



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. farm. Jacek Sapa  
Katedra Farmakodynamiki  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum  
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

Kraków, 10 VIII 2022

*Ocena rozprawy doktorskiej magister Kamili Kulik pt: "Wpływ jonów magnezu na analgezję indukowaną morfiną – próba określenia mechanizmu działania"*

Opioidowe leki przeciwbólowe odgrywają dziś kluczową rolę w łagodzeniu reakcji bólowej u pacjentów. Niestety, jak dobrze wiemy współcześnie stosowane leki z tej grupy nie są idealne. Posiadają duży balast działań niepożądanych, silny potencjał uzależniający, znaczne ryzyko rozwoju tolerancji, jak również nikłą skuteczność w specyficznych rodzajach bólów do jakich zaliczamy ból neuropatyczny. Poszukiwanie nowych struktur, jak również modyfikacja działania już stosowanych leków w celu optymalizacji ich skuteczności i redukcji efektów niepożądanych stanowi dziś istotne wyzwanie naukowe dla wielu badaczy.

Rozprawa doktorska magister Kamili Kulik wpisuje się w tą tematykę badawczą. Doktorantka za główny cel badań stawia sobie ocenę wpływu jonów magnezu na działanie antynocyceptywne morfiny oraz wyjaśnienie mechanizmu tej interakcji. Ma to bardzo istotne znaczenie praktyczne ponieważ wykazanie istotnej skuteczności w łagodzeniu - szczególnie bólów o charakterze neuropatycznym - daje możliwości zastosowania takiego połączenia u pacjentów.

Całość przedstawionego do oceny opracowania obejmującego 142 strony, została ułożona w typowy sposób, charakterystyczny dla prac doktorskich i obejmuje: wstęp, cele pracy, materiały i metodykę badań, wyniki, dyskusję oraz wnioski i piśmiennictwo.

Katedra Farmakodynamiki

30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 55 30, e-mail: [jacek.sapa@uj.edu.pl](mailto:jacek.sapa@uj.edu.pl)

[www.farmacja.cm.uj.edu.pl](http://www.farmacja.cm.uj.edu.pl)

We wstępie autorka szczególnie koncentruje się na omówieniu patofizjologii bólu, szczególnie neuropatycznego oraz roli i wzajemnym powiązaniu w reakcji bólowej receptorów: NMDA i opioidowych. Porusza również problem współczesnej farmakoterapii bólu z wykorzystaniem leków opioidowych oraz znaczenie jonów magnezu w fizjologii i działaniu przeciwbólowym. Poprawnie zredagowany wstęp, wzbogacony sześcioma rycinami świadczy o bardzo dobrej znajomości problematyki podjętych badań przez doktorantkę.

Na kolejnych stronach pracy doktorskiej autorka opisuje użyte materiały i metody badawcze. Dobór gatunku zwierząt (szczury, szczep Wistar, samce) do konkretnych eksperymentów oraz zastosowane metody (pomiar bólu: test cofania tylniej łapy Randalla i Selitto, test cofania ogona - tail-flick) i analizy statystyczne są w pełni poprawne i nie budzą zastrzeżeń. Podobnie zastosowane metody Western blot (w celu ilości białka całkowitego i ufosforylowanego receptorów opioidowych  $\mu$  i podjednostki NR1 receptora NMDA) oraz testy immunoenzymatyczne ELISA (określenie aktywności kinaz).

Wszystkie badania na zwierzętach były przeprowadzone po uzyskaniu zgody II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach, działającej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym oraz I Lokalnej Komisji Etycznej przy Uniwersytecie Warszawskim.

Wyniki swoich badań autorka prezentuje w postaci 14 rycin. Wskazują one jednoznacznie, iż podanie jednorazowe morfiny (ośrodkowe i obwodowe) powoduje efekt antynocyceptywny w modelu receptorowego bólu ostrego przy zastosowaniu bodźca termicznego i mechanicznego. Jony magnezu podawane przed morfiną nasilały jej efekt. W doświadczalnym modelu bólu neuropatycznego autorka na podstawie otrzymanych wyników udowadnia, iż łączne podawanie jonów magnezu z morfiną, jak również magnez podawany przez 7 kolejnych dni podnoszą próg czucia mechanicznego bodźca nocyceptywnego. Co bardzo istotne, przeprowadza również eksperymenty biochemiczne mające na celu wskazanie potencjalnego mechanizmu powyższej interakcji. Wyniki wskazują, że zablokowanie funkcji receptorów NMDA przez podane jony magnezu przywraca w bólu neuropatycznym sygnalizację pomiędzy receptorem opioidowym  $\mu$  a receptorem NMDA i tym samym dochodzi do wznowienia aktywności receptorów opioidowych, co przekłada się na obserwowany efekt przeciwbólowy. Uzyskane wyniki niezaprzeczalnie mogą przełożyć się na wzrost skuteczności terapeutycznej z wykorzystaniem opioidów w leczeniu opornego bólu neuropatycznego.

Prawidłowo przeprowadzone eksperymenty, właściwie dobrany metodycznie warsztat badawczy nie tylko pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników, ale świadczą o niewątpliwym doświadczeniu mgr Kamili Kulik w zakresie pracy badawczej w tej tematyce.

W przeprowadzonej dyskusji wyników szeroko omawiany jest problem modulacji odpowiedzi p/bólowej w przypadku stosowania łącznego jonów magnezu z morfiną. Otrzymane wyniki w konfrontacji z dostępnymi danymi z piśmiennictwa jednoznacznie wskazują, iż efekt przeciwbólowy jonów magnezu związany jest z tymi rodzajami bólów w których zaangażowany jest receptor NMDA. To może dawać podstawy do przewlekłego, dodatkowego stosowania jonów magnezu w terapii bólu neuropatycznego w celu hamowania pobudzonych receptorów NMDA. Co więcej, doktorantka na podstawie przeprowadzonych badań własnych wskazuje, że mechanizm oddziaływania jonów magnezu na receptor NMDA może również wynikać z ich hamującego wpływu na aktywność kinaz białkowych: A i C. Świadczy o tym spadek aktywności obu enzymów po 7-dniowej aplikacji jonów magnezu u zwierząt z rozwiniętą neuropatią cukrzycową.

Znacząca liczba cytowanych pozycji piśmiennictwa - 324, świadczy o dogłębnej analizie literatury naukowej w zakresie zagadnień poruszanych w rozprawie, co znajduje odzwierciedlenie w redagowanym przez doktorantkę wstępie i dyskusji wyników badań.

Reasumując, należy jednoznacznie stwierdzić, iż cała praca doktorska magister Kamili Kulik jest na bardzo wysokim poziomie naukowym i świadczy o dużej erudycji autorki, swobodnie poruszającej się w tematyce badawczej. Zarówno podjęty temat badawczy, uzyskane wyniki i ich interpretacja świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu i kompetencjach doktorantki w planowaniu, przygotowaniu i prowadzeniu badań w zakresie farmakologii eksperymentalnej dotyczącej problemu bólu. Autorka uzyskała pokaźną pulę wyników, nie łatwych do interpretacji, a pomimo tego świetnie sobie z tym radzi w obszernej, wysoce merytorycznej dyskusji.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż część wyników ujętych w niniejszej pracy została już opublikowana w czasopiśmie: *International Journal of Molecular Sciences*, 2021;22(24):13599; tytuł: Magnesium and Morphine in the Treatment of Chronic Neuropathic Pain; autorzy: Kulik K, Żyżyńska-Granica B, Kowalczyk A, Kurowski P, Gajewska M, Bujalska-Zadrozny M; IF=5,924.

Czytając przedstawiony do oceny manuskrypt nasuwają mi się następujące uwagi:

- w celu wywołania bólu neuropatycznego zastosowany został uznany model neuropatii cukrzycowej po podaniu streptozocyny (wg. Nakhod, Wong 1979). Doktorantka podaje, że od 4 dnia eksperymentu poziom glukozy mieścił się w przedziale 380-480 mg/dL. W mojej opinii należało przedstawić wyniki przed podaniem streptozocyny, a następnie po podaniu, co pokazywałoby rozwój cukrzycy,
- w celu kontroli glikemii mierzono poziom glukozy we krwi przy użyciu glukometru. W metodyce nie ma podanej informacji jak była pobierana krew do badania od zwierząt,
- w przypadku przytaczanych rycin wskazane jest ujednoczenie językowe, jednakowe: angielskie lub polskie – Ryc. 4.

Zwróciły moją uwagę również nieliczne błędy literowe tj.: str. 32, Ryc. 4 *Fosforyolcja* – Fosforylacja, str. 42 *matabotropowym* – metabotropowym, str. 63 *Ddodatkowo* – Dodatkowo, str. 64 *najwiekszej* – największej, str. 77 *obserowowany* – obserwowany, str. 78 *podwyższło* – podwyższyło, str. 90 *fizjologicznie* – fizjologiczne, str. 93 *antynocyceptywne* – antynocyceptywny, str. 108 *neuroaptią* – neuropatią.

Wątpliwości te, czy też zauważone błędy literowe, w żaden sposób nie pomniejszają wartości naukowej ocenianej rozprawy doktorskiej.

Aby dać jednoznaczną odpowiedź na pytanie czy niniejsza rozprawa spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim w świetle obowiązujących przepisów trzeba postawić sobie trzy zasadnicze pytania. Po pierwsze, czy rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o stopień doktora ?

Jednoznacznie można odpowiedzieć na to pytanie – tak. Świadczy o tym prezentowana przez doktorantkę wiedza w zakresie tematyki badawczej, przedstawiona w wstępie pracy, jak również w dyskusji w oparciu o cytowane pozycje piśmiennictwa.

Po drugie, czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o stopień doktora ?

Nie można mieć w tej kwestii żadnych zastrzeżeń i jednoznacznie dać odpowiedź – tak. Magister Kamila Kulik prowadząc swoje badania naukowe wykorzystuje uznane metody eksperymentalne w tej tematyce badawczej. Właściwie analizuje otrzymane wyniki i wyciąga prawidłowe wnioski. Co jest szczególnie istotne dla pracy naukowej, swoje wyniki umiejętnie konfrontuje z danymi literaturowymi, co pozwala jej na wyciągnięcie bardziej precyzyjnych wniosków.

I wreszcie, czy rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i zastosowanie wyników w sferze gospodarczej lub społecznej ?

Nie budzi to żadnych wątpliwości i należy odpowiedzieć – tak. Otrzymane wyniki stanowią istotną przesłankę do zastosowania jonów magnezu w połączeniu z opioidami w terapii uzupełniającej bólu (szczególnie neuropatycznego). Wykazana skuteczność w badaniach eksperymentalnych, jak również wskazany mechanizm działania i obecne dane literaturowe są mocnymi argumentami przemawiającymi za wykorzystaniem tego połączenia w praktyce klinicznej.

Podsumowując, wartość poznawcza pracy, prawidłowy warsztat badawczy dotyczący farmakologii eksperymentalnej bólu, jak również uzyskane obiecujące wyniki pozwalają mi jednoznacznie stwierdzić, iż oceniana przeze mnie praca doktorska odpowiada w pełni obowiązującym wymogom ustawowym. Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie magister Kamili Kulik do dalszego etapu przewodu doktorskiego tj. do publicznej obrony.

Istotna tematyka badań, uzyskane innowacyjne wyniki (częściowo już publikowane), jak również wysoka jakość merytoryczna i edytorska rozprawy doktorskiej pozwalają mi wystąpić z wnioskiem o wyróżnienie niniejszej pracy.

Katedra Farmakodynamiki UJ CM

*prof. dr hab. Jacek Sapa*  
kierownik