Dr hab. n. med. Małgorzata Krajnik, prof. UMK
Kierownik Katedry i Zakładu Opieki Paliatywnej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

Sekretariat DWI
Data wpływu 6.09.19
Podpis 2235

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lekarza Michael Kozlowski pt.: „The effects of morphine and analgesic adjuvants on innate and humoral immune response parameters in mice. The role of macrophages"

Minęło ponad trzydzieści lat od publikacji pierwszych wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dotyczących leczenia bólu u chorych na nowotwór. Zaproponowana przez ekspertów WHO w 1986 roku (oraz w kolejnych wydaniach rekomendacji w 1996, a następnie 2018 roku) tzw. drabina analgetyczna stała się jednym z bardziej znanych „narzędzi edukacyjnych" i miała niewątpliwie wielki wpływ na rozpowszechnienie zasad farmakoterapii ukierunkowanej na łagodzenie dolegliwości bólowych. Podstawową zasadą w ujęciu drabiny analgetycznej jest uważny wybór leków w zależności zarówno od natężenia bólu, jak i od jego mechanizmów. W przypadku bólu o znacznym nasileniu występującego u chorego na nowotwór sięga się zazwyczaj od razu po analgetyki opioidowe, a w bólu o istotnej składowej neuropatycznej zwykle włącza się koanalgetyki, wśród nich leki przeciwdepresyjne. Analgetyki opioidowe są również podstawą farmakoterapii w innych (niż wspomniano wyżej) sytuacjach klinicznych związanych z bólem, na przykład w okresie okołooperacyjnym lub też w bólach proceduralnych. Co więcej, opioidy i leki przeciwdepresyjne znalazły zastosowanie w leczeniu innych niż ból objawów. Na przykład, morfina jest uznawana za podstawowy lek w leczeniu objawowym nasilonej duszności w przebiegu choroby nowotworowej, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, niewydolności serca, czy też stwardnienia zanikowego bocznego. Natomiast niektóre leki przeciwdepresyjne, takie jak mirtazapina, są obecnie w fazie badań klinicznych oceniających ich efektywność w łagodzeniu przewlekłej duszności u chorych na zaawansowane choroby płuc. Leki przeciwdepresyjne znalazły również zastosowanie w leczeniu świądu paranowotworowego towarzyszącego guzom litym, w przebiegu czerwienicy prawdziwej, świądu mocznicowego czy też neuropatycznego. Wieloletnie doświadczenia kliniczne stosowania opioidów i koanalgetyków (w tym leków przeciwdepresyjnych) w licznej i różnorodnej populacji chorych oraz postęp w zakresie poznania mechanizmów bólu i funkcjonowania układu immunologicznego zrodziły szereg pytań, ważnych nie tylko dla badaczy, ale i dla klinicystów. Jakie jest znaczenie odpowiedzi immunologicznej w różnych zespołach bólowych? Czy przekłada się to na

różnice w skuteczności stosowanej farmakoterapii? W jakich zespołach bólowych opioidy będą skuteczniejsze ze względu na ich wpływ na komórki immunologiczne i odpowiedź zapalną? Czy i w jakim stopniu te mechanizmy mogą tłumaczyć różnice w działaniu poszczególnych opioidów? Warto zaznaczyć, że ciągle jesteśmy w początkowej fazie klinicznego wykorzystania potencjalnego wpływu opioidów na lokalną odpowiedź immunologiczną - na przykład poprzez stosowanie miejscowo żelu z morfiną w przypadku bolesnego zapalenia śluzówek jamy ustnej spowodowanego chemio- czy radioterapią. Duży wpływ na poznanie wspomnianych wyżej mechanizmów miały badania, które pokazały, że układ immunologiczny człowieka jest miejscem nie tylko ekspresji układów opioidowych, ale i syntezy opioidów oraz że współdziałanie układu immunologicznego z układem nerwowym warunkuje skuteczną miejscową endogenną analgezję opioidową.

Kolejne pytania nurtujące badaczy i klinicystów dotyczą potencjalnie niekorzystnego wpływu leków opioidowych na układ immunologiczny. Zagadnienie szczególnie istotne ze względu na podawanie tych leków osobom z deficytami czy innego typu zaburzeniami w zakresie układu immunologicznego (pacjenci w okresie okołooperacyjnym, chorzy na nowotwór lub AIDS). Również dlatego, że coraz częściej analgetyki opioidowe stosuje się długotrwale, nieraz latami. Stąd pytanie o skutki przedłużonej opioidoterapii, na przykład u chorych w remisji choroby nowotworowej, lub u „ozdrowieńców" cierpiących z powodu przewlekłych zespołów bólowych, będących konsekwencją agresywnego, radykalnego leczenia przeciwnowotworowego. Które opioidy i w jaki sposób wpływają na funkcjonowanie układu immunologicznego? Czy jest to działanie immunosupresyjne, czy immunostymulujące? A wreszcie, czy łączne podawanie analgetyków opioidowych z koanalgetykami, takimi jak leki przeciwdepresyjne, zwiększa czy zmniejsza ten efekt? Czy takie łączenie jest korzystne czy niekorzystne z punktu widzenia wpływu na układ odpornościowy?

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w dyskusję na temat wpływu opioidów i koanalgetyków na układ immunologiczny. Na rozprawę doktorską składają się trzy publikacje o łącznej wartości Impact Factor = 5.431 i MNiSW = 60. Czasopisma, w których Doktorant opublikował swoje naukowe osiągnięcia należą do renomowanych periodyków o znaczącym zasięgu. W dwóch pracach Doktorant jest pierwszym autorem, w jednej - drugim. Wszystkie trzy mają charakter oryginalnych prac badawczych.

Warto podkreślić, że cykl przedstawionych badań jest kontynuacją wcześniejszych prac krakowskiego zespołu badawczego, którego obecnie członkiem jest Doktorant. Dzięki temu możliwe było wykorzystanie wypracowanego przez zespół modelu badania odpowiedzi układu immunologicznego regulowanej działaniem opioidów w żywych organizmach zwierząt doświadczalnych. Co więcej, wypracowany model nie tylko pozwalał na ocenę różnych form

odpowiedzi immunologicznej, ale i na odniesienie się do dawek leków porównywalnych z tymi stosowanymi terapeutycznie. Ze względu na podobieństwo układu odpornościowego człowieka i myszy badania wpływu opioidów i koanalgetyków na jego parametry prowadzono na modelu mysim. Doktorant oceniał, jak leki wpływają na komórkową odpowiedź nieswoistą i swoistą humoralną z udziałem makrofagów. Makrofagi w stanie fizjologicznym odpowiadają za utrzymywanie homeostazy tkanki, organizują również miejscową i systemową odpowiedź immunologiczną. Odgrywają rolę we wrodzonej odporności, aktywując i promując ostre zapalenie przeciw patogenowi albo hamując odpowiedź immunologiczną przeciw autoantygenom. Jako komórki zdolne do rozpoznawania i niszczenia obcych patogenów oraz prezentacji antygenów pełnią kluczową rolę w układzie immunologicznym. Makrofagi obecne w mikrośrodowisku guza stanowią istotną część nacieku komórek leukocytarnych, wpływają na angiogenezę w obrębie guza, promują jego wzrost, stymulują inwazyjność i przerzutowanie. Stąd trafnym wydaje się skupienie uwagi badawczej Doktoranta na wpływie opioidów i koanalgetyków właśnie na tej populacji komórek.

Pierwsza praca opublikowana w wysoko ocenianym czasopiśmie *Experimental Biology and Medicine*, dotyczy badania, które wykazało, że podawane systemowo leki przeciwdepresyjne (imipramina, fluoksetyna, wenlafaksyna, moklobemid) modulują obwodową odpowiedź humoralną i komórkową przede wszystkim przez działanie na makrofagi. O ile imipramina wywierała raczej efekt prozapalny, to pozostałe badane koanalgetyki wykazywały potencjalny wpływ immunosupresyjny. W dyskusji Doktorant i współautorzy sugerują, że terapeutyczna skuteczność wybranych leków przeciwdepresyjnych jako koanalgetyków może zależeć także od ich przeciwzapalnego działania.

W drugiej pracy opublikowanej w *Folia Medica Cracoviensia* oceniano różnice pomiędzy buprenorfiną i oksykodonem a badanymi we wcześniejszych eksperymentach opioidami (morfina, fentanyl i metadon) pod kątem ich wpływu na tworzenie przez makrofagi myszy rodników tlenowych i NO. Ponadto badano podobny efekt po zastosowaniu osobno lub wraz z morfiną koanalgetyków (gabapentyny, amitryptyliny i wenlafaksyny). Wykazano, że podawanie koanalgetyków, zwłaszcza amitryptyliny, prowadziło do zmniejszenia produkcji rodników tlenowych i NO przez makrofagi. Natomiast zastosowanie opioidów istotnie pobudzało proces tworzenia rodników tlenowych, przy czym buprenorfina i oksykodon wykazywały w porównaniu do morfiny mniej widoczny efekt immunomodulacji.

Co ciekawe, dodanie do morfiny koanalgetyku łagodziło efekt zwiększania przez opioid produkcji rodników tlenowych przez makrofagi. W oparciu o uzyskane w badaniach rezultaty, Doktorant i współautorzy sugerowali, że opioidy prawdopodobnie wzmacniają odpowiedź przeciwbakteryjną makrofagów, ale w przypadku zapalenia nieinfekcyjnego mogą nasilać uszkodzenie tkanek poprzez

pobudzanie procesu tworzenia rodników tlenowych. Ten ostatni efekt może być jednak niwelowany przez dołączenie koanalgetyków.

Trzecia praca opublikowana w wysoko ocenianym czasopiśmie *Pharmacological Reports* dotyczy badania wpływu koanalgetyków (gabapentyny, amitryptyliny i wenlafaksyny) na funkcje makrofagów w zakresie indukowania odpowiedzi humoralnej i komórkowej, w sytuacji, gdy podawane były osobno lub też wraz z morfiną. Wykazano znaczącą aktywność przeciwzapalną koanalgetyków w odniesieniu do szerokiego spektrum funkcji immunologicznych makrofagów. Zasugerowano, że właśnie ten efekt może być krytycznie ważny dla wzmacniania korzystnego działania analgetycznego podawanej wraz z koanalgetykiem morfiny.

W mojej ocenie trzy publikacje zawarte w cyklu są wartościowe i spójne. Zarówno wartość poznawcza, jak i potencjalny wpływ tych publikacji na kierunki badań klinicznych, które mogłyby wpłynąć na poprawę strategii leczenia bólu z zastosowaniem leków opioidowych i koanalgetyków, wydają się być istotne. Końcowe wnioski, które Doktorant prezentuje w podsumowaniu dysertacji są spójne z założeniami pracy i osiągniętymi wynikami.

Moje uwagi formalne dotyczą przedstawionej wersji drukowanej rozprawy. W streszczeniu Doktorant nie określił celu swoich badań. Ponadto w sposób niezwykle oszczędny przedstawił wstęp do swoich badań oraz podsumowanie, spełniające rolę dyskusji. Zwłaszcza w przypadku tego ostatniego, można by oczekiwać, że Doktorant bardziej wyczerpująco ukaże wartość obserwacji ze swoich badań i zaproponuje, jakie mogą mieć one znaczenie kliniczne. Uwagi te jednak nie wpływają na ocenę merytoryczną samego dorobku naukowego.

Podsumowując, naukowe osiągnięcie: „The effects of morphine and analgesic adjuvants on innate and humoral immune response parameters in mice. The role of macrophages" autorstwa lekarza Michael Kozlowski oceniam wysoko, jako dzieło, które wnosi bardzo istotne elementy zarówno poznawcze, jak i ważne z punktu widzenia praktyki klinicznej. Praca ta w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim, określonym w art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Na podstawie powyższej oceny wnioskuję zatem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie o dopuszczenie lekarz Michael Kozlowski do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bydgoszcz, 31.08.2019

Dr hab. med. Małgorzata Krajnik, prof. UMK