



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Kingi Jaskuły

pt: „*The effect of opioid receptors blockade on atherosclerosis-related processes in ApoE-deficient mice*”

„*Wpływ zablokowania receptorów opioidowych na procesy związane z miażdżycą u myszy z wyłączonym genem ApoE*”

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Genomiki Eksperymentalnej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu pod kierunkiem prof. dr hab. Mariusza Sacharczuka oraz dr Dominika Skiby. Podstawą rozprawy doktorskiej są 2 oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach *Cells* (IF=5,2) i *Biomedicines* (IF=3,9) w 2025 roku oraz publikacja przeglądowa w czasopiśmie *Mediators of Inflammation* (IF=3,9) z 2021 roku:

- Jaskuła K, Nawrocka A, Poznański P, Stachowicz A, Łazarczyk M, Sacharczuk M, Skiba DS. Opioid System Antagonism Alters Vascular Proteome and Collagen Deposition in ApoE^{-/-} Mice. *Cells*. 2025; 14(19):1559. <https://doi.org/10.3390/cells14191559>
- Jaskuła K, Nawrocka A, Poznański P, Stachowicz A, Łazarczyk M, Sacharczuk M, Gaciong Z, Skiba DS. Targeting the Opioid System in Cardiovascular Disease: Liver Proteomic and Lipid Profile Effects of Naloxone in Atherosclerosis. *Biomedicines*. 2025; 13(8):1802. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13081802>
- Jaskuła K, Sacharczuk M, Gaciong Z, Skiba DS. Cardiovascular Effects Mediated by HMMR and CD44. *Mediators Inflamm*. 2021; 2021:4977209. <https://doi.org/10.1155/2021/4977209>

Doktorantka jest pierwszym autorem w/w publikacji a Jej wkład w ich powstanie, jak wynika z załączonych oświadczeń pozostałych współautorów, był znaczący (odpowiednio 55, 51 i 65% dla publikacji 1, 2 i 3) i obejmował udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, wykonaniu i analizie badań laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, napisaniu publikacji oraz przygotowaniu publikacji do druku. Forma rozprawy doktorskiej jest typowa dla tego typu prac, których podstawą są artykuły naukowe. Praca doktorska została przygotowana w języku angielskim, a w 34 stronicowym opracowaniu zawarto następujące podrozdziały: streszczenie w języku angielskim i polskim (po 1 stronie), wprowadzenie (4 strony), hipotezy oraz cele badawcze (1 strona), metodyka (5,5 strony), wyniki badań i ich omówienie (10,5 strony), wnioski (1 strona), piśmiennictwo (10 stron). Do rozprawy załączono tabele (wraz z podpisami) wskazujące zarówno na procentowe udziały jak i wykaz działań poszczególnych autorów uczestniczących w przygotowaniu publikacji stanowiących rozprawę doktorską.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy roli endogennej układu opioidowego w rozwoju i progresji miażdżycy, ze szczególnym uwzględnieniem jego wpływu na przebudowę naczyń krwionośnych, odpowiedź immunologiczną oraz metabolizm lipidów. Miażdżyca obejmuje odkładanie lipidów w ścianie naczynia, aktywację komórek układu odpornościowego oraz zaburzenia struktury macierzy zewnątrzkomórkowej, prowadzące do powstawania niestabilnych blaszek miażdżycowych. Celem pracy było analiza wpływu blokady receptorów opioidowych za pomocą naloksonu (NLX) na molekularne, strukturalne i immunologiczne mechanizmy związane z powstawaniem miażdżycy. Badania wykonano na mysim modelu z wyłączonym (czyli nokautem genu apolipoproteiny E) $ApoE^{-/-}$, który jest powszechnie stosowany w badaniach miażdżycy, obejmując zarówno wczesne, jak i zaawansowane stadium choroby. Analizowano zmiany ekspresji genów związanych z przebudową naczyń i macierzą zewnątrzkomórkową, w tym *Hmmr* oraz genów kodujących różne formy białka kolagenu. Badano także, wpływ naloksonu na subpopulacje limfocytów T w śledzienie w kontekście regulacji odpowiedzi immunologicznej. Dodatkowo oceniono parametry metabolizmu lipidów oraz przeprowadzono analizy histologiczne i proteomiczne aorty oraz wątroby. Uzyskane wyniki wskazują, że blokada układu opioidowego oddziałuje na kluczowe procesy biologiczne istotne dla rozwoju miażdżycy, mimo braku istotnych zmian w wielkości blaszki miażdżycowej po krótkotrwałym leczeniu. Opracowanie podkreśla złożoną i wielokierunkową rolę endogennej układu opioidowego w patogenezie miażdżycy oraz wskazuje na jego potencjalne znaczenie jako nowego celu terapeutycznego w chorobach sercowo-naczyniowych.



OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rozprawę doktorską otwierają jednostronicowe streszczenia w języku angielskim i polskim, które w sposób syntetyczny przedstawiają zakres przeprowadzonych badań oraz ich najważniejsze wyniki. Rozdział *Wprowadzenie*, obejmujący cztery strony, pełni funkcję teoretycznego zarysowania problematyki badawczej, jednak w mojej ocenie jego potencjał nie został w pełni wykorzystany. Jest to szczególnie istotne w kontekście faktu, że Doktorantka jest współautorką zarówno publikacji przeglądowej dotyczącej roli receptorów Hmmer i CD44 w układzie sercowo-naczyniowym (publikacja z 2021 roku), jak i dwóch oryginalnych prac badawczych. We *Wprowadzeniu* można było w znacznie większym stopniu odnieść się do wspomnianej publikacji przeglądowej, która w sposób kompleksowy omawia znaczenie receptorów macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak Hmmer i CD44, w regulacji procesów zapalnych, migracji komórek oraz przebudowy naczyń (mechanizmów kluczowych dla rozwoju miażdżycy). Tymczasem publikacja ta została w pracy doktorskiej przywołana jedynie incydentalnie, w kontekście ryciny ilustrującej rolę tych receptorów, bez szerszego omówienia jej znaczenia dla hipotez badawczych realizowanych w rozprawie. Włączenie jej treści do *Wprowadzenia* pozwoliłoby na lepsze osadzenie badań własnych w szerszym kontekście aktualnego stanu wiedzy oraz podkreślenie ciągłości i konsekwencji prowadzonych przez Doktorantkę badań. Ponadto, we *Wprowadzeniu* można było bardziej szczegółowo przedstawić ogólne zagadnienia metodologiczne i biologiczne związane z zastosowanym modelem badawczym. Myszy ApoE^{-/-} stanowią jeden z najlepiej scharakteryzowanych modeli eksperymentalnych miażdżycy, szeroko wykorzystywany w badaniach nad metabolizmem lipidów, odpowiedzią immunologiczną oraz stabilnością blaszki miażdżycowej. Krótkie, lecz spójne omówienie mechanizmów prowadzących do rozwoju hipercholesterolemii i zmian naczyniowych w tym modelu ułatwiłoby czytelnikowi zrozumienie zasadności doboru zwierząt do badań oraz interpretację uzyskanych wyników. W obecnej formie rozdział *Wprowadzenie* sprawia wrażenie skróconej kompilacji fragmentów wprowadzających z publikacji Doktorantki, zamiast spójnej, autorskiej syntezy wiedzy prowadzącej do jasno sformułowanych celów rozprawy. Bardziej rozbudowane i pogłębione wprowadzenie, uwzględniające zarówno publikację przeglądową z 2021 roku, jak i najnowsze wyniki badań własnych dotyczące wpływu blokady układu opioidowego na proteom naczyń i wątroby oraz metabolizm lipidów, wzmocniłoby merytoryczną strukturę pracy.

W kolejnym rozdziale pracy doktorskiej postawiono cztery *hipotezy badawcze* oraz odpowiadające im cztery *cele* szczegółowe, które logicznie wynikają z przeglądu literatury oraz dotychczasowych badań własnych Autorki. Hipotezy dotyczą wpływu blokady układu opiodowego na metabolizm lipidów, przebudowę naczyń, zmiany proteomiczne w aorcie i wątrobie oraz regulację ekspresji genu *Hmmr* na różnych etapach rozwoju miażdżycy. Sformułowane cele są jasno określone i umożliwiają kompleksową ocenę skutków farmakologicznej inhibicji receptorów opiodowych w modelu myszy ApoE^{-/-}, obejmując zarówno wczesne, jak i zaawansowane stadium choroby.

Rozdział *Material i metody* został opracowany w sposób szczegółowy i obejmuje szerokie spektrum nowoczesnych technik badawczych, adekwatnych do postawionych hipotez, w tym analizy molekularne, histologiczne, cytometrię przepływową, ocenę profilu lipidowego oraz zaawansowane badania proteomiczne metodą chromatografii cieczowej w połączeniu z analizą w spektrometrze mas. Zastosowane procedury są poprawne metodologicznie, dobrze udokumentowane i zgodne z aktualnymi standardami badań eksperymentalnych. Na szczególne podkreślenie zasługuje kompleksowość podejścia badawczego oraz konsekwentne wykorzystanie tego samego schematu doświadczalnego w analizie zmian naczyniowych, immunologicznych i metabolicznych. Jednocześnie należy zauważyć, że w niektórych podrozdziałach opis metod jest w znacznej mierze identyczny, a miejscami wręcz dosłowny, z opisami zamieszczonymi w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Dotyczy to w szczególności charakterystyki zwierząt doświadczalnych, schematu podawania naloksonu, procedur izolacji RNA i analizy ekspresji genów, barwień histologicznych oraz metodologii analiz proteomicznych. Choć formalnie jest to dopuszczalne w przypadku prac opartych na cyklu publikacji, to w rozprawie doktorskiej można było oczekiwać większego stopnia redakcyjnego przetworzenia tekstu, jego ujednolicenia stylistycznego oraz wyraźniejszego zaakcentowania elementów metodologicznych specyficznych dla niniejszej pracy, w odróżnieniu od wcześniej opublikowanych badań. W konsekwencji rozdział *Material i metody* sprawia momentami wrażenie kompilacji fragmentów opublikowanych artykułów, a nie w pełni autonomicznego opisu zaprojektowanego eksperymentu. Bardziej syntetyczne przedstawienie standardowych procedur oraz wyraźniejsze wskazanie różnic i uzupełnień w stosunku do wcześniejszych publikacji Autorki zwiększyłoby przejrzystość tej części rozprawy i podkreśliło jej spójność jako całościowego opracowania doktorskiego. Dodatkowo w opisie tej części pracy pojawiły się pytania i proszę o ich wyjaśnienie:

- 1) w pkt. 4.4 dotyczącym barwień próbek wątroby oraz aorty oraz w rozdziale 4.8 dotyczącym analizy makrofagów nie doprecyzowano czy badania wykonano dla obu



grup wiekowych zwierząt. W rozdziale 4.8 napisano, że użyto odpowiednich kontroli pozytywnych i negatywnych - jakie to były kontrole?

- 2) również w opisie barwienia Oil Red O, wskazano, że analizy ilościowe były wykonywane przez dwóch niezależnych badaczy w celu zwiększenia wiarygodności uzyskiwanych wyników. Takie podejście jest zgodne z zasadami dobrej praktyki naukowej i znajduje uzasadnienie metodologiczne, szczególnie w przypadku analiz półilościowych i ocen obciążonych elementem subiektywnym. Jednak sposób sformułowania tego fragmentu może budzić pewne wątpliwości w kontekście wiodącej roli Doktorantki jako głównego wykonawcy badań. W rozprawie doktorskiej warto byłoby wyraźniej zaznaczyć, że Doktorantka odpowiadała za zasadniczą część analiz, natomiast udział drugiego badacza miał charakter weryfikacyjny i kontrolny, a nie równorzędny, co pozwoliłoby jednoznacznie podkreślić jej samodzielny wkład w realizację pracy
- 3) dlaczego w rozdziale 4.9 nie wskazano jednoznacznie wieku zwierząt wykorzystanych do analiz proteomicznych (LC-MS/MS), skoro z treści publikacji wynika, że badania te przeprowadzono wyłącznie u 36-tygodniowych myszy *ApoE^{-/-}*. Z jakich powodów zrezygnowano z wykonania analiz proteomicznych u młodych, 8-tygodniowych zwierząt, mimo że rozprawa zakłada porównanie wczesnego i zaawansowanego stadium miażdżycy?

W rozdziale *Wyniki* Doktorantka opisuje uzyskane wyniki, gdzie szczególnie cennym osiągnięciem jest wykazanie, że blokada receptorów opioidowych naloksonem prowadzi do spójnego i istotnego obniżenia ekspresji genu *Hmmr* w aorcie, niezależnie od stadium miażdżycy. Wynik ten należy uznać za nowatorski, gdyż rola tego genu w przebudowie naczyń oraz w kontekście miażdżycy nie była dotąd dogłębnie analizowana. Doktorantka, trafnie sugeruje potencjalny udział *Hmmr* w regulacji procesów przebudowy ściany naczyniowej, co może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań. Na uwagę zasługują również wyniki dotyczące zależnych od wieku efektów naloksonu na ekspresję genów kodujących białka kolagenu. Wykazanie odmiennych odpowiedzi u młodych i starszych zwierząt wskazuje na dojrzałość interpretacyjną Doktorantki i świadczy o właściwym uwzględnieniu fizjologii starzenia w analizie procesów miażdżycowych. W tym miejscu, Doktorantka nie uniknęła jednak błędu, opisując, że ekspresja genu *Col3a1* była obniżona u starszych myszy, podczas gdy w publikacji nr 1 (Fig 5) wskazano podwyższenie ekspresji tego genu (co zresztą w dalszej

części dyskusji jest już poprawnie opisywane). Mocną stroną pracy jest szczegółowa charakterystyka subpopulacji limfocytów T oraz analiza ekspresji Hmnr w poszczególnych frakcjach komórkowych. Wyniki te wnoszą nowe informacje na temat potencjalnych mechanizmów immunomodulacyjnych zależnych od układu opioidowego i podkreślają złożoność relacji pomiędzy odpornością adaptacyjną a przebudową naczyń. Na wysoką ocenę zasługuje także analiza proteomiczna, która ujawnia liczne zmiany w poziomach białek związanych z metabolizmem lipidów, stresem oksydacyjnym i odpowiedzią zapalną. W tym miejscu zabrakło jednak (dla pełnej interpretacji) wyników dla grupy młodszych zwierząt. Tu nasuwa się pytanie, czy obserwowane zmiany proteomiczne poprzedzają rozwój zmian histologicznych i mogą stanowić wczesne markery progresji choroby? W odniesieniu do ograniczeń pracy należy odnieść się do stosunkowo krótkiego czasu podawania naloksonu oraz rozpoczęcie interwencji na zaawansowanym etapie choroby, co znacząco utrudnia porównanie wyników z pracami, w których obserwowano działanie protekcyjne antagonistów opioidowych. W tym kontekście nasuwa się pytanie, czy uzyskane wyniki odzwierciedlają rzeczywisty brak efektu terapeutycznego, czy raczej niewystarczające warunki eksperymentalne do jego ujawnienia – proszę Doktorantkę o opinię.

W ostatnim rozdziale *Wnioski* Doktorantka sformułowała trzy wnioski, które są w większości spójne z uzyskanymi wynikami, logiczne i poprawnie osadzone w kontekście aktualnej wiedzy. W odniesieniu do wniosku trzeciego dotyczącego obniżonej ekspresji genu *Fabp4*, należałoby zachować większą ostrożność interpretacyjną, gdyż brak zmian histologicznych oraz funkcjonalnych analiz metabolizmu lipidów nie pozwala jednoznacznie zakwalifikować działania naloksonu jako efektu ochronnego.

Opracowanie kończy spis 124 pozycji literatury, z czego 23% stanowią publikacje z ostatnich 5 lat. W tej części pojawiły się pewne nieprawidłowości w formacie cytowania niektórych prac – brakuje np. nazwy czasopisma czy numeru wolumenu oraz stron – dotyczy pozycji 2, 21, 22, 27, 30, 55, 78, 89, 108, 109, 121.

Podsumowując, stwierdzam, że założone cele pracy zrealizowano za pomocą odpowiednio dobranych metod badawczych. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w badania nad rolą układu opioidowego w modulacji kluczowych procesów biologicznych związanych z rozwojem miażdżycy. Pomimo braku istotnych zmian w wielkości blaszki miażdżycowej po krótkotrwałym leczeniu, uzyskane wyniki wskazują na złożoną i wielokierunkową rolę endogenne układu opioidowego w patogenezie tej choroby. Opracowanie podkreśla potencjalne znaczenie układu opioidowego jako nowego celu terapeutycznego w chorobach sercowo-naczyniowych. Do niewątpliwych atutów rozprawy



należy zaliczyć wielopoziomową strategię badawczą, obejmującą analizy molekularne, histologiczne, oraz wysokoprzepustową analizę proteomiczną. Tak szeroki zakres metod umożliwia wielowymiarową interpretację wyników i istotnie zwiększa wartość poznawczą pracy. Podsumowując, rozprawa stanowi wartościowe i oryginalne opracowanie naukowe, które w istotny sposób poszerza wiedzę na temat roli układu opioidowego w miażdżycy. Pomimo wskazanych ograniczeń metodologicznych i interpretacyjnych, całość pracy spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim i stanowi solidną podstawę do dalszych, bardziej ukierunkowanych badań.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „*The effect of opioid receptors blockade on atherosclerosis-related processes in ApoE-deficient mice*”; „*Wpływ zablokowania receptorów opioidowych na procesy związane z miażdżycą u myszy z wyłączonym genem ApoE*” autorstwa Pani mgr Kingi Jaskuły spełnia wszystkie wymagania formalne określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Kingi Jaskuły do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Poznań, dn. 23 stycznia 2026r.

prof. dr hab. Joanna Nowacka-Woszuk