

Prof. dr hab. med. Krzysztof Bojakowski
2 Klinika Chirurgii Naczyniowej i Angiologii CMKP
Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej CSK MSWiA
ul. Wołoska 137, 02-507 Warszawa

Ocena pracy doktorskiej magister Kingi Jaskuły pt.: *"Wpływ zablokowania receptorów opioidowych na procesy związane z miażdżycą u myszy z wyłączonym genem ApoE"*

Miażdżycą jest powszechnie występującą chorobą przewlekłą, obejmującą różne tętnice, a jej następstwa są najczęstszą przyczyną zgonów w społeczeństwach krajów rozwiniętych oraz wiodącą przyczyną trwałego inwalidztwa. Patogeneza tej patologii tętniczej jest bardzo skomplikowana, zależna od wielu czynników i wzajemnych oddziaływań. Pomimo wielu badań klinicznych i przedklinicznych nadal konieczne jest określenie roli różnych czynników i mechanizmów w powstawaniu miażdżycy. Doktorantka postanowiła zająć się badaniami nad mało poznaną rolą układu opioidowego na procesy odgrywające rolę w rozwoju miażdżycy.

Praca Doktorska magister Kingi Jaskuły obejmuje cykl 3 artykułów naukowych, w których jest pierwszym Autorem, opublikowanych w zagranicznych czasopismach o znacznym współczynniku oddziaływania. Podstawę Pracy Doktorskiej stanowią dwie oryginalne prace opisujące wpływ blokady receptorów opioidowych na rozwój miażdżycy i mechanizmy tego oddziaływania. Do badań zastosowano dobrze poznany model zwierzęcy, wykorzystując myszy ApoE^{-/-} - z genetycznie uwarunkowanym powstawaniem miażdżycy. Dodatkowo Doktorantka załączyła pracę przeglądową dotyczącą mało poznanej roli receptorów kwasu hialuronowego – CD44 i RHAMM (hyaluronan-mediated motility receptor, Hmhr) w patogenezie miażdżycy i innych patologii naczyniowych.

Dysertacja składa się z następujących części: Streszczenie, Wstęp, Hipotezy, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki i dyskusja, Wnioski, Bibliografia. Do pracy dołączono publikacje stanowiące Rozprawę Dokorską oraz informacje o udziale Doktorantki w tworzeniu tych artykułów. Układ Pracy Doktorskiej jest typowy i nie budzi zastrzeżeń. W streszczeniach w języku polskim i angielskim, w sposób jasny i przejrzysty przedstawiono przeprowadzoną pracę badawczą. W kolejnej części - we Wstępie (Introduction) mgr Jaskuła opisała w sposób zwięzły proces powstawania miażdżycy, najistotniejsze mechanizmy rozwoju patologii - przewlekły proces zapalny, rolę różnego rodzaju komórek ściany naczynia i krążących we krwi, zaburzeń ich funkcji, właściwości i wzajemnego oddziaływania, metabolizmu lipidów. Doktorantka wskazała również na konieczność prowadzenia dalszych badań poświęconych nowym czynnikom odrywającym rolę w powstawaniu miażdżycy. Do takich należy endogenne układ opioidowy oraz składniki macierzy zewnątrzkomórkowej ściany tętnicy. Ta część pracy wskazuje na dużą wiedzę i erudycję Doktorantki w tym zakresie, przede wszystkim w opisanie roli układu opioidowego na fizjologię i patologię tętnic. Niemniej brakuje mi w tej części nieco szerszego omówienia dotychczas poznanej roli składników macierzy zewnątrzkomórkowej ściany naczynia w powstawaniu chorób naczyniowych, przede wszystkim miażdżycy. Byłoby to wskazane, zwłaszcza w kontekście włączenia do cyklu publikacji także pracy opisującej rolę receptorów dla kwasu hialuronowego w patologiach naczyniowych.

Hipotezy i Cele Pracy Doktorskiej zostały przedstawione przez mgr Jaskułę w sposób prawidłowy. Doktorantka postanowiła zbadać prawdziwość hipotez dotyczących istotnego wpływu blokowania układu opiodowego na profil lipidowy, przebudowę ściany naczynia, proteom izolowany z aorty i wątroby, ekspresję genu *Hmmr* (RHAMM) u myszy *ApoE^{-/-}* z uwarunkowaną genetycznie miażdżycą.

W części 4 Pracy Doktorskiej – Materiał i Metody mgr Jaskuła opisała wykorzystane w swoich badaniach materiały i metody. Omówiła charakterystykę wykorzystywanych do przeprowadzenia doświadczeń myszy linii *ApoE^{-/-}* oraz schematy wykonywanych doświadczeń. W tej części Doktorantka przedstawiła również zastosowane w swoich pracach metody – podawania naloksonu, pomiaru ekspresji mRNA, barwień histologicznych i immunohistochemicznych, cytometrii przepływowej (stosowane przeciwciała i bramkowania), analizy lipidogramu, chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas, zastosowanych metod statystycznych. Nie mam krytycznych uwag do opisanych przez Doktorantkę metod badawczych – są one nowoczesne, dobrze opracowane i dobrane.

W kolejnej 5 części Doktorantka przedstawiła wyniki uzyskane w swoich doświadczeniach i je omówiła. Pierwsza oryginalna publikacja włączona do Pracy Doktorskiej to **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>. Doktorantka podjęła w niej ocenę wpływu zahamowania aktywności receptorów opiodowych przez podanie antagonisty – naloksonu – na mechanizmy patologicznej przebudowy ściany naczynia, związane z zaburzeniami ekspresji białek, zwłaszcza kolagenu w ścianie aorty myszy *ApoE^{-/-}*. Zablockowanie receptorów opiodowych przez podanie naloksonu u myszy *ApoE^{-/-}* spowodowało istotne statystycznie zmiany ekspresji genów *Hmmr* i *Col3a1* – dla kolagenu typu 3, ale nie *Col1a1* – dla kolagenu typu 1, zarówno u młodych 8 tygodniowych, jak i u starszych 36 tygodniowych myszy. Zmiany te były związane ze zwiększeniem grubości warstwy kolagenu w ścianie aorty starych myszy, ale nie 8-tygodniowych osobników. Kolejną obserwacją przedstawioną w tej publikacji był wpływ podawania naloksonu na odsetki subpopulacji limfocytów T izolowanych ze śledzion badanych zwierząt. W szczególności zaobserwowano zmiany odsetków limfocytów T CD4⁺dziewicznych (naive) i pamięci centralnej (central memory) oraz odsetka dziewicznych limfocytów T CD8⁺ u młodych myszy. Blokowanie układu opiodowego powodowało również u zmianę ekspresji *Hmmr* (RHAMM) w niektórych subpopulacjach limfocytów T – zmniejszenie ekspresji na limfocytach T CD8⁺, limfocytach dziewicznych i pamięci centralnej u młodych osobników. U osobników 36 tygodniowych zaobserwowano istotne statystycznie zwiększenie odsetka limfocytów T pamięci centralnej. W analizie białek izolowanych z aort 36 tygodniowych myszy stwierdzono, że blokowanie układu opiodowego powoduje zmianę ekspresji szeregu białek związanych z działaniem i strukturą mięśni, migracji i proliferacji komórek, reakcji zapalnej, odpowiedzi immunologicznej i śmierci komórki.**

Druga publikacja włączona do cyklu - 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> przedstawia wyniki blokowania układu opiodowego na lipidogram myszy *ApoE^{-/-}* - genetycznie uwarunkowanych do rozwoju miażdżycy. W badaniach stwierdzono, że podanie naloksonu nie wpływa istotnie na całkowite stężenie cholesterolu, cholesterolu związanego z lipoproteinami niskiej gęstości (LDL) trójglicerydów we krwi izolowanej od dorosłych myszy. Stwierdzono, że podawanie naloksonu zwiększa stężenie cholesterolu związanego z lipoproteinami wysokiej gęstości (HDL). Hamowanie układu opiodowego u dorosłych 36 tygodniowych myszy *ApoE^{-/-}* nie wpływało istotnie na morfologię miażdżycy łuku aorty, stłuszczenie czy zwłóknienie wątroby. Podawanie naloksonu zwiększało natomiast ekspresję makrofagów w wątrobie. W analizie proteomicznej wątroby myszy stwierdzono istotne

zmiany ekspresji szeregu białek związanych z funkcją i strukturą mięśni, migracji i proliferacji komórek, odpowiedzią zapalną, układem immunologicznym, śmiercią komórki. Na poziomie molekularnym zmiany lipidogramu mogą być związane z redukcją przez podawanie naloksonu ekspresji *Fabp4* w wątrobie.

W pracy przeglądowej 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 opisała rolę receptorów kwasu hialuronowego – jednego ze składników macierzy zewnątrzkomórkowej – CD44 i RHAMM w rozwoju miażdżycy, przebudowy ściany naczynia, rozwoju procesów zapalnych w ścianie tętnicy, niedokrwienia mięśnia sercowego, angiogenezy, idiopatycznego nadciśnienia płucnego. W pracy dokładnie omówiono także budowę obu receptorów, szklaki pobudzenia, ekspresję w poszczególnych tkankach organizmu. Należy podkreślić, że praca ta jest prekursorskim przedstawieniem roli receptorów kwasu hialuronowego – w szczególności RHAMM w patologiach naczyniowych.

Część 6 Pracy Doktorskiej – Podsumowanie obejmuje trzy wnioski. Pierwszy, moim zdaniem kluczowy, wskazuje na istotny wpływ zablokowania układu opioidowego na ścianę tętnic, układ immunologiczny, funkcję wątroby. Oddziaływanie to odbywa się na poziomie molekularnym i strukturalnym, uzależnione jest od wieku zwierzęcia i zaawansowania miażdżycy. Istotny mechanizm tego oddziaływania może odbywać się poprzez białka macierzy zewnątrzkomórkowej – m.in. ekspresję RHAMM, syntezę kolagenu. Drugi wniosek wskazuje na istotny wpływ blokady układu opioidowego na subpopulację limfocytów T izolowanych ze śledziony, co ma potencjalne olbrzymie znaczenie w powiązaniu przewlekłego stanu zapalnego ściany tętnicy w patologicznej przebudowie ściany naczynia, macierzy zewnątrzkomórkowej i układu opioidowego. Trzeci wniosek wskazuje na wpływ blokowania układu opioidowego u myszy na zaburzenia lipidogramu, funkcji wątroby.

Do części 7. Bibliografia, obejmującej 124 artykuły, nie mam krytycznych uwag.

Uwagi i wątpliwości autora recenzji związane z Pracą Dokorską mgr Jaskuły dotyczą następujących kwestii:

1. Publikacja **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>
 - a. Jaki był sposób doboru dawki i czasu podawania naloksonu, które zostały wykorzystane w doświadczeniu?
 - b. Dlaczego do badania wykorzystano myszy starsze z rozwiniętą już miażdżycą, a nie osobniki młodsze, w których dochodzi do patologicznej przebudowy ściany tętnic? Czy rozpoczęcie blokady układu opioidowego u młodszych myszy i wydłużenie czasu ekspozycji nie byłoby lepszym układem badawczym dla oceny rozwoju przewlekłego procesu jakim jest przebudowa ściany naczynia i miażdżycy?
 - c. Czy stwierdzono dużą różnicę między niezależnymi obserwatorami w ocenie zawartości kolagenu w barwieniach tkankowych (trichrome staining)?
2. Publikacja **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>.
 - a. Na jakiej podstawie określono stosowaną dawkę i czas podawania naloksonu wykorzystaną do przeprowadzenia badań?

- b. Czy istnieją dane wskazujące na wpływ blokady układu opiodowego na inne składniki macierzy zewnątrzkomórkowej tężnic niż RHAMM i kolagen?
- c. W części wyniki 3.3. wystąpił błąd w zdaniach „We observed a statistically significant **increase** in naive (NaCl 61.25±4.91% vs. NLX 68.06±6.41%) (p = 0.031) and central memory (CM) (NaCl 16.19±1.51% vs. NLX 11.72±1.37%) (p = 8.22490 x 10⁻⁵) but not in effector (NaCl 10.03± 1.92% vs. NLX 9.21±1.49%) subpopulation (Figure 3b)” oraz “we observed statistical **increase** in naive (NaCl 62.03±4.89% vs. NLX 69.78±5.79%) (p = 0.013) and CM (NaCl 16.34±1.96% vs. NLX 11.40±2.45%) (p = 0.001) CD4⁺ T-cells (Figure 3c). W rzeczywistości odsetek CM limfocytów T i limfocytów CD4⁺ pod wpływem podawania naloksonu ulegał **zmniejszeniu**. W części 3.4 nieprawidłowe jest zdanie “ NLX treatment led to significant **decrease** in Col3a1 gene expression (NaCl 0.97±0.35 vs. NLX 1.31±0.35) (p = 0.042) (Figure 5). W rzeczywistości ulegał **zwiększeniu**.”

3. Rozprawa Doktorska

- a. W streszczeniu polskojęzycznym Doktorantka stwierdziła, że „blokada receptorów opiodowych wpływa na organizację macierzy zewnątrzkomórkowej oraz sztywność naczyń w zależności od stadium miażdżycy”. Wobec braku przeprowadzonych badań oceniających sztywność, podatność naczyń bardziej prawidłowo byłoby opisać wpływ na właściwości biomechaniczne ściany aorty jako **potencjalny**, spowodowany zmianą składu macierzy zewnątrzkomórkowej, zwiększeniem ilości kolagenu w ścianie aorty. Zresztą w taki sposób Autorka opisuje swoje wnioski w części 6. Podsumowanie wyników.
- b. W Streszczeniu zdanie „Choć krótkotrwałe leczenie NLX nie wpływało istotnie na wielkość blaszki miażdżycowej ani na poziom stężenia wątroby, zaobserwowane zmiany molekularne i proteomiczne podkreślają złożoną rolę układu opiodowego w aterogenezie oraz sugerują jego potencjał jako celu terapeutycznego w modulacji szlaków sercowo-naczyniowych i metabolicznych” powinno raczej brzmieć „zaobserwowane zmiany molekularne i proteomiczne podkreślają złożoną rolę układu opiodowego w aterogenezie oraz sugerują jego potencjał jako celu terapeutycznego w modulacji. Krótkotrwałe leczenie NLX nie wpływało istotnie na wielkość blaszki miażdżycowej ani na poziom stężenia wątroby”
- c. W pracy doktorskiej mgr Jaskuły widoczne są dodatkowo błędy edytorskie – m.in. kilkakrotnie podwójne spacje, braki przecinków. Pomimo powyższych uwag praca napisana jest bardzo dobrze, poprawnym językiem, w sposób przejrzysty, zgodny z wymogami pracy naukowej.

Publikacje będące podstawą Pracy Doktorskiej magister Jaskuły przedstawiają wyniki nowatorskich badań nad rolą i potencjalnymi mechanizmami oddziaływania układu opiodowego na różne procesy mogące odgrywać istotną rolę w powstawaniu miażdżycy. Należy jeszcze raz podkreślić wagę badań nad miażdżycą, która z uwagi na bardzo dużą powszechność i olbrzymie konsekwencje zdrowotne i społeczne należy do najbardziej istotnych problemów medycznych. W badaniach wykorzystano powszechnie akceptowany model myślenia o rozwoju miażdżycy, sposób planowania badań i wykorzystane techniki, moim zdaniem dobrano prawidłowo. Oczywiście badania powinny być kontynuowane w celu dokładniejszego określenia mechanizmów działania układu opiodowego i jego blokowania na przebudowę ściany naczynia. Wartość przeprowadzonych analiz jest duża dzięki prawidłowo zastosowanej dokładnej analizie statystycznej. Należy jednocześnie podkreślić olbrzymie doświadczenie zespołu badawczego prof. Sacharczuka, do którego należy Doktorantka, w badaniach nad udziałem i mechanizmami działania układu opiodowego w różnych patologiach w badaniach doświadczalnych. Przedstawione wyniki mają istotne znaczenie naukowe, potencjalnie mają bardzo duże implikacje kliniczne dla codziennej praktyki lekarskiej. Należy podkreślić, że

prace zostały opublikowane w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania - sumaryczny wskaźnik wynosi 13.

Na zakończenie stwierdzam, że praca magister Kingi Jaskuły stanowi samodzielny i oryginalny dorobek Autora. W szczególności Doktorantka wykazała się ogólną wiedzą teoretyczną, umiejętnością oryginalnego rozwiązania istotnego problemu naukowego, dotyczącego bardzo ważnej i powszechnej patologii. Należy podkreślić wskazany przez współautorów publikacji wiodący i pierwszoplanowy udział Doktorantki w tych publikacjach. Fakty te wskazują, że Doktorantka posiada umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Z tego powodu uważam, że Praca odpowiada wymaganiom stawianym Rozprawom Doktorskim.

W związku z powyższym pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk wniosek o dopuszczenie magister Kingi Jaskuły do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na bardzo wysoką jakość i nowatorstwo przeprowadzonych badań, opublikowanie ich w bardzo dobrych czasopismach, o wysokim współczynniku oddziaływania, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej magister Kingi Jaskuły.