczące metodyki badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych, a także w materiale ludzkim. Opisała pokrótce jednakże bardzo klarownie, szczegółowo omówione już w publikacjach będących podstawą niniejsze rozprawy doktorskiej, sposoby oceny zmian zachodzących w przewodzie pokarmowym, zastosowane w badaniach oznaczenia molekularne, a także analizy statystyczne.

W rozdziale czwartym Doktorantka zamieściła cztery prace będące podstawą Jej rozprawy doktorskiej, co istotne we wszystkich jest Ona pierwszym autorem a ukazały się one w renomowanych czasopismach. W 2016 roku powstała pierwsza praca przeglądowa pt. „*The role of MOP and DOP receptors in treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome*”, która została opublikowana w czasopiśmie Medicinal Chemistry (IF=2,661, MNiSW=30 pkt.), a następnie w 2021 druga praca przeglądowa w czasopiśmie Postępy Biochemii pt. „*Ocena zmian zachodzących wraz z wiekiem w jelitowym układzie nerwowym i ich wpływ na perystaltykę przewodu pokarmowego*” (IF=0, MEiN=70 pkt.). Również w 2021 roku została opublikowana pierwsza praca oryginalna, która ukazała się w czasopiśmie Pharmacological Reports pt. „*Critical interactions between opioid and cannabinoid receptors during tolerance and physical dependence development to opioids in the murine gastrointestinal tract: proof of concept*” (IF=3,027, MEiN=70 pkt.). Natomiast w roku 2022 ukazała się druga praca oryginalna w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences pt. „*The involvement of the endogenous opioid system in the gastrointestinal aging in mice and humans*” (IF=5,924, MEiN=140 pkt.). Sumaryczny Impact Factor czasopism w których opublikowane zostały wyżej wymienione prace wynosi 11,612, a łączna ilość punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki wynosi 310.

W pierwszym artykule przeglądowym Doktorantka szczegółowo omawia budowę, działanie i lokalizację receptorów MOP i DOP w organizmie, a także ich rolę w leczeniu zespołu jelita drażliwego, natomiast w drugim zwraca uwagę na wysoką częstość zapań o podłożu czynnościowym wśród pacjentów w wieku podeszłym, omawia czynniki wpływające na spowolnienie perystaltyki przewodu pokarmowego u osób starszych oraz wskazuje na złożoność tego problemu. Pragnę podkreślić, że w tych pracach przeglądowych uwagę zwracają starannie opracowane figury i schematy, a także odniesienia literaturowe zarówno do pierwszych badań dotyczących tej tematyki jak i do najnowszego piśmiennictwa. W rozdziale piątym Doktorantka w sposób wyczerpujący wskazuje na najistotniejsze informacje zawarte w tych dwóch opublikowanych pracach przeglądowych. Opracowanie przez lek. med. Agatę Szymaszkiewicz prac przeglądowych niewątpliwie stało się dobrą podstawą do rozpoczęcia badań eksperymentalnych, które zostały następnie opublikowane w dwóch pracach oryginalnych. W kolejnych podrozdziałach piątego rozdziału Doktorantka logicznie pokrótce omawia,

interpretuje i dyskutuje rezultaty opublikowane w tych dwóch pracach oryginalnych. Niewątpliwie Doktorantka zrealizowała wszystkie ambitne cele wyszczególnione w rozdziale drugim. W pierwszej pracy eksperymentalnej wykazała, że jednoczasowa aktywacja receptorów opioidowych i kanabinoidowych z wykorzystaniem mieszanego agonisty PR-38 nie prowadzi do rozwoju tolerancji i fizycznej zależności na działanie opioidów w jelicie cienkim myszy, a zablokowanie jego komponenty kanabinoidowej odwraca obserwowany efekt. Pozwoliło to na wysunięcie ważnej hipotezy, że właśnie nieselektywne związki opioidowe o podobnym mechanizmie działania jak PR-38 mogą stanowić interesującą opcję terapeutyczną w leczeniu chorób przewodu pokarmowego.

W drugiej pracy eksperymentalnej lek. med. Agata Szymaszkiewicz scharakteryzowała zmiany zachodzące w obrębie endogennego układu opioidowego na poziomie czynnościowym i molekularnym pod wpływem starzenia się organizmu. W pierwszych eksperymentach z tego cyklu Doktorantka dowiodła, że wraz z wiekiem perystaltyka przewodu pokarmowego myszy ulega spowolnieniu. Udowodniła, również że zahamowanie pracy przewodu pokarmowego dotyczy przede wszystkim górnego odcinka - wykazała opóźnienie procesu opróżniania żołądka oraz wydłużenie pasażu treści pokarmowej w jelicie cienkim w grupie starszych myszy. Ponadto, dowiodła że starzenie się organizmu wpływa również na sekrecję elektrolitów do światła jelita w dystalnej części okrężnicy. W kolejnym cyklu eksperymentów dokonała analizy zmian zachodzących z wiekiem w aktywności endogennego układu opioidowego w przewodzie pokarmowym poprzez scharakteryzowanie wpływu selektywnych agonistów receptorów opioidowych MOP (DAMGO), DOP (DPDPE) i KOP (U50488) na funkcje przewodu pokarmowego myszy w warunkach *in vitro* i *in vivo* oraz dokonała wnikliwej oceny ekspresji składowych endogennego układu opioidowego w różnych odcinkach przewodu pokarmowego myszy. Szczególnie ciekawy wydaje się wynik dotyczący obserwowanej zwiększonej ekspresji receptora DOP u starszych osobników, co może być zjawiskiem wtórnym do osłabionej sygnalizacji związanej z DOP w obrębie przewodu pokarmowego. Niemniej jednak badania dotyczące procesów nocycepcji wskazują, że to właśnie DOP spośród receptorów opioidowych jest ważnym celem farmakologicznym dla efektów analgetycznych ze względu na wolniej rozwijającą się tolerancję na działanie jego ligandów, w tym DPDPE. Jest to receptor, co podkreśla w swojej pracy Doktorantka, ważny w przewodzie pokarmowym ze względu na jego udział w regulacji procesów sekrecji i absorpcji. Dotychczas stosowane leki opioidowe są nieselektywne i wykazują największe powinowactwo do receptora MOP. Ciekawa jestem opinii Doktorantki czy w świetle Jej wyników, a także dostępnej literatury należałoby poszukiwać przyszłych leków w gronie selektywnych czy nieselektywnych ligandów receptorów opioidowych

i które receptory uważa za najkorzystniejsze i za najbardziej perspektywiczne cele farmakologiczne dla przyszłej terapii.

Co bardzo ważne i zarazem nieczęsto spotykane w pracach doktorskich lek. med. Agata Szymaszkiewicz do swoich badań włączyła również pacjentów. U chorych zmagających się z zaparciami o podłożu czynnościowym podczas badania endoskopowego ze wskazań klinicznych, pobrany został wycinek tkankowy z części zstępującej okrężnicy. Z zabezpieczonych tkanek Doktorantka wyizolowała materiał w którym oznaczyła poziom ekspresji genów kodujących receptory opioidowe. Chociaż nie uzyskała istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami, zapewne z powodu zbyt małej i niejednorodnej liczby pacjentów, mam nadzieję, że te ważne badania będą kontynuowane. W mojej ocenie samo podjęcie się tego typu trudnych badań klinicznych w rozprawie doktorskiej jest godne uznania.

Podsumowując, w niniejszej rozprawie doktorskiej z całą pewnością zaprezentowano przekonywujące dowody na to, że poznanie mechanizmów działania endogennych systemów opioidowych ma ogromne znaczenie w projektowaniu narzędzi farmakologicznych mogących znaleźć w przyszłości zastosowanie w leczeniu chorób przewodu pokarmowego. Z przyjemnością, zatem pragnę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca autorstwa lek. med. Agaty Szymaszkiewicz zatytułowana „Rola endogennego układu opioidowego w patogenezie i leczeniu zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego ze szczególnym uwzględnieniem wpływu starzenia się organizmu” spełnia określone ustawowo warunki stawiane rozprawie doktorskiej, dlatego mam zaszczyt wnieść do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. med. Agaty Szymaszkiewicz (panieńskie Jarmuż) do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto pragnę podkreślić, że Doktorantka w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej uzyskała kilka bardzo prestiżowych nagród, a mianowicie została laureatką programu Diamentowy Grant (tytuł projektu: „*Badanie zależności między zaburzeniami perystaltyki jelit występującymi wraz z wiekiem a zmianami w obrębie endogennego układu opioidowego*” nr 0064/DIA/2017/46) oraz programu L’Oréal dla Kobiet i Nauki. Została również stypendystką uczelnianego grantu w ramach programu Granty UMEDu (tytuł projektu: „*Development of tolerance in the gastrointestinal tract – interactions between cannabinoid and opioid receptors*”, a także beneficjentką nagrody Najlepsi z Najlepszych! 3.0 przyznanej przez Ministerstwo Edukacji i Nauki. Mając na uwadze zarówno istotną wartość merytoryczną pracy, której wyniki zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o łącznym Impact Factor 11,612, jak i Jej zaangażowanie w prowadzone badania potwierdzone już licznymi nagrodami składam wniosek o przyznanie Doktorantce wyróżnienia.



Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika