Prof. dr hab. Ewa Tomaszewska
Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 14.07.2023 r.

Recenzja
Rozprawy doktorskiej Pani lek. wet. Marty Brzozowskiej pt.:

„Wpływ stanu zapalnego wywołanego podawaniem kwasu acetylosalicylowego, naproksenu i indometacyny na kodowanie chemiczne neuronów jelitowego układu nerwowego dwunastnicy świni domowej"

wykonanej w Katedrze Fizjologii Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 7 lipca 2023 r. (WMW-Dz.5201.2.2023).

Jelitowy układ nerwowy zwany enterycznym układem nerwowym (EUN) to złożony samodzielny system nerwowy znajdujący się w przewodzie pokarmowym, zawiera miliony neuronów, co czyni go najbardziej skomplikowanym układem nerwowym poza ośrodkowym układem nerwowym. EUN odgrywa kluczową rolę w wykrywaniu i reagowaniu na bodźce działające wewnątrz i zewnętrz przewodu pokarmowego, takie jak rozciąganie ścian jelita, obecność składników odżywczych, czy obecność patogenów; kontroluje procesy trawienia, wydzielania śluzu, wchłaniania składników odżywczych oraz ruchy perystaltyczne, które pomagają w przesuwaniu pokarmu przez jelito; odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu równowagi mikroflory jelitowej; uczestniczy w odpowiedzi immunologicznej wywołanej obecnością patogenów czy alergenów oraz stresem, jak też bierze udział w miejscowych reakcjach zapalnych. Uszkodzenie lub zaburzenie w funkcjonowaniu tego układu nerwowego może prowadzić do różnych problemów trawiennych, takich jak zaparcia, biegunki, czy zespoły jelita drażliwego. Dlatego zachowanie sprawnego EUN jest kluczowe dla zachowania równowagi i zdrowia całego organizmu.

EUN to zorganizowany układ różnych rodzajów neuronów generujących potencjały czynnościowe, które są przekazywane na kolejne neurony, elementy mięśniowe i gruczoły. Kody potencjałów czynnościowych są przekształcane w kody chemiczne na synapsach. Potencjały czynnościowe docierające do zakończeń presynaptycznych neuronów są przekształcane w sygnały chemiczne, które są transmitowane przez synapsy do receptorów na postsynaptycznych elementach nerwowych, gdzie zachodzi rekonwersja do potencjałów czynnościowych. Przetwarzanie sygnałów to kluczowa funkcja w sieci neuronowej EUN, które mogą sygnalizować zmiany napięcia mięśniówki lub zmiany w parametrach środowiska. Neurony przetwarzają te sygnały, aby wygenerować odpowiednie sygnały wyjściowe, które nie tylko inicjują homeostatyczne regulacje ale i modulują odpowiedzi na zmieniające się warunki. Neuroplastyczność EUN jest ważna w kontekście ogólnego zdrowia i podstawowych mechanizmów regulujących pracę przewodu pokarmowego. Zdolność nie tylko do reorganizacji połączeń synaptycznych ale modyfikacji kodowania chemicznego pozwala na naprawę uszkodzeń, regenerację i dostosowanie się do zmian patologicznych, takich jak urazy czy infekcje. Jednakże, neuroplastyczność EUN ma swoje ograniczenia. Szczególnie działanie kwasu acetylosalicylowego, naproksenu i indometacyny nie jest w pełni poznane i jest nadal przedmiotem badań naukowych, aby zrozumieć pełny zakres działania niesterydowych leków przeciwzapalnych (NSLP). Badania nad neuroplastycznością EUN mogą mieć również znaczenie w zrozumieniu i leczeniu różnych zaburzeń żołądkowo-jelitowych, takich jak zespół jelita drażliwego czy choroby zapalne jelit, które są związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem EUN. Badania w tym zakresie mogą przyczynić się do opracowania nowych terapii mających na celu poprawę ogólnego stanu zdrowia zależnego od funkcjonowania układu pokarmowego, dlatego mogą mieć potencjał terapeutyczny.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani lek. wet. Marty Brzozowskiej została opracowana zgodnie z wytycznymi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003r. z późniejszymi zmianami. Praca składa się z dwóch części. Część pierwszą stanowi autoreferat napisany w języku polskim i przedstawiony w postaci wydruku komputerowego na 43 stronach formatu A4. Układ autoreferatu jest tradycyjny i zawiera: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz wykaz piśmiennictwa.

Rozprawa w języku polskim zawiera 2 tabele i 94 pozycje piśmiennictwa, w większości anglojęzycznego. Szata graficzna jest staranna i estetyczna. Część druga to cykl trzech prac, tematycznie spójnych, oryginalnych artykułów naukowych z lat 2020-2023, opublikowanych w Annals of Anatomy, Frontiers in Pharmacology i International Journal of Molecular Science:

1. Czajkowska M, Rychlik A, Całka J. Long-term treatment with naproxen changes the chemical coding of the porcine intramural duodenum neurons. Ann Anat. 2020 Jan;227:151425. doi: 10.1016/j.aanat.2019.151425.
2. Czajkowska M, Całka J. Neurochemistry of Enteric Neurons Following Prolonged Indomethacin Administration in the Porcine Duodenum. Front Pharmacol. 2020 Sep 8;11:564457. doi: 10.3389/fphar.2020.564457.
3. Brzozowska M, Całka J. Acetylsalicylic Acid Supplementation Affects the Neurochemical Phenotyping of Porcine Duodenal Neurons. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 9871. doi: 10.3390/ijms24129871.

Kończąc ogólną charakterystykę rozprawy należy zwrócić uwagę na wysoki łączny współczynnik oddziaływania publikacji, który wynosi 14,717, a liczba punktów MNiSW= 340. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich trzech pracach ze znacznym wkładem autorskim w koncepcję, metodologię i przygotowywanie prac. Doktorantka podaje też informacje o finansowaniu prac badawczych przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM 15 nr 2018/29/N/NZ4/00348 i kosztach publikacji sfinansowanych w ramach programu Ministra Edukacji i Nauki pod nazwą „Regionalna Inicjatywa Doskonałości" w latach 2019-2023 (nr projektu 010/RID/2018/19).

Ponieważ prace oryginalne, które składają się na cykl osiągnięcia przedstawionego jako praca doktorska, były poddane wcześniej ocenie przez redakcje czasopism i niezależnych recenzentów, moja recenzja dotyczy przede wszystkim oceny autoreferatu, który jest autorskim opracowaniem Doktorantki i pokazuje zakres wiedzy jaką dysponuje, umiejętności formułowania hipotez, celów pracy, prowadzenia dyskusji, formułowania wniosków i posługiwania się odpowiednim piśmiennictwem, wskazując na Jej oczytanie.

Problem naukowy jest sformułowany poprawnie i zawarty w tytule pracy doktorskiej który jest adekwatny i spójny z prezentowanymi pracami oryginalnymi w języku angielskim. Badania są zgodne z aktualnymi trendami w ogólnoświatowych badaniach naukowych. NLPZ działają głównie poprzez hamowanie szlaków cyklooksygenazy (COX), która występuje fizjologicznie w błonie śluzowej przewodu pokarmowego, a działania niepożądane związane z przyjmowaniem NLPZ wynikają przede wszystkim z jej hamowania. Szacuje się, że około 60-70% enteropatii wywołanych przez NLPZ ma przebieg subkliniczny, charakteryzujący się ogólnymi i nieswoistymi objawami, takimi jak hipoalbuminemia, biegunka, niedokrwistość i krwawienia, często też leczenie NLPZ wiąże się z występowaniem poważnych objawów niepożądanych, takich jak gwałtowne i długotrwałe krwawienia, perforacje i niedrożności jelitowe. Wielu pacjentów doświadcza zmian zapalnych w żołądku i dwunastnicy, co wskazuje, że działanie NLPZ jest szczególnie nasilone w tym obszarze. Dlatego badania nad tym, jak te leki wpływają na kodowanie chemiczne neuronów EUN, mogą pomóc zrozumieć mechanizmy związane z ewentualnymi efektami ubocznymi tych leków na przewód pokarmowy. Badania nad wpływem NLPZ na EUN mogą mieć znaczenie kliniczne, gdyż wykazanie, że te leki wpływają na kodowanie chemiczne neuronów, może wskazywać na potencjalne zastosowania terapeutyczne w chorobach związanych z zaburzeniami układu pokarmowego. Badania te pozwalają na poszerzenie już posiadanej wiedzy naukowej na temat EUN i NLPZ. W związku z powyższym, badania nad kwasem acetylosalicylowym, naproksenem i indometacyną w kontekście kodowania chemicznego neuronów EUN dwunastnicy są aktualne i istotne dla nauki, medycyny i weterynarii. Weterynaria i medycyna są ściśle powiązane, ponieważ badania prowadzone w zakresie weterynarii mają znaczący wpływ na rozwój medycyny. Mechanizmy chorobowe i leczenie, które są badane i testowane na zwierzętach, mogą mieć zastosowanie w medycynie, co pozwala na opracowanie efektywnych i bezpiecznych metod diagnostyki oraz terapii. Odkrycia dotyczące chorób i terapii przyczyniają się do postępu w dziedzinie zdrowia zarówno zwierząt, jak i ludzi..

We „Wstępie" obejmującym 3,5 strony Doktorantka w klarowny sposób wprowadza czytelnika w problematykę związaną z ubocznymi skutkami NLPZ w aspekcie przewodu pokarmowego, krótko charakteryzuje EUN, jego neuroplastyczność i rolę w rozwoju stanu zapalnego wywołanego różnymi czynnikami, oraz przedstawia neurochemiczną charakterystykę neuronów. Hipoteza jest przedstawiona w

pracach oryginalnych. Doktorantka podaje jeden ogólny cel, którym było „określenie wpływu kwasu acetylosalicylowego, naproksenu i indometacyny na charakterystykę neurochemiczną neuronów jelitowych w dwunastnicy świni" i 5 szczegółowych celów:

I. Określenie poziomu ekspresji VIP, GAL, CART, PACAP, SP i nNOS w zwojowych neuronach enterycznych dwunastnicy świni domowej w warunkach fizjologicznych

II. Potwierdzenie indukcji stanu zapalnego dwunastnicy spowodowanego podawaniem indometacyny, naproksenu i kwasu acetylosalicylowego

III. Określenie wpływu podawania naproksenu na poziom ekspresji VIP, GAL, CART, PACAP, SP i nNOS w zwojowych neuronach enterycznych dwunastnicy świni domowej

IV. Określenie wpływu podawania indometacyny na poziom ekspresji VIP, GAL, CART, PACAP, SP i nNOS w zwojowych neuronach enterycznych dwunastnicy świni domowej

V. Określenie wpływu podawania kwasu acetylosalicylowego na poziom ekspresji VIP, GAL, CART, PACAP, SP i nNOS w zwojowych neuronach enterycznych dwunastnicy świni domowej

W celu zweryfikowania postawionej hipotezy jak i wyznaczonych celów badań, Doktorantka zaplanowała badania, na które uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie (Uchwała LKE 54/2017 z dnia 25 lipca 2017). Badania przeprowadzono na 16 niedojrzałych płciowo loszkach o masie ciała około 20 kg, którym podawano *per os* przez 28 dni*:* kwas acetylosalicylowy (100 mg/kg mc), indometacynę (10 mg/kg mc) lub naproksen (50 mg/kg mc). Materiał badawczy stanowiły fragmenty tkanek pobranych z dwunastnicy, z których wykonano preparaty i przeprowadzono odpowiednie reakcje immunohistochemiczne, do których użyto przeciwciał pierwotnych i wtórnych (prezentowane w tabeli 1). Doktorantka opisała w jaki sposób przeprowadzała analizę, żeby określić zmiany w immunolokalizacji: wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP), substancji P (SP), neuronalnej izoformy syntetazy tlenku azotu (nNOS), galaniny (GAL), polipeptydu aktywującego przysadkową cyklazę adenylanową (PACAP) oraz transkryptu regulowanego przez kokainę i amfetaminę (CART) w neuronach jelitowych dwunastnicy. Otrzymane wyniki zostały poddane odpowiedniej analizie statystycznej przy użyciu odpowiednich narzędzi statystycznych.

Ocena poprawności, oryginalności metodycznej oraz zakresu rozwiązania zagadnienia naukowego zależy od konkretnego eksperymentu. Biorąc pod uwagę przedstawione badanie, stwierdzam, że metoda jest odpowiednio opisana, co pozwala na jej powtórzenie i zweryfikowanie wyników; jest adekwatna dla badanego zagadnienia, uwzględnia odpowiednie grupy kontrolne i reakcje kontrolne. Badanie uwzględnia wystarczającą liczbę próbek i obserwacji, koniecznych do wyciągnięcia wiarygodnych wniosków. Chociaż sama technika wykorzystana w reakcjach immunohistochemicznych jest znana to w kontekście badanego problemu jest nowatorska i wnosi nowe spojrzenie i podejście do rozwiązania przedstawionego zagadnienia naukowego. Zapewnia to całkowitą wiarygodność i rzetelność wyników. Należy też podkreślić, że podwójne reakcje immunohistochemiczne są nie tylko bardzo czasochłonne ale i trudne z powodu kilku istotnych wyzwań technicznych i metodologicznych. W tego typu procedurach wykorzystuje się dwa różne przeciwciała reagujące z odpowiednimi antygenami, które wybarwiane są różnymi markerami po zajściu reakcji, aby jednocześnie zidentyfikować i zlokalizować różne antygeny w badanej próbce. Należy zwrócić uwagę na krzyżową reaktywność przeciwciał, interferencję barwników, konkurencję przeciwciał o przestrzeń na powierzchni tkanki, optymalizację parametrów technicznych i odpowiednią interpretację, która może być utrudniona w sytuacji gdy próbka zawiera duże ilości komórek z różnymi poziomami pozytywnych reakcji. Doktorantka pokazała, że doskonale zna całą procedurę i potrafi nie tylko przeprowadzić te reakcje, ale stosować odpowiednie kontrole w celu zapewnienia wiarygodności i dokładności powtarzalnych wyników.

W rozdziale „Wyniki" zajmującym 6 stron, Doktorantka przedstawiła wszystkie rezultaty w bardzo syntetyczny sposób. Wszystkie wyniki zawarła też w tabeli 2. Rezultaty pokazały nie tylko różnice w ilości neuronów kodujących odpowiednie neuroprzekaźniki w zwojach mięśniowych dwunastnicy u zwierząt kontrolnych, ale wpływ kolejno: 1. naproksenu, który spowodował wzrost ilości VIP-, nNOS-, GAL-, CART- i PACAP-immunopozytywnych neuronów w zwojach śródściennych dwunastnicy, a jednocześnie spadek SP-pozytywnych; 2. indometacyny, która spowodowała wzrost ilości VIP-, nNOS-, GAL-, CART- i PACAP-immunoreaktywnych neuronów w zwojach śródściennych dwunastnicy z jednoczesnym wzrostem ilości SP-pozytywnych neuronów w zewnętrznych zwojach podśluzowych; 3. kwasu acetylosalicylowego, który wywołał wzrost ilości VIP-, nNOS-, GAL-, CART- i PACAP-immunoreaktywnych neuronów w zwojach śródściennych dwunastnicy oraz jednoczesny wzrost ilości SP-pozytywnych neuronów w obu rodzajach zwojów podśluzowych. Należy zaznaczyć, że uzyskane wyniki są istotne dla dalszych badań i

zrozumienia nie tylko roli zmiany kodowania chemicznego neuronów EUN, ale roli poszczególnych neuroprzekaźników w kontekście chorób autoimmunologicznych, zapaleń i innych zaburzeń jelitowych.

W rozdziale „Dyskusja" przeprowadzonym na 9 stronach Doktorantka skonfrontowała swoje obserwacje dotyczące podawania NLPZ, które wpływają na kodowanie neuropeptydów i tlenku azotu w EUN, co może odgrywać istotną rolę w regulacji stanu zapalnego i funkcji jelita. Wzrost GAL- i PACAP-immunopozytywnych neuronów może sugerować działanie ochronne tych neuropeptydów na jelito, podczas gdy zmniejszenie SP-pozytywnych neuronów może odzwierciedlać rozpoczynające się wrzodziejące zapalenie jelita. Jednak jak zaznaczyła Doktorantka, mechanizmy działania NLPZ na układ nerwowy jelitowy wymagają dalszych badań.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała 6 wniosków końcowych ściśle dotyczących postawionych przez siebie celów badawczych.

„Piśmiennictwo". Doktorantka dokonała właściwego doboru literatury naukowej, głównie anglojęzycznej. Dobór tak interesujących pozycji piśmiennictwa, które zostały umiejętnie uwzględnione zarówno we wstępie, jak i dyskusji, świadczy o dużej aktualności tematu i potrzebie prowadzenia tego typu badań. Zakres przedstawionej literatury pokazuje także, że Doktorantka dokładnie zapoznała się z obecnym stanem wiedzy związanym z podejmowaną tematyką.

W części drugiej Autoreferatu przedstawione są 3 prace oryginalne wraz z oświadczeniami Autorów.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na drobne niedopatrzenia w Autoreferacie.

1. Kilkakrotnie zostało użyte określenie „barwienie immunohistochemiczne". Jest to reakcja immunohistochemiczna. Proces ten opiera się na zdolności przeciwciał do wiązania się z konkretnymi antygenami, co umożliwia ich identyfikację po wizualizacji. Nie jest to więc barwienie.
2. W Autoreferacie pojawia się słowo „ekspresja", choć Doktorantka prawidłowo opisuje, że została wyliczona procentowa ilość immunoreaktywnych pozytywnie neuronów. Reakcje immunohistochemiczne pozwalają tylko na wykrywanie i lokalizację białek w tkankach na poziomie komórkowym.
3. Kilkakrotnie zostaje podkreślone, że „podwójne barwienie immunohistochemiczne wykazało" odpowiednie zmiany w kodowaniu neuronów. Czy po wykonaniu reakcji z pojedynczym przeciwciałem, byłoby to niemożliwe?

Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani lek. wet. Marty Brzozowskiej, jestem przekonana, że Autorka pracy posiada wymaganą znajomość warsztatu metodycznego, umiejętnie wykorzystuje te umiejętności w pracy badawczej. Udowodniła, że potrafi starannie i poprawnie zaplanować badania i wykonać analizy, dzięki czemu otrzymała wyniki interesujące i oryginalne, które logicznie interpretuje. Uwagi, które zgłaszam odnoszą się raczej do skrótów myślowych, nie umniejszają wartości naukowej tej dysertacji.

Przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego znaczenia NLPZ w kodowaniu chemicznym neuronów EUN w dwunastnicy. Doktorantka bezspornie wykazała się wiedzą oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowo-badawczej.
Równocześnie, w związku z wysoką oceną pracy, z przyjemnością stawiam wniosek o wyróżnienie recenzowanej dysertacji stosowną nagrodą ze względu na kilka kluczowych powodów:

1. Jest to oryginalne rozwiązanie problemu naukowego: Przedstawiona rozprawa dotyczy oryginalnego i istotnego problemu naukowego, który jest związany z badaniem znaczenia NLPZ w kodowaniu chemicznym neuronów EUN w dwunastnicy. Oryginalność tego podejścia wzbogaca obecną wiedzę, a wyniki mogą mieć praktyczne zastosowania.
2. Doktorantka wykazała się wiedzą i umiejętnościami: Doktorantka wykazała się dogłębną wiedzą w swojej dziedzinie oraz zdolnością do samodzielnego prowadzenia zaawansowanych prac naukowo-badawczych. To potwierdza, że jest dobrze przygotowana do dalszej kariery naukowej i może wnosić cenne wkłady w dziedzinę swoich badań.
3. Wysoka jakość pracy: Pracę oceniam bardzo pozytywnie ze względu na jej wysoką jakość. Doktorantka wykazała się doskonałymi umiejętnościami analitycznymi i interpretacyjnymi, a także dokładnością w prezentacji wyników badań.

4. Wartość naukowa: Praca wnosi istotny wkład do obecnej wiedzy na temat EUN i NLPZ, a jej wyniki mogą mieć znaczący wpływ na rozwój nauki lub nawet praktykę kliniczną. Wyróżnienie takiej pracy może stanowić zachętę do kontynuowania badań i dalszego rozwijania wiedzy na ten temat.

Wszystkie te czynniki uzasadniają wyróżnienie recenzowanej dysertacji odpowiednią nagrodą, co stanowiłoby uznanie dla ciężkiej pracy i osiągnięć doktorantki w dyscyplinie weterynaria.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani lekarz Marty Brzozowskiej pt. „**Wpływ stanu zapalnego wywołanego podawaniem kwasu acetylosalicylowego, naproksenu i indometacyny na kodowanie chemiczne neuronów jelitowego układu nerwowego dwunastnicy świni domowej**” odpowiada warunkom określonym w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U. z 2014 r., poz. 1852 ze zm. W dz. U. z 2015 r. poz. 249) i przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.