

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

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Klaudii Berk**  
**pt.: "Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów**  
**w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością**  
**indukowaną dietą bogatotłuszczową"**

### **KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA SYLWETKI DOKTORANTKI**

**Lek. med. Klaudia Berk** jest absolwentką kierunku lekarskiego na Wydziale Lekarskim z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Bezpośrednio po ukończeniu studiów medycznych w roku 2019, podjęła na tym samym wydziale 4-letnie studia doktoranckie. Od roku 2021 realizuje także staż rezydencki w dziedzinie genetyka kliniczna w Podlaskim Centrum Genetycznym „Genetics”. W latach 2016-2018, Doktorantka odbyła trzy staże w zagranicznych placówkach medycznych; w Hanowerze (Niemcy), Rzymie (Włochy) oraz Porto (Portugalia). Jako studentka, uczestniczyła w pracach kół naukowych oraz pracach na rzecz macierzystego Wydziału. Podczas studiów otrzymywała stypendia naukowe; JM Rektora macierzystej Uczelni – w latach 2015-2018 oraz Ministra Zdrowia – w roku 2016. W roku ukończenia studiów medycznych (2019), została wyróżniona przez Dziekana Wydziału Medycznego oraz otrzymała nagrodę Prorektora ds. Nauki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Od 2022 roku jest członkiem Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka.

Na podkreślenie zasługuje znaczący dorobek publikacyjny Pani Klaudii Berk, który łącznie obejmuje 29 pozycji. Na dorobek ten składa się 10 prac oryginalnych, 5 przeglądowych i 14 doniesień konferencyjnych. Odnotować należy, że jest Ona pierwszym autorem w 6 pracach oraz w 9 doniesieniach konferencyjnych. Współczynnik oddziaływania (IF) prac naukowych, których Doktorantka jest współautorem wynosi 60,929, a punktacja MEiN – 1260. Według bazy *Scopus*, w dniu 24 lipca br., liczba cytowań tych publikacji wynosiła 168, a po wyłączeniu autocytowań – 159. Dorobek publikacyjny Doktorantki w znacznym stopniu jest efektem Jej udziału w realizacji czterech projektów badawczych.

### **OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Praca doktorska lek. med. Klaudii Berk 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. Funkcję promotora pomocniczego w Jej przewodzie doktorskim pełniła Pani dr n.med. Karolina Konstantynowicz-Nowicka. Ocenianą rozprawę doktorską tworzą dwie niżej wyszczególnione prace, opublikowane w czasopismach anglojęzycznych, których łączny współczynnik oddziaływania IF wynosi 11,172, a punktacja wg MEiN – 280.

1. **Berk K.,** Konstantynowicz-Nowicka K., Charytoniuk T., Harasim-Symbor E., Chabowski A. Distinct Effects of Cannabidiol on Sphingolipid Metabolism in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues Derived from High-Fat-Diet-Fed Male Wistar Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23: 5382.  
*IF=6,208, MEiN=140*

2. **Berk K.**, Bzdega W., Konstantynowicz-Nowicka K., Charytoniuk T., Zywno H., Chabowski A. Phytocannabinoids – A Green Approach toward Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Treatment. *J. Clin. Med.* 2021, 10: 393.  
*IF=4,964, MEiN=140*

Pierwsza z wymienionych publikacji jest pracą oryginalną, ściśle powiązaną z tematem rozprawy doktorskiej, druga – pracą przeglądową, w której opisano rolę systemu endokannabinoidowego w rozwoju niealkoholowego stłuszczenia wątroby (NAFLD) oraz możliwości wykorzystania fitokannabinoidów w terapii tego zaburzenia. Wkład Doktorantki w przeprowadzenie badań i przygotowanie pracy oryginalnej wynosił 70%, podobnie jak w przypadku przygotowania pracy przeglądowej (wynosił także 70%), co zostało potwierdzone w zbiorczym zestawieniu i załączonych indywidualnych oświadczeniach współautorów tych publikacji. W obu publikacjach, Doktorantka jest pierwszym autorem i równocześnie autorem korespondencyjnym. Badania przedstawione w pracy oryginalnej były finansowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki (2017/26/D/ NZ3/01119) oraz środków finansowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (SUB/1/DN/21/007/1118).

Struktura rozprawy doktorskiej lek. med. Klaudii Berk jest zgodna z obecnie przyjętymi zasadami. W pierwszej części opracowania przedstawiono: *Spis treści* oraz informacje dotyczące Jej wykształcenia, dorobku publikacyjnego, zrealizowanych projektów badawczych, odbytych staży naukowych i uzyskanych wyróżnień, a także działalności pozanaukowej. W części otwierającej rozprawę doktorską zamieszczono zestawienie wskaźników naukowych dwóch publikacji stanowiących rozprawę oraz *Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń*. Główna część rozprawy doktorskiej zawiera: *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiały i metody*, opis uzyskanych wyników, *Wnioski*, kopie dwóch publikacji oraz *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, jak również zestawienie cytowanego piśmiennictwa (ponad 74 pozycje). W rozprawie doktorskiej zamieszczono również oświadczenia współautorów o ich udziale w realizacji badań i przygotowaniu poszczególnych publikacji oraz wyrażające ich zgodę na wykorzystanie tych publikacji w postępowaniu o nadanie lek. med. Klaudii Berk stopnia doktora. W opracowaniu, Doktorantka zamieściła także kopię Uchwały (Nr 71/2018) Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie zezwalającej na przeprowadzenie badań na zwierzętach.

## **MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Problematyka podjęta w eksperymentalnej części rozprawy doktorskiej lek. med. Klaudii Berk dotyczy wpływu CBD na metabolizm sfingolipidów oraz szlaki transdukcji sygnału insulinowego w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową. Duże znaczenie podjętego przez Doktorantkę tematu badawczego wiąże się z faktem, że insulinooporność często towarzyszy otyłości, której występowanie w krajach wysokorozwiniętych i rozwijających się ciągle wykazuje wyraźną tendencję wzrostową. Insulinooporność, wynikająca z upośledzenia odpowiedzi biologicznej komórek na insulinę, m.in. zaburza gospodarkę węglowodanów, lipidów i białek prowadząc do różnego rodzaju dysfunkcji w organizmie. Z tego powodu, w wielu ośrodkach naukowych prowadzone są intensywne badania fizjologiczne i farmakologiczne zmierzające do opracowania skutecznych sposobów leczenia otyłości i chorób współtowarzyszących. Mieszczące się w tym nurcie, badania Doktorantki zmierzały do określenia zmian w przemianie sfingolipidów i szlakach transdukcji sygnału insulinowego pod wpływem CBD w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej z wykorzystaniem szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową jako modelu doświadczalnego do badania insulinooporności.

W rozważaniach dotyczących problemu otyłości i związanej z nią insulinooporności niezwykle ważne jest uwzględnienie procesów zachodzących w głównych depozytach tkanki

tłuszczowej. W rozwoju insulinooporności towarzyszącej otyłości obserwowane są m.in. zmiany w zawartości frakcji sfingolipidowych oraz funkcjonowaniu insulinowego szlaku przekąźnictwa sygnału w tkance tłuszczowej. W autorskim komentarzu zamieszczonym w ocenianej rozprawie, Doktorantka dosyć szczegółowo opisuje i ilustruje na rycinach metabolizm sfingolipidów oraz insulinowy szlak przekąźnictwa sygnału (IRS/PI3K/Akt) w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej. W opisie metabolizmu sfingolipidów opracowanym na podstawie piśmiennictwa, przypisuje centralne miejsce ceramidowi i wskazuje podstawowe biochemiczne szlaki jego przemian oraz wyszczególnia enzymy odpowiedzialne za ich przebieg. W tej części rozprawy, Doktorantka również rozpatruje możliwe oddziaływania lipidów (DAG, ceramidu i sfingozyno-1-fosforanu) na aktywność enzymatyczną białek zaangażowanych w insulinowy szlak przekąźnictwa sygnału oraz rolę różnych składowych systemu endokannabinoidowego (w szerszym ujęciu zwanego endokannabinoidomen) w modulowaniu gospodarki węglowodanowo-lipidowej w organizmie. W końcowej części *Wstępu*, Kandydatka przedstawiła właściwości **kannabidiolu** (CBD), który jest fitokannabinoidem uzyskiwanym z konopi siewnych, przytaczając stwierdzone wcześniej przez innych badaczy możliwości jego oddziaływania m.in. na gospodarkę węglowodanowo-lipidową, funkcjonowanie adipocytów oraz stężenie niektórych hormonów we krwi (np. insuliny i glukagonu). W podsumowaniu merytorycznego wprowadzenia do problematyki podjętej w części doświadczalnej rozprawy doktorskiej, a przed podaniem założonych celów badań, wskazane byłoby podanie hipotezy badawczej. Moim zdaniem, zamiast ogólnego stwierdzenia o „*potencjalnie korzystnym działaniu CBD*” lepiej byłoby przytoczyć hipotezę zamieszczoną w publikacji oryginalnej, stwierdzającą że „*CBD ingerując w szlak metabolizmu sfingolipidów, może modulować wrażliwość adipocytów na insulinę*”. Doktorantka podjęła się w swojej rozprawie realizacji trzech podstawowych celów, które obejmowały określenie wpływu CBD na:

- 1) akumulację wybranych frakcji sfingolipidów: sfingozyny (SFO), sfinganiny (SFA), ceramidu (CER) oraz sfingozyno-1-fosforanu (S1P), sfinganino-1-fosforanu (SFA1P) w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową;
- 2) ekspresję białek enzymatycznych, zaangażowanych w sfingolipidowy szlak syntezy *de novo* ceramidu (SPTLC1 i 2; palmitylotransferazy serynowej), białek enzymatycznych wspólnych dla szlaku ratunkowego i szlaku *de novo* syntezy ceramidu (CerS2, 4, 5, 6: syntazy ceramidu 2, 4, 5, 6) oraz białek enzymatycznych szlaku katabolitycznego ceramidu (ASAH1 i 2: ceramidazy 1 i 2 oraz SPHK1 i 2: kinazy sfingozyny 1 i 2) w obu depozytach badanej tkanki tłuszczowej;
- 3) ekspresję białek całkowitych i ich form fosforylowanych z insulinowego szlaku przekąźnictwa sygnału w obu depozytach tkanki tłuszczowej.

Badania przeprowadzono w oparciu o wcześniej sprawdzony i stosowany w Zakładzie Fizjologii UMB model doświadczalny, używając szczurów (samców szczepu Wistar) z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową. W badaniach uwzględniono cztery grupy zwierząt ( $n = 4 \times 10$ ): I – kontrolna, karmiona dietą standarową (16% kcal w formie tłuszczu), II – badana z insulinoopornością, karmiona dietą bogatotłuszczową (59% kcal w formie tłuszczu), III – kontrolna, otrzymująca CBD, IV – badana z insulinoopornością, karmiona dietą bogatotłuszczową i otrzymująca CBD. Zwierzętom w grupach II i IV podawano dootrzewnowo CBD przez ostatnie 14 dni eksperymentu trwającego 7 tygodni. Zastosowany układ doświadczalny pozwolił określić efekt działania CBD zarówno w warunkach standardowego żywienia, jak i w stanie insulinooporności, indukowanej dietą wysokotłuszczową. Wykonane analizy laboratoryjne w badanej tkance tłuszczowej obejmowały oznaczenia:

- poszczególnych sfingolipidów: sfingozyny, sfinganiny, ceramidu oraz sfingozyno-1-fosforanu i sfinganino-1-fosforanu;

- całkowitej ekspresji enzymów sfingolipidowego szlaku *de novo* syntezy ceramidu: palmitylotransferazy serynowej 1 i 2 (SPTLC1 i 2);
- całkowitej ekspresji enzymów katabolicznego szlaku sfingolipidowego: kinazy sfingozyny 1 i 2 (SPHT1 i 2) oraz kwaśnej i obojętnej ceramidazy (ASAH1 i 2);
- całkowitej ekspresji enzymów zaangażowanych w sfingolipidowy szlak *de novo* oraz szlak ratunkowy syntezy ceramidu: syntazy ceramidu 2, 4, 5 i 6 (CerS2, 4, 5, 6);
- całkowitej ekspresji białek enzymatycznych zaangażowanych w szlak sygnałowy insuliny: kinazy białkowej B (Akt) i kinazy syntazy glikogenu 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) oraz ich fosforylowanych form tj. odpowiednio pAkt(Ser473) i pGSK3 $\beta$ (Ser9).

Wykonanie powyższych analiz wymagało zastosowania metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (do oznaczanie sfingolipidów) oraz metody Western Blot (do określenia ekspresji badanych białek). Dodam, że w autorskim komentarzu załączonym do rozprawy, Doktorantka zamieszcza najważniejszą informację na temat modelu doświadczalnego oraz opisy stosowanych procedur laboratoryjnych i przeprowadzonej analizy statystycznej uzyskanych wyników. Projekt doświadczenia i przyjęte założenia związane z jego realizacją w ramach rozprawy doktorskiej były prawidłowe i stwarzały możliwość opublikowania uzyskanych wyników badań w wysoko notowanym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Analizując wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę, należy odnotować, że u szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową (bez stosowania CBD) w porównaniu z grupą kontrolną (otrzymującą karmę standardową) stwierdzono wzrost zawartości badanych fosfolipidów w trzewnej tkance tłuszczowej (wszystkich) oraz podskórnej tkance tłuszczowej (z wyjątkiem sfinganino-1-fosforanu). Pod wpływem diety bogatotłuszczowej także wystąpiły zmiany w ekspresji badanych enzymów. W podskórnej tkance tłuszczowej wykazano wzrost SPTLC 2, wszystkich badanych form syntaz ceramidu (tj. CerS2, CerS4, CerS5 i CerS6) oraz ASAH1 i ASAH2, natomiast zmniejszenie zawartości SPTLC1, jak również – obniżenie poziomu fosforylacji GSK3 $\beta$ . Z kolei, w trzewnej tkance tłuszczowej odnotowano wzrost zawartości SPTLC 2, CerS4 i CerS5 oraz SPHK1, natomiast obniżenie poziomu fosforylacji Akt i GSK3 $\beta$ .

Na szczególną uwagę zasługują zmiany wywołane przez CBD w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową oraz szczurów z insulinopornością wywołaną stosowaniem diety bogatotłuszczowej. W badaniach wykazano następujące zmiany w poszczególnych depozytach tkanki tłuszczowej:

**a) w zakresie działania CBD na podskórną tkankę tłuszczową:**

- ✓ wzrost stężenia SFO w warunkach diety standardowej oraz obniżenie stężenia SFO, SFA i CER w przypadku diety HFD;
- ✓ obniżenie ekspresji SPTCL1 w warunkach diety standardowej oraz SPTCL2 w przypadku diety HFD;
- ✓ wzrost ekspresji CerS4 i CerS6 w warunkach diety standardowej a obniżenie tylko CerS6 w przypadku diety HFD;
- ✓ obniżenie ekspresji ASAH1 w przypadku diety HFD;
- ✓ wzrost współczynnika fosforylacji GSK3 $\beta$  [pGSK3 $\beta$ (Ser9)/GSK3 $\beta$ ] w warunkach diety standardowej;

**b) w zakresie działania CBD na trzewną tkankę tłuszczową:**

- ✓ obniżenie stężenia SFO i SFA w warunkach diety standardowej oraz w przypadku diety HFD – wzrost stężenia SFO a obniżenie stężenia SFA, S1P, SFA1P i CER;
- ✓ obniżenie ekspresji SPTCL1 i SPTCL2 w przypadku diety HFD;

- ✓ obniżenie ekspresji CerS2 i CerS5 a wzrost CerS6 w przypadku diety HFD;
- ✓ wzrost ekspresji SPHK1 w warunkach diety standardowej a obniżenie w przypadku diety HFD;
- ✓ wzrost współczynnika fosforylacji Akt [pAkt(Ser473)/Akt] oraz GSK3β [pGSK3β(Ser9)/GSK3β] w przypadku diety HFD.

W eksperymencie opisanym w rozprawie doktorskiej lek. med. Klaudyny Berk, CBD w zróżnicowanym stopniu oddziaływał na wszystkie badane parametry związane z funkcjonowaniem tkanki tłuszczowej. Potwierdza to słuszność ich rozpatrywania w badaniach przeprowadzonych przez Doktorantkę. Na podkreślenie zasługuje wykazanie redukcji przez CBD zwiększonego stężenia ceramidu w obu typach tkanki tłuszczowej, które spowodowała dieta bogatotłuszczowa. Wydaje się, że takie działanie CBD w największym stopniu było realizowane poprzez hamowanie ekspresji enzymów szlaku *de novo* syntezy ceramidu. W trzewnej tkance tłuszczowej miało miejsce hamowanie ekspresji SPTLC1 i 2 oraz CerS2 i CerS6, zaś w podskórnej tkance tłuszczowej – tylko SPTLC 2 i CerS6. W trzewnej tkance tłuszczowej odnotowano także większą redukcję stężenia sfiniganiny w porównaniu z tkanką podskórną. Przemawia to za większym hamowaniem szlaku *de novo* syntezy ceramidu przez CBD w trzewnej tkance tłuszczowej niż w tkance podskórnej. W stanie insulinooporności, czyli u szczurów karmionych dietą bogatotłuszczową, CBD może także wpływać na stężenie sfingozyny w tkance tłuszczowej, która powstaje z ceramidu w ramach realizacji katabolicznego szlaku sfingolipidów. Wiadomo, że ten sfingolipid jest również wykorzystywany jako substrat do syntezy ceramidu w ramach tzw. szlaku ratunkowego. W badaniach Doktorantki wpływ CBD na stężenie sfingozyny w tkance tłuszczowej był zróżnicowany w zależności od jej rodzaju. W przypadku podskórnej tkanki tłuszczowej stwierdzono obniżenie stężenia sfingozyny po podaniu CBD, jak również zmniejszenie ekspresji podstawowych enzymów reprezentujących powyższe szlaki, tj. ceramidazy (ASAH1) oraz syntazy ceramidu (CerS6). Wskazuje to na hamowanie szlaku katabolicznego, jak również – szlaku ratunkowego przez CBD w tej tkance. Z kolei, w trzewnej tkance tłuszczowej wykazano wzrost stężenia sfingozyny i ekspresji CerS6 po wpływie CBD, ale nie odnotowano istotnych zmian w ekspresji ASAH1. Wydaje się zatem, że sposób oddziaływania CBD na szlak kataboliczny i ratunkowy przemian ceramidu w tej tkance jest bardziej złożony i jego wyjaśnienie wymaga dalszych badań.

Doktorantka także udokumentowała wpływ CBD na poziom fosforylacji enzymów związanych z funkcjonowaniem insulinowego szlaku transdukcji sygnału, tj. kinazy białkowej B (Akt) w pozycji seryny 473 oraz kinazy syntazy glikogenu 3β (GSK3β) w pozycji seryny 9. W trzewnej tkance tłuszczowej, pod wpływem CBD stwierdzono wzrost poziomu fosforylacji obydwu badanych enzymów (Akt i GSK3β) w warunkach diety bogatotłuszczowej. Oddziaływanie CBD na fosforylację badanych enzymów w podskórnej tkance tłuszczowej było znacznie mniejsze i ograniczało się jedynie do wzrostu fosforylacji GSK3β w warunkach stosowania diety kontrolnej.

Na podstawie uzyskanych wyników badań, Doktorantka sformułowała cztery końcowe wnioski. Trzy spośród nich (2-4) wyrażają bardzo ważne – z merytorycznego punktu widzenia – uogólnienia. Mianowicie, w nich m.in. zawarte są stwierdzenia, że:

- 1) zaobserwowane pod wpływem CBD zmiany w szlakach enzymatycznych sfingolipidów, finalnie prowadzą do obniżenia zawartości ceramidu w obu typach tkanki tłuszczowej;
- 2) CBD, w szczurzym modelu insulinooporności, powoduje uwrażliwienie adipocytów na insulinę w trzewnej tkance tłuszczowej poprzez zwiększenie współczynnika ekspresji pAkt(Ser473)/Akt oraz GSK3β pGSK3β(Ser9)/GSK3β co koreluje ze zmniejszeniem zawartości w niej wewnątrzkomórkowych frakcji sfingolipidowych (z wyjątkiem sfingozyny);

- 3) zmniejszenie stopnia insulinooporności adipocytów wynikające z podawania CBD jest bardziej wyrażone w trzewnej tkance tłuszczowej niż w podskórnej tkance tłuszczowej i stanowi asumpt do dalszych badań nad korzyściami terapeutycznymi CBD w leczeniu insulinooporności.

Badania przedstawione w pracy oryginalnej, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. med. Klaudii Berk oceniam bardzo pozytywnie pod względem ich konstrukcji oraz wartości uzyskanych wyników. Moim zdaniem, o wysokiej wartości poznawczej tych wyników decyduje badanie potencjalnych efektów oddziaływania kannabidiolu na zawartość sfingolipidów w tkance tłuszczowej, zarówno podskórnej jak i trzewnej, w połączeniu z analizą ekspresji podstawowych enzymów uczestniczących w ich metabolizmie oraz wybranych enzymów związanych z funkcjonowaniem insulinowego szlaku transdukcji sygnału.

Rozprawa doktorska lek. med. Klaudii Berk, oprócz pracy oryginalnej, zawiera jedną pracę przeglądową, opublikowaną w 2021 w *J. Clin. Med.* Praca ta została opracowana na podstawie licznego piśmiennictwa (obejmującego 137 pozycji) i generalnie dotyczy roli endogennego sytemu kannabinoidowego w patogenezie niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD; *non-alcoholic fatty liver disease*) oraz potencjalnej przydatności w jej leczeniu naturalnych kannabinoidów. W opracowaniu tym dokładnie opisano składowe systemy endokannabinoidowego, zwracając szczególną uwagę na ich zmiany (głównie w zakresie ekspresji receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2), obserwowane w wątrobie w związku z rozwojem niealkoholowego stłuszczenia tego narządu. W pracy opisano także właściwości naturalnych kannabinoidów pozyskiwanych z konopi siewnych, takich jak: kannabidiol,  $\Delta$ 9-tetrahydrokannabinol (THC), tetrahydrokannabinawin (THCV) oraz ich przydatność w terapii NAFLD i chorób współistniejących. Sądzę, że wartość naukową tej publikacji potwierdza 10-krotnie cytowanie jej w stosunkowo krótkim okresie czasu w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

## UWAGI i PYTANIA

Ponizej przedstawiam uwagi/pytania dotyczące ocenianej rozprawy doktorskiej.

1. Czy rozpatrywała Pani możliwość uwzględnienia w swojej pracy analizy ekspresji genów (na poziomie RNA), kodujących badane enzymy? Jeśli tak, to z jakich powodów nie zdecydowała się Pani na przeprowadzenie takiej analizy?
2. Liczba badanych szczurów w poszczególnych grupach wynosiła 10 (całkowita liczba  $4 \times 10$ ), a wartość „n” w przypadku wykonanych analiz rozpatrywanych enzymów wynosiła 6. Jaka była zasada wyboru 6 spośród 10 prób badanej tkanki do przeprowadzenia tych analiz?
3. Czy zdaniem Pani, oznaczenie którejs z sfingomielinaz (N-SMase i/lub Alk-SMase) w Pani badaniach mogłoby dostarczyć interesujących informacji na temat sfingomieliny jako potencjalnego źródła ceramidu w tkance tłuszczowej?
4. Na str. 22, w tytule podrozdziału 3.4 niezręcznie użyto sformułowania „*Rola kannabidiolu w regulacji metabolizmu...*”, ponieważ kannabidiol nie jest związkiem endogennym w przypadku szczura, a jest fitokannabinoidem.
5. Moim zdaniem, załączona praca przeglądowa jest bardzo wartościowym opracowaniem, jednak nieco odbiega od głównego tematu rozprawy doktorskiej. Jeśli weźmie się pod uwagę fakt, że NAFLD wiąże się z dysfunkcją układu endokannabinoidowego oraz to, że otyłość i insulinooporność są wymieniane wśród głównych czynników zwiększonego ryzyka wystąpienia tej choroby, wówczas można łatwo wykazać tematyczny związek pomiędzy dwiema pracami włączonymi do rozprawy doktorskiej. Ta wątpliwość w ogóle nie pojawiłby się, gdyby zmodyfikowano główny temat rozprawy doktorskiej lub w załączonym autorskim komentarzu, Doktorantka uwzględniłaby krótkie wyjaśnienie dlaczego ta praca została włączona do rozprawy. Jaka jest Pani opinia na ten temat?

## PODSUMOWANIE

Rozprawa doktorska **lek. med. Klaudii Berk** składa się z dwóch publikacji; jedna z nich jest pracą prezentującą oryginalne wyniki przeprowadzonych badań, a druga pracą przeglądową. Zostały one opublikowane w czasopismach anglojęzycznych o wysokim współczynniku oddziaływania IF, wynoszącym odpowiednio 6,208 i 4,964 oraz wysokiej punktacji MEiN, w obu przypadkach wynoszącej 140. Badania opisane w pracy oryginalnej udokumentowały szereg zmian pod wpływem kannabidiolu w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową. Zmiany te dotyczyły: zawartości sfingolipidów i ekspresji białek enzymów zaangażowanych w ich syntezę i metabolizm oraz poziomu fosforylacji wybranych białek uczestniczących w wewnątrzkomórkowym szlaku transdukcji sygnału insulinowego. Na szczególne podkreślenie zasługuje wykazanie przez Doktorantkę, że kannabidiol powoduje obniżenie zawartości ceramidu w obu typach tkanki tłuszczowej, ale z większym nasileniem oddziałuje na trzewną tkankę tłuszczową, w której zmniejsza stężenie większości badanych frakcji sfingolipidowych, a zwiększa poziomy fosforylacji Akt oraz GSK3 $\beta$ . Obserwacje te uzasadniają potrzebę kontynuacji badań nad wykorzystaniem kannabidiolu do rozwiązywania problemów zdrowotnych związanych z insulinoopornością. Praca przeglądowa jest bardzo wartościowym opracowaniem poświęconym analizie dysfunkcji sytemu endokannabinoidowego, towarzyszących rozwojowi niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby, jak również – potencjalnej przydatności w jej leczeniu naturalnych kannabinoidów pozyskiwanych z konopi. O dużej aktywności naukowo-badawczej i pracowitości Doktorantki dodatkowo świadczy fakt, że jest Ona współautorem 13 publikacji (oprócz prac włączonych do rozprawy doktorskiej) i pierwszym autorem 4 spośród nich. Przedstawione przeze mnie uwagi nie obniżają wysokiej wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej lek. med. Klaudii Berk.

## WNIOSEK KOŃCOWY

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zatytułowana ***”Ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na zawartość i metabolizm sfingolipidów w podskórnej i trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów z insulinoopornością indukowaną dietą bogatotłuszczową”*** 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 **lek. med. Klaudii Berk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn 12.09.2023 r.

*S. Okrasa*  
Stanisław Okrasa