

ROZPRAWA DOKTORSKA

Lek. Agata Szymaszkiewicz

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

Promotor: prof. dr hab. n. med. Jakub Fichna

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Marta Zielińska, prof. uczelni

Zakład Biochemii

Wydział Lekarski

Łódź 2022

Streszczenie w języku polskim

Wstęp: Zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego to grupa chorób o zdefiniowanym obrazie klinicznym bez towarzyszących odchyłeń w badaniach dodatkowych, które wskazywałyby na ich organiczną przyczynę, do której zalicza się m.in. zespół jelita drażliwego (*ang.* irritable bowel syndrome, IBS), zaparcia czynnościowe (*ang.* functional constipation, FC), biegunki czynnościowe (*ang.* functional diarrhea, FD) oraz zaparcia wywołane opioidami.

Wskazuje się, że około 20% pacjentów w wieku podeszłym zmagają się z zaparciami o podłożu czynnościowym. Warto podkreślić, że pod wpływem starzenia się organizmu w przewodzie pokarmowym dochodzi do szeregu zmian (m.in. upośledzenia motoryki jelit, uszkodzenia bariery jelitowej, nasilenia stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego, zakłócenia komunikacji międzyneuronalnej w obrębie jelitowego układu nerwowego, zaburzenia produkcji i wydzielania hormonów oraz neuropeptydów jelitowych), które skutkują spowolnieniem perystaltyki jelit, a w konsekwencji prowadzą do występowania zaparć.

Prawidłowe działanie przewodu pokarmowego podlega wpływom wielu czynników, m.in. endogennych opioidów (β -endorfin, enkefalin i dynorfin), które wraz z receptorami opioidowymi (*ang.* opioid receptors, ORs): μ (MOP), δ (DOP) i κ (KOP), stanowią endogenne układy opioidowe (*ang.* endogenous opioid system, EOS). Ze względu na udział EOS w regulacji motoryki jelit oraz sekrecji i absorpcji, ligandy ORs stosowane są w terapii zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego. Jednym z wielu istotnych ograniczeń przewlekłego stosowania leków opioidowych jest rozwój tolerancji na ich działanie (tj. stopniowe osłabienie siły ich działania) oraz występowanie fizycznej zależności (tj. gwałtownej odpowiedzi organizmu na nagłe zaprzestanie stosowania leku lub po podaniu związku o działaniu przeciwnym).

Cel naukowy: Celem pracy doktorskiej była ocena roli, jaką odgrywa EOS w patogenezie i leczeniu zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu starzenia się organizmu. Ponadto, ze względu na rosnące znaczenie leków opioidowych w terapii chorób przewodu pokarmowego poddano analizie interakcje pomiędzy ORs i receptorami

kanabinoidowymi (*ang.* cannabinoid receptor, CB) dla rozwoju tolerancji i fizycznej zależności w jelitach. Scharakteryzowano zmiany zachodzące w EOS wraz z wiekiem na poziomie czynnościowym i molekularnym jako przyczyny postępującego pod wpływem starzenia się spowolnienia perystaltyki przewodu pokarmowego w modelach zwierzęcych i w materiale biologicznym uzyskanym od pacjentów z zaparciami o podłożu czynnościowym (IBS-C, FC).

Wyniki: W ramach pracy doktorskiej zwalidowano dwie metody badawcze służące ocenie potencjału leku do rozwoju tolerancji i fizycznej zależności w przewodzie pokarmowym w warunkach *in vitro*. Opracowane metody pozwoliły na wykazanie, że jednoczasowa aktywacja ORs i CB znacząco obniża ryzyko rozwoju wyżej wymienionych zjawisk.

W dalszych eksperymentach potwierdzono, że wraz z wiekiem perystaltyka przewodu pokarmowego u myszy ulega spowolnieniu. Wykazano, że pod wpływem starzenia się dochodzi do zmian w sekrecji jonów do światła jelita grubego. U myszy w wieku 6-, 12- i 18 miesięcy zaobserwowano różnice w odpowiedzi tkankowej na działanie egzogennych agonistów ORs, tj. zmniejszenie skuteczności selektywnych agonistów receptorów MOP i DOP wraz z wiekiem w warunkach *in vitro*. Osłabione działanie agonisty receptora DOP zostało potwierdzone *in vivo* w teście wydalania masy kałowej. Scharakteryzowano ekspresję poszczególnych elementów EOS na poziomie mRNA i białka. Odnotowano, że ekspresja genu *Oprm1*, kodującego MOP, w żołądku i jelicie cienkim w grupie najstarszych myszy była niższa w porównaniu do młodszych osobników; nie stwierdzono różnic w jelicie grubym. Stężenie endogennej β -endorfiny w jelicie grubym było najwyższe w grupie 18 miesięcznych myszy. Podobną zależność zaobserwowano dla *Oprd1*, kodującego DOP: w żołądku i jelicie cienkim, ekspresja tego genu na poziomie mRNA była znacząco niższa w grupie 12- i 18 miesięcznych gryzoni w porównaniu do najmłodszych; bez istotnych różnic w jelicie grubym. Oceniono, że ekspresja receptora DOP na poziomie białka była wyższa u 18 miesięcznych myszy.

Dokonano translacji powyższych wyników do warunków klinicznych. We fragmentach jelita grubego uzyskanych podczas kolonoskopii od pacjentów zmagających się z zaparciami o podłożu czynnościowym oceniono ekspresję genów kodujących OR. Pacjenci zostali podzieleni według

kryterium wieku, tj. poniżej i powyżej 50. roku życia. W badaniu nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami.

Podsumowanie: Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej pozwoliły na lepsze zrozumienie zjawisk tolerancji i fizycznej zależności w przewodzie pokarmowym oraz zmian zachodzących pod wpływem starzenia się przewodu pokarmowego. Uzyskane wyniki mogą w przyszłości przyczynić się do opracowania nowych metod terapeutycznych w chorobach przewodu pokarmowego.

Streszczenie w języku angielskim

Introduction: Functional GI disorders (FGIDs) are well-defined group of diseases classified by gastrointestinal (GI) symptoms that do not have an organic origin. Among FGIDs the following disorders may be distinguished: irritable bowel syndrome (IBS), functional constipation (FC), functional diarrhea (FD) and opioid-induced constipation.

It was estimated that nearly 20% of elderly patients suffer from FC. Noteworthy, there are several important alterations in the GI tract that occur with age (the impairment of the intestinal motility, dysfunction of the intestinal barrier, inflammation, oxidative stress and the disturbances in the intraneuronal communication within the enteric nervous system or in the processes of production and release of hormones and neuropeptides in the intestines).

The functions of the GI tract are controlled by multiple factors, including endogenous opioids (β -endorphins, enkephalins and dynorphins), which together with opioid receptors (ORs): μ (MOP), δ (DOP) and κ (KOP) form the endogenous opioid system (EOS). As EOS participates in the regulation of the GI motility and processes of secretion and absorption, ligands of ORs can alleviate FGIDs-related symptoms. The significant limitations of the chronic therapy with opioids include the development of tolerance (which is a gradual decrease of drug efficacy) and physical dependence (defined as an abrupt response to drug withdrawal or antagonist application).

Aim: The main goal of PhD thesis was to determine the role of EOS in the pathogenesis and treatment of FGIDs, including the impact of aging. In addition, due to a growing significance of opioids in the therapy of the GI diseases, the interactions between the ORs and cannabinoid receptors (CB) in terms of tolerance and physical dependence to opioid drugs in the intestines were evaluated. The functional and molecular alterations in the EOS that occur with age as a potential cause of age-related peristalsis impairment in mouse models and intestinal biopsies from patients diagnosed with IBS-C and FC were also characterized.

Results: As a part of this PhD thesis, two *in vitro* experimental methods that may be used for the fast assessment of the tolerance and physical dependence development in the GI tract were validated. It was assessed that the simultaneous activation of ORs and CB significantly reduces the risk of the adverse effects mentioned above.

In the further steps, the peristalsis impairment that progresses with age was confirmed. Moreover, the age-related alterations in the processes of ions secretion in the colon were evidenced. In 6-, 12- and 18 month old mice significant differences in the tissue response to the action of exogenous ORs ligands *in vitro* (the lower efficacy of selective MOP and DOP agonists) were observed. The reduced activity of a DOP agonist was confirmed *in vivo* in the fecal pellet expulsion test. The expression of particular elements of the EOS was characterized at mRNA and protein levels. It was noted that in the stomach and the ileum, the expression of the *Oprm1*, encoding MOP, was lower in the oldest group of mice

as compared to younger; without any differences in the colon. β -endorphin concentration was the highest in the 18 m.o. mice. Similar expression was observed for *Oprd1*, encoding DOP: in the stomach and ileum it was significantly reduced in 12- and 18 m.o. animals as compared to younger; without difference in the colon. It was assessed that the protein expression of DOP was higher in 18 m.o. than in other groups.

The results of animal studies were translated into the clinical conditions. In the tissue samples from patients with IBS-C and FC collected during colonoscopy, the expression of the genes encoding ORs was evaluated. Participants were assigned to two groups according to the age criteria (below and above 50 years old). There was no difference between the groups.

Conclusion: Research conducted during preparation of this PhD dissertation would support better understanding of the processes underlying the tolerance and physical dependence development as well as the GI aging, including the alterations within the EOS. In the future, our results may contribute to emerging new therapeutic options in FGIDs.