

Prof. dr hab. Stanisław Okrasa
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
UWM w Olsztynie
10-718 OLSZTYN
ul. Oczapowskiego 1A

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. med. Tomasza Charytoniuka
pt.: "Rola kannabidiolu (CBD) w niwelowaniu insulinooporności mózgowia"**

KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA SYLWETKI DOKTORANTA

Lek. med. Tomasz Charytoniuk ukończył studia na Wydziale Lekarskim z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w roku 2019. Należy odnotować, że był On wyróżniającym się i wielokrotnie nagradzonym studentem; 2-krotnie był laureatem Stypendium Naukowego Ministra Zdrowia, 4-krotnie otrzymywał Stypendium Naukowe Rektora UM w Białymstoku, a w momencie ukończenia studiów został wyróżniony przez Dziekana Wydziału Lekarskiego oraz otrzymał Nagrodę Prorektora ds. Nauki UM w Białymstoku. W okresie studiów odbył 5 staży zagranicznych w oddziałach szpitalnych o różnych specjalnościach medycznych: w Danii, USA, Kanadzie, Niemczech oraz Tajwanie. Podczas studiów uczestniczył w badaniach prowadzonych w ramach programu MNiSW, a także angażował się w działalność studenckich kół naukowych oraz prace na rzecz macierzystego Wydziału i Uczelni. Studia doktoranckie realizował na macierzystym wydziale w latach 2019-2022. W tym okresie kierował trzema projektami badawczymi tematycznie powiązаныmi z problematyką badawczą realizowaną w ramach pracy doktorskiej. Dodatkowo, w 2021 r. ukończył Studia Podyplomowe w Szkole Głównej Handlowej w Warszawie w zakresie Zarządzania Organizacjami Ochrony Zdrowia. Na podkreślenie zasługuje znaczący dorobek naukowy Doktoranta, obejmujący 13 publikacji oraz 16 doniesień konferencyjnych. W ośmiu publikacjach (spośród 13) jest On pierwszym autorem. W dniu 1 marca br., liczba cytowań Jego prac w bazie *Scopus* wynosiła 117, a po wyłączeniu autocytowań – 109.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona do oceny praca doktorska lek. med. Tomasza Charytoniuka została wykonana w Zakładzie Fizjologii Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem prof. dr hab. n.med. Adriana Chabowskiego – pełniącego rolę głównego promotora oraz dr n.med. Karoliny Konstantynowicz-Nowickiej, która była promotorem pomocniczym. Na rozprawę doktorską składają się trzy prace opublikowane w języku angielskim w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania IF wynosi 17,550, a punktacja wg MEiN – 380.

1. **Charytoniuk T.**, Sztolsztener K., Harasim-Symbor E., Berk K., Chabowski A., Konstantynowicz-Nowicka K., Cannabidiol - A phytocannabinoid that widely affects sphingolipid metabolism under conditions of brain insulin resistance. *Biomed. & Pharmacother.* 2021,142: 112057.
IF=7,419, MEiN=100
2. **Charytoniuk T.**, Zywno H., Konstantynowicz-Nowicka K., Berk K., Bzdega W., Chabowski A., Can Physical Activity Support the Endocannabinoid System in the Preventive and Therapeutic Approach to Neurological Disorders? *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21: 4221.
IF=5,923, MEiN=140
3. **Charytoniuk T.**, Zywno H., Berk K., Bzdega W., Kolakowski A., Chabowski A., Konstantynowicz-Nowicka K., The Endocannabinoid System and Physical Activity-A Robust Duo in the Novel Therapeutic Approach against Metabolic Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23: 3083.
IF=6,208, MEiN=140

Pierwsza z wymienionych publikacji jest pracą oryginalną, a pozostałe (2 i 3) – są pracami przeglądowymi. We wszystkich załączonych publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, a w dwóch spośród nich (1 i 2) był również autorem korespondencyjnym. Wkład Doktoranta w przeprowadzenie badań i przygotowanie tych publikacji odpowiednio wynosił: 70%, 70% i 36%. Realizacja rozprawy doktorskiej była finansowana w ramach grantu NCN (*publikacja 1*) oraz grantów uczelnianych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (*publikacja 1 i 3*). Rozprawę doktorską lek. med. Tomasza Charytoniuka poprzedza *Spis treści* oraz prezentacja informacji dotyczących jego wykształcenia, dorobku naukowego (podanego w formie wykazu publikacji i doniesień konferencyjnych), zrealizowanych projektów badawczych, odbytych staży naukowych i uzyskanych wyróżnień, a także – aktywności w kołach naukowych i organizacjach studenckich oraz pracy na rzecz macierzystej Uczelni. W części wprowadzającej zamieszczono także *Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń*. Główna część rozprawy doktorskiej zawiera typowe dla tego typu opracowania części, takie jak: *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, które opisano odnosząc się do rycin zamieszczonych w załączonej pracy oryginalnej oraz *Wnioski* i *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, jak również zestawienie cytowanego piśmiennictwa, obejmujące ponad 80 pozycji. W rozprawie doktorskiej zamieszczono również indywidualne oświadczenia współautorów i zbiorcze zestawienie zawierające informacje o ich procentowym udziale w realizacji badań i przygotowaniu poszczególnych publikacji oraz czynnościach wykonywanych w ramach tego udziału. Oświadczenia współautorów zawierają także stwierdzenia wyrażające ich zgodę na wykorzystanie publikacji w postępowaniu o nadanie lek. med. Tomaszowi Charytoniukowi stopnia doktora. W przedstawionym opracowaniu, Doktorant zamieścił kopię Uchwały (Nr 71/2018) Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie zezwalającej na przeprowadzenie badań na zwierzętach.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Temat pracy doktorskiej lek. med. Tomasza Charytoniuka dotyczy bardzo ważnego z medycznego punktu widzenia problemu, tj. insulinooporności w obrębie mózgowia i możliwości jej łagodzenia. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wskazują na istotny udział insuliny w procesach pamięciowych i poznawczych, a także procesach związanych z neuroplastycznością. Badania kliniczne potwierdziły korelację pomiędzy insulinoopornością i chorobami otępiennymi oraz otyłością. Dostępność insuliny w mózgu zależy od efektywności jej transportu przez barierę krew-mózg. Z kolei skuteczność działania insuliny na poziomie komórek docelowych zależy od poziomu ekspresji jej receptorów (IRec), zlokalizowanych w błonie komórkowej oraz białek substratowych współdziałających z podjednostkami β tych receptorów (IRS-1 i -2), jak również – sprawności insulinowych szlaków przekaźnictwa sygnału (głównie: P13/Akt/GSK i Raf/Ras/MEK/MAPK). Prawidłowe funkcjonowanie szlaków sygnałowych insuliny jest niezbędne do utrzymania homeostazy w ośrodkowym układzie nerwowym. Szlaki te mogą ulegać zaburzeniu m.in. pod wpływem oddziaływania sfingolipidów (takich jak: ceramid, sfinganina, sfingozyna i sfingomielina) powstających w nadmiarze w komórkach wskutek zwiększonej wewnątrzkomórkowej akumulacji lipidów w warunkach diety bogatej w długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (LCFA). Szczególnie zaburzenia w funkcjonowaniu szlaku P13/Akt/GSK sprzyjają obniżeniu insulinooporności i mogą doprowadzić do wystąpienia zmian neurodegeneracyjnych, powiązanych z upośledzeniem procesów pamięciowych. Aktualną wiedzę dotyczącą tej problematyki przedstawiono w formie skróconej we *Wstępie* rozprawy doktorskiej. Badania podjęte przez lek. med. Tomasza Charytoniuka dobrze wpisują się w nurt niezwykle ważnych dociekań naukowych zmierzających do złagodzenia zaburzeń towarzyszących chorobom metabolicznym i neurodegeneracyjnym u ludzi, których częstotliwość wykazuje wyraźną i zarazem niepokojącą tendencję wzrostową we współczesnych społeczeństwach. Na podstawie najnowszego piśmiennictwa wskazującego na możliwość oddziaływania endogennego układu kannabinoidowego na metabolizm sfingolipidów oraz funkcjonowanie insulinowych szlaków sygnałowych, Doktorant założył, że **kannabidiol** (CBD) – fitokannabinoid uzyskiwany z konopi siewnych, pozbawiony komponenty psychoaktywnej – może powodować obniżenie poziomu insulinooporności w obrębie tkanki mózgowej.

W celu weryfikacji powyższego założenia, Doktorant postanowił zbadać:

- 1) wpływ CBD na zawartość poszczególnych frakcji sfingolipidów w korze mózgowej szczurów doświadczalnych;
- 2) wpływ CBD na ekspresję i fosforylację białek szlaku sygnałowego insuliny w korze mózgowej szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową;
- 3) zależność pomiędzy zmianami ilości sfingolipidów a stopniem fosforylacji białek szlaku sygnałowego insuliny w korze mózgowej szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową;
- 4) wpływ CBD na stopień fosforylacji białka Tau, zaangażowanego w rozwój zmian neurodegeneracyjnych w korze mózgowej szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową;
- 5) wpływ CBD na wybrane elementy endokannabinoidomiu w korze mózgowej szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową.

Moim zdaniem, sformułowane przez Doktoranta – powyżej przytoczone – szczegółowe cele realizowane w ramach pracy doktorskiej w wystarczającym zakresie pod względem merytorycznym wyczerpują podjęty problem badawczy. Badania zostały przeprowadzone na samcach szczurów Wistar, które zostały podzielone na 4 grupy doświadczalne (4×10). Dwie grupy (I i II) były karmione paszą standardową, zawierającą 20% tłuszczu i dwie (III i IV) – paszą o podwyższonej zawartości tłuszczu do 60% (HFD). Jednej z grup żywionych standardowo (I/ kontrola) i jednej z grup żywionych karmą bogatotłuszczową (III/ HFD) podawano rozpuszczalnik bez dodatku testowanej substancji, a pozostałe dwie grupy (II/ CBD i IV/ HFD+CBD) otrzymywały CBD w ilości 10 mg/kg masy ciała/dzień. Doświadczenie trwało 7 tygodni, a CBD lub rozpuszczalnik bez testowanej substancji podawano dootrzewnowo przez ostatnie 14 dni trwania eksperymentu. Zastosowany układ doświadczalny pozwolił określić efekt działania CBD zarówno w warunkach standardowego żywienia, jak i w stanie insulinooporności indukowanej dietą wysokotłuszczową. Badania uwzględniały bardzo szeroki zakres analiz laboratoryjnych obejmujący liczne oznaczenia, takie jak:

- poziomy ekspresji receptorów i enzymów endokannabinoidomiu: receptora kannabinoidowego typu 1 (CB1R), receptora sprzężonego z białkiem G55 (GPR55), receptora waniloidowego 1 (VR1), receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów α , β i γ (PPAR α , β i γ), receptora serotoninowego 1A (HTR1A) oraz hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych 1 (FAAH1);
- poziomy ekspresji białek i ich fosforylowanych form zaangażowanych w szlak sygnałowy insuliny: substratu 1 receptora insuliny i jego fosforylowanej formy (IRS-1, pIRS-1(S302)), kinazy białkowej B i jej fosforylowanych form (Akt, pAkt(Thr305), pAkt(Thr308) oraz pAkt(S473), pAkt(S472, S473 i S474)), kinazy syntazy glikogenu 3 α i jej fosforylowanych form (GSK-3 α , p GSK-3 α (Ser21), GSK-3 α (Tyr279)) oraz kinazy syntazy glikogenu 3 β i jej fosforylowanych form (GSK-3 β , pGSK-3 β (Ser9) i GSK-3 β (Tyr216));
- tkankowe stężenia poszczególnych sfingolipidów: sfingozyny, sfinganiny, ceramidu, sfingozyno-1-fosforanu, sfinganino-1-fosforanu i sfingomieliny;
- ekspresję wybranych enzymów zaangażowanych w metabolizm sfingolipidów: palmitylotransferazy serynowej 1 i 2 (SPTLC1 i 2), syntazy ceramidu 4 i 6 (LASS4 i 6), ceramidaz – kwaśnej, obojętnej i zasadowej (odpowiednio: ASAH1, ASAH2 i PHCA), sfingomielinazy obojętnej (N-SMase) oraz kinazy sfingozyny 1 i 2 (SPHK1 i 2);
- poziomy ekspresji białka Tau i jego fosforylowanych form: pTau(S202), pTau(S396), pTau(S404) i pTau(S416).

Przeprowadzenie powyższych analiz było bardzo pracochłonne i wymagało zastosowania następujących technik laboratoryjnych: metody Western Blot, wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), chromatografii gazowej (GLC) oraz chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Do przeprowadzenia statystycznej analizy wyników zastosowano odpowiednie metody: dwuczynnikową analizę wariancji (two-way ANOVA), a następnie do oceny poziomu istotności pomiędzy średnimi wartościami – test Tukeya oraz test t-Studenta. Informacje dotyczące metodyki badań Doktorant przedstawił w sposób zwięzły i przystępny w *Autoreferacie* (w części *Material i metody*) i pracy oryginalnej.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej lek. med. Tomasza Charytoniuka zostały opublikowane w czasopiśmie naukowym (*Biomedicine & Pharmacotherapy*) posiadającym wysoki współczynnik oddziaływania IF, wynoszący 7,419 (punktacja MEiN=100). Doktorant opisał je również w załączonym *Autoreferacie*.

Na podkreślenie zasługują zmiany stwierdzone pod wpływem CBD w tkance mózgowej szczurów w obrębie tego samego sposobu żywienia:

a) w zakresie działania CBD na stężenie sfingolipidów:

- wzrost sfinganiny i sfingozyny u zwierząt karmionych paszą standardową, a obniżenie w przypadku stosowania diety bogatotłuszczowej oraz obniżenie ceramidu u zwierząt karmionych paszą bogatotłuszczową;
- wzrost sfingozyno-1-fosforanu tylko w grupie karmionej paszą standardową oraz wzrost sfingomieliny (istotny, ale procentowo umiarkowany) w przypadku stosowania obu sposobów żywienia;

b) w zakresie wpływu CBD na ekspresję enzymów zaangażowanych w syntezę ceramidu:

- obniżenie ekspresji palmitylotransferazy serynowej 1 u zwierząt karmionych paszą standardową oraz palmitylotransferazy serynowej 2 u zwierząt karmionych paszą bogatotłuszczową;
- obniżenie ekspresji syntazy ceramidu 4 w warunkach stosowania diety standardowej, jak i bogatotłuszczowej oraz syntazy ceramidu 6 – w przypadku diety bogatotłuszczowej;

c) w zakresie wpływu CBD na ekspresję enzymów zaangażowanych w metabolizm ceramidu:

- obniżenie ekspresji sfingomielinazy obojętnej u zwierząt karmionych paszą standardową, a wzrost jej w przypadku stosowania diety bogatotłuszczowej;
- obniżenie ekspresji kinazy sfingozyny 1 u zwierząt karmionych paszą standardową i bogatotłuszczową oraz kinazy sfingozyny 2 w warunkach stosowania diety bogatotłuszczowej;

d) w zakresie wpływu CBD na ekspresję białek zaangażowanych w szlak sygnałowy insuliny:

- zmiany współczynników fosforylacji kinazy białkowej B: wzrost pAkt(S472, S473, S474):Akt, a zmniejszenie pAkt(S473):Akt u szczurów karmionych dietą standardową;
- zmiany współczynników fosforylacji kinaz syntazy glikogenu 3 α i 3 β : wzrost pGSK-3 α (Ser21):GSK-3 α / β i pGSK-3 β (Ser9):GSK-3 α / β , natomiast zmniejszenie pGSK-3 α (Tyr279):GSK-3 α / β i pGSK-3 β (Tyr216):GSK-3 α / β u szczurów karmionych paszą bogatotłuszczową;

e) w zakresie wpływu CBD na ekspresję białka Tau:

- zmiany współczynnika fosforylacji białka Tau: zmniejszenie pTau(S202):Tau, pTau(S396):Tau i pTau(S416):Tau u szczurów karmionych paszą bogatotłuszczową oraz wzrost pTau(S396):Tau u szczurów karmionych dietą standardową;

f) w zakresie oddziaływania CBG na ekspresję wybranych składowych endokannabinoidomów:

- obniżenie poziomu ekspresji receptora 5-hydroksytryptaminy 1A u zwierząt karmionych zarówno paszą standardową, jak i bogatotłuszczową oraz w przypadku receptora aktywowanego przez proliferatory peroksosomów γ – obniżenie w warunkach diety standardowej, a wzrost podczas stosowania diety bogatotłuszczowej;

Interesujące są także efekty działania diety bogatotłuszczowej na rozpatrywane w badaniach parametry. Mianowicie, w wyniku stosowania diety bogatotłuszczowej w żywieniu szczurów w porównaniu z dietą standardową, Doktorant stwierdził w ich tkance mózgowej: **wzrost** – stężenia sfingozyny, sfinganiny i ceramidu, współczynników fosforylacji kinazy białkowej B (pAkt(Thr305):Akt, pAkt(Thr308):Akt i pAkt(S472, S473, S474):Akt), współczynników fosforylacji kinazy syntazy glikogenu (pGSK-3 α (Tyr279):GSK-3 α / β i GSK-3 β (Tyr216):GSK-3 α / β) oraz białka Tau (pTau(S202):Tau, pTau(S396):Tau, pTau(S404):Tau i pTau(S416):Tau), jak również ekspresji receptora 5-hydroksytryptaminy 1A, natomiast **zmniejszenie** – współczynników fosforylacji kinazy

syntazy glikogenu (pGSK-3 α (Ser21):GSK-3 α/β i pGSK-3 β (Ser9):GSK-3 α/β) oraz ekspresji receptora aktywowanego przez proliferatory peroksydomów α i γ .

Uzyskane przez Doktoranta wyniki zostały poddane wnikliwej dyskusji w kontekście wcześniejszych badań w załączonej pracy oryginalnej. Przeanalizowano w niej kluczowe kwestie związane z działaniem CBD w tkance mózgowej, tj. stwierdzone zmiany zawartości sfingolipidów oraz enzymów zaangażowanych w ich syntezę i metabolizm, zmiany w ekspresji zarówno białek zaangażowanych w szlak sygnałowy insuliny, jak i białka Tau (uwzględniając poziomy ich fosforylacji), a także zmiany ekspresji innych składowych endokannabinoidom. Jak wcześniej podano, w badaniach stwierdzono zmniejszenie zawartości w tkance mózgowej niektórych sfingolipidów pod wpływem CBD w warunkach stosowania diety bogatotłuszczowej, tj. sfinganiny, sfingozyny i ceramidu. Biorąc pod uwagę fakt, że sfinganina jest prekursorem ceramidu na drodze syntezy *de novo*, a sfingozyna – w ramach tzw. szlaku ratunkowego, można wnioskować o możliwości oddziaływania CBD na obydwa wymienione szlaki w warunkach zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych (przy diecie bogatotłuszczowej). W badaniach Doktoranta, hamujący wpływ CBD na szlak *de novo* syntezy ceramidu dodatkowo został potwierdzony wystąpieniem obniżonej ekspresji palmitylotransferazy serynowej 2 oraz syntazy ceramidu 4 i 6 po podaniu tej substancji. Doktorant słusznie przyznaje, że w celu potwierdzenia uzyskanych wyników wskazane byłoby użycie w przyszłych badaniach specyficznych blokerów szlaku *de novo* syntezy ceramidu. Niespodziewane okazało się zwiększenie pod wpływem CBD – w grupie karmionej dietą bogatotłuszczową – ekspresji sfingomielinazy obojętnej (N-SMazy), która katalizuje przekształcenie sfingomieliny do ceramidu. Prawdopodobnie z tego powodu, w tej grupie redukcja poziomu ceramidu w tkance mózgowej pod wpływem CBD była mniejsza niż sfinganiny i sfingozyny. W zakresie oddziaływania CBD na szlak sygnałowy insuliny, najbardziej uwidocznił się wpływ tej substancji na poziom fosforylacji kinazy syntazy glikogenu 3 α i 3 β . Mianowicie, u szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową stwierdzono wzrost poziomu fosforylacji w pozycji Tyr 279 i Tyr 216 oraz obniżenie go w pozycji Ser 21 i Ser 9 (w porównaniu z grupą kontrolną), natomiast zastosowanie CBD spowodowało odwrócenie tych zmian. Takie działanie CBD może być przyczyną obniżonej fosforylacji białka Tau, którą Doktorant wykazał w pozycjach: S202, S396 i S416. Wyniki te wskazują, że kinazy syntazy glikogenu są elementem szlaku sygnałowego insuliny podatnym na działanie CBG, które blokuje rozwój insulinooporności w szczurzym modelu doświadczalnym otyłości. Spośród badanych składowych endokannabinoidom, u szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową wykazano wzrost ekspresji receptora aktywowanego przez proliferatory peroksydomów γ oraz obniżenie ekspresji receptora 5-hydroksytryptaminy 1A w wyniku podawania CBD. Kannabidiol, będąc agonistą pierwszego z wymienionych receptorów, poprzez jego aktywację może działać przeciwzapalne, co w pewnym stopniu ogranicza rozwój procesów neurodegeneracyjnych. Z kolei, zmniejszona ekspresja receptora 5-hydroksytryptaminy 1A w przypadku stosowania CBD potencjalnie może przyczyniać się do redukcji stresu oksydacyjnego i spowolnienia procesów o charakterze neurodegeneracyjnym. Na to wskazują również doniesienia innych autorów, którzy w swoich badaniach stosowali blokowanie receptora 5-hydroksytryptaminy 1A. Wydaje się, że brak zmian ekspresji innych receptorów zaliczanych do endokannabinoidom (tj. receptora kannabinoidowego typu 1 i receptora waniloidowego 1) po zastosowaniu CBD nie wyklucza całkowicie ich udziału w mechanizmie działania tego fitokannabinoidu, ponieważ efekt biologiczny działania jakiejś substancji na komórkę docelową zależy nie tylko od zmiany poziomu ekspresji jej receptora, ale również stopnia jego aktywacji. Na podstawie uzyskanych wyników, Doktorant sformułował 5 wniosków, które nawiązują do insulinooporności (w przeprowadzonych badaniach indukowanej przez stosowanie diety bogatotłuszczowej) oraz wskazują potencjalne możliwości wykorzystania kannabidiolu w terapiach chorób neurodegeneracyjnych.

Rozprawa doktorska lek. med. Tomasza Charytoniuka, oprócz pracy oryginalnej, zawiera dwie publikacje przeglądowe, w których – na bazie dostępnego piśmiennictwa – przeanalizowano możliwość pozytywnego oddziaływania aktywności fizycznej, za pośrednictwem endogenego układu kannabinoidowego, na zaburzenia metaboliczne i zaburzenia o charakterze neurologicznym. W pracach tych przedstawiono złożoną strukturę układu endokannabinoidowego i jego funkcjonowanie, m.in. wyszczególniając substancje zaliczane do endokannabinoidów, klasyczne

receptory kannabinoidowe (CB1R i CB2R) oraz inne receptory, poprzez które dodatkowo mogą one działać, a także opisując wewnątrzkomórkowe następstwa aktywacji tych receptorów. Doktorant również przedstawił w tych pracach piśmiennictwo wskazujące na zróżnicowany wpływ aktywności fizycznej na układ endokannabinoidowy w zależności od jej rodzaju, intensywności i czasu trwania oraz płci. Jedną z tych prac (z roku 2020) skupia się na efektach aktywności fizycznej odnoszących się do chorób neurologicznych, takich jak: niepokój i depresja, choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, stwardnienie rozsiane i epilepsja, z kolei druga (z roku 2022) – odnosi się do chorób metabolicznych, takich jak: otyłość i otłuszczenie wątroby oraz insulinooporność i cukrzyca typu 2 (T2DM). Prace przeglądowe włączone do rozprawy doktorskiej wskazują na znaczenie aktywności fizycznej w profilaktyce zaburzeń metabolicznych i chorób neurologicznych oraz potrzebę prowadzenia dalszych badań dotyczących zależności pomiędzy aktywnością fizyczną, zmianami w obrębie układu endokannabinoidowego i stanem zdrowia człowieka. Generalnie, można zastanawiać się nad tym, czy proporcja prac oryginalnych (1) do przeglądowych (2) w rozprawie doktorskiej lek. med. Tomasza Charytoniuka jest właściwa. Szeroki zakres badań uwzględnionych w pracy oryginalnej oraz znaczenie tematyki poruszonej w pracach przeglądowych i ścisły jej związek z problematyką przeprowadzonych badań pozwala mi bez zastrzeżeń zaakceptować strukturę ocenianej rozprawy doktorskiej.

UWAGI i PYTANIA

Poniżej przedstawiam uwagi/pytania, które nasunęły mi się podczas czytania i analizy ocenianej rozprawy doktorskiej.

1. Czy badano przyrosty masy ciała u badanych szczurów w toku doświadczenia? Jeśli tak, czy wystąpiły jakieś różnice w przyrostach masy ciała pomiędzy grupami żywionymi dietą standardową i bogatotłuszczową?
2. Podano rozbieżne informacje dotyczące Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach: w *Autoreferacie*, że była to komisja działająca w Olsztynie, a w publikacji 1 – że w Białymstoku. Z kolei, załączona zgoda na przeprowadzenie badań była wystawiona przez LKE w Olsztynie, ale jej treść nie odpowiada zakresowi przeprowadzonych badań. Proszę o wyjaśnienie tych rozbieżności.
3. Czy rozważał Pan możliwość oznaczania wybranych parametrów we krwi badanych szczurów (np. insuliny lub innych).
4. Czy u badanych szczurów zauważono wpływ diety bogatotłuszczowej na apetyt? Z tym zagadnieniem wiąże się moje kolejne pytanie. Czy peptydy zaangażowane w regulację apetytu mogą modulować funkcjonowanie układu endokannabinoidowego i czy taka sytuacja (jeśli miała miejsce) mogłaby mieć wpływ na uzyskane przez Pana wyniki?
5. Białko Tau jest również traktowane przez badaczy jako potencjalny punkt uchwytu dla leków mogących obniżyć jego neurotoksyczność w przypadku chorób neurodegeneracyjnych. Czy na podstawie poznanego piśmiennictwa mógłby Pan coś powiedzieć o postępie badań w tym zakresie.
6. Generalnie rozprawa doktorska jest napisana starannie, jednak zauważyłem w niej kilka drobnych niedociągnięć o charakterze redakcyjnym:
 - na str. 30 (wiersz 2 od dołu) pomyłkowo podano 3α zamiast 3β ;
 - w wyszczególnieniu zakresu przeprowadzonych analiz (str. 30/31, podpunkt 5) pominięto kinazy sfingozyny 1 i 2;
 - mimo powszechnego używania w polskich opracowaniach naukowych określenia „spadek”, sugerowałbym je zastępować innymi lepiej brzmiącymi, np. „zmniejszenie” lub „obniżenie”.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że badania przeprowadzone przez lek. med. Tomasza Charytoniuka w ramach rozprawy doktorskiej dostarczyły wiele wartościowych danych, które zostały opublikowane w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania (IF=7,419). Badania

te udokumentowały szereg zmian pod wpływem kannabidiolu, które wystąpiły w tkance mózgowej szczurów z insulinopornością wywołaną dietą bogatotłuszczową. Zmiany te dotyczyły: zawartości sfingolipidów i ekspresji enzymów zaangażowanych w ich syntezę i metabolizm, ekspresji i poziomu fosforylacji białek zaangażowanych w szlak sygnałowy insuliny, ekspresji wybranych składowych endokannabinoidomu, jak również ekspresji i fosforylacji białka Tau powiązanego z patogenezą chorób neurodegeneracyjnych. Na podkreślenie zasługuje wykazana przez Doktoranta zdolność kannabidiolu m.in. do: 1) obniżania zawartości głównych sfingolipidów stanowiących molekularne podłoże zmian neuropatologicznych, 2) modyfikacji poziomu fosforylacji określonych reszt tyrozynowych (obniżenie) i serynowych (wzrost) w kinazach syntazy glikogenu $3\alpha/\beta$ sprzyjającej obniżeniu fosforylacji białka Tau oraz 3) indukowania korzystnych zmian w ekspresji receptora 5-hydroksytryptaminy 1A (zmniejszenie, sprzyjające redukcji stresu oksydacyjnego) oraz receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów γ (wzrost, sprzyjający ograniczeniu aktywności czynników prozapalnych). W realizacji części doświadczalnej rozprawy doktorskiej lek. med. Tomasza Charytoniuka, bardzo wysoko oceniam wielowątkowe podejście do podjętego problemu badawczego, ponieważ pozwoliło ono ustalić kilka szczególnie wrażliwych miejsc na działanie kannabidiolu i wskazać kierunki dalszych badań dotyczących możliwości wykorzystania tego związku (lub syntetycznych jego analogów) w profilaktyce i terapii chorób neurodegeneracyjnych. Włączone do rozprawy doktorskiej Kandydata prace przeglądowe świadczą o bardzo dobrej znajomości piśmiennictwa dotyczącego problematyki prowadzonych.

Przygotowanie ocenianej rozprawy doktorskiej wymagało od Kandydata dużego nakładu pracy m.in. związanej z: 1) przeprowadzeniem badań, 2) zapoznaniem się z rozległym piśmiennictwem z obszaru podjętej tematyki badawczej oraz 3) przygotowaniem 3 publikacji. Oprócz rozprawy doktorskiej, także pozostały dorobek publikacyjny (10 publikacji, w tym 5 z pierwszym autorstwem) oraz odbyte staże wskazują na wysoki potencjał Doktoranta w zakresie realizowania projektów badawczych w ogóle, a w szczególności – związanych z problematyką medyczną. Zauważone przeze mnie w pracy doktorskiej nieścisłości i usterki nie obniżają jej wysokiej wartości merytorycznej.

WNIOSEK KOŃCOWY

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa zatytułowana **”Rola kannabidiolu (CBD) w niwelowaniu insulinoporności mózgowia”** spełnia wymagania – określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2022 r., poz. 574 z późn. zm.) – stawiane rozprawom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Pana Tomasza Charytoniuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres badań przeprowadzonych przez Doktoranta w ramach ocenianej rozprawy, dotyczących ważnej problematyki związanej ze zdrowiem człowieka i wysoką wartość naukową uzyskanych wyników badań oraz dobrą znajomość podjętej problematyki badawczej, potwierdzoną dwoma publikacjami przeglądowymi w czasopismach zagranicznych, jak również bogaty dorobek publikacyjny – obejmujący 10 dodatkowych prac (w tym 5 z pierwszym Jego autorstwem) – przedkładam wniosek o rozważenie możliwości wyróżnienia rozprawy doktorskiej lek. med. Tomasza Charytoniuka.

Olsztyn 12.03.2023 r.

Stanisław Okrasa

S. Okrasa