



Warszawa, 23 sierpnia 2024 r.



RPW/7012/2024  
Data: 2024-09-06  
UMB

## **OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**mgr Anny Krzyżewskiej**

### **p.t. „Ocena wpływu kannabidiolu na parametry zapalne i włóknienia w tkance płucnej i prawej komorze serca w szczurzym modelu nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną”**

wykonanej w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

pod promotorską opieką

**prof. dr hab. n. farm. Hanny Kozłowskiej** (*promotor*)  
**i dr hab. n. farm. Marty Baranowskiej-Kuczko** (*promotor pomocniczy*)

Tętnicze nadciśnienie płucne (PAH) jest nieuleczalną chorobą o złym rokowaniu, charakteryzującą się patologiczną przebudową dystalnych tętniczek płucnych. Przebudowa ta objawia się nadmierną proliferacją komórek mięśni gładkich, przerostem i hiperplazją przyśrodkową ściany naczynia, zwłóknieniem błony wewnętrznej i przydanki, zmianami zakrzepowymi i splotowymi, a także infiltrację okołonaczyniową komórek zapalnych. Dochodzi do rozwoju dysfunkcji śródbłonna i wzrostu wydzielania czynników naczyniokurczących w połączeniu z osłabieniem wytwarzania tych o działaniu rozkurczającym naczynia. W konsekwencji światło tętniczek płucnych ulega zwężeniu, co prowadzi do wzrostu naczyniowego oporu płucnego (PVR) i tym samym do wzrostu obciążenia następczego prawej komory (RV). Wzrost naprężenia w ścianie komory jest głównym bodźcem uruchamiającym przebudowę RV, której celem jest sprostanie zwiększonemu obciążeniu. W początkowej fazie przebudowy (przerost adaptacyjny) dochodzi do przerostu poprzecznego kardiomiocytów, co zwiększa siłę skurczu i pozwala na zachowanie objętości wyrzutowej RV pomimo wzrostu obciążenia. Wraz z postępem choroby i dalszym wzrostem PVR prawa komora przechodzi ze stanu adaptacyjnego przerostu, do stanu niewydolności, który przebiega z rozstrzenią, włóknieniem i istotnym spadkiem jej funkcji. Leczenie PAH jest obecnie ukierunkowane na interwencje rozszerzające tętniczki płucne poprzez zwiększenie dostępności kinazy białkowej G (aktywatory rozpuszczalnej formy cykloazy guanylowej i inhibitory fosfodiesterazy typu 5), hamowanie naczyniokurczącego działania endoteliny-1 oraz wzmocnienie szlaku prostacykliny (analogi prostacykliny lub agoniści receptora prostacykliny). Efektem tych działań jest rozkurcz tętniczek, spadek PVR i odciążenie RV. Jednak pomimo stosowania

dostępnych terapii choroba najczęściej nadal postępuje. W tej sytuacji zdolność RV do kompensacji wzrostu obciążenia jest głównym czynnikiem prognostycznym przeżycia pacjentów z PAH, a niewydolność RV jest główną przyczyną zgonu w tej grupie chorych. Stąd, intensywnie poszukuje się dodatkowych terapii nie tylko skutecznie hamujących przebudowę naczyń płucnych i w ten sposób zapobiegających przebudowie RV, ale także takich, które mają bezpośredni wpływ na RV i pozwalają utrzymać jak najdłużej jej funkcję. Dotychczas czynniki odpowiedzialne za przejścia od przerostu adaptacyjnego RV do jej niewydolności nie zostały jednoznacznie rozpoznane. Wymieniane są: nasilenie włóknienia, spadek gęstości kapilar, przekierowanie metabolizmu z utleniania kwasów tłuszczowych na glikolizę, wzrost produkcji ROS i spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Również nie zostało wyjaśnione dlaczego u niektórych pacjentów RV długo pozostaje w fazie przerostu adaptacyjnego, a u niektórych stosunkowo szybko dochodzi do jej rozstrzeni i niewydolności. Niezbędne są dalsze badania dające wgląd w mechanizm przebudowy zarówno naczyń płucnych, jak i RV, które mogą pomóc w opracowaniu terapii zwiększających skuteczność leczenia PAH. Szczególnie pożądane są interwencje działające dwukierunkowo na naczynia płucne i RV.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Anny Krzyżewskiej wpisuje się doskonale w ten obszar badawczy. Opierając się na wynikach badań wskazujących na naczyniorozszerzające działanie kannabinoidów oraz potwierdzających obecności receptorów kannabinoidowych w krążeniu płucnym, a także na doniesieniach o ich potencjale antywłóknieniowym i przeciwzapalnym, Doktorantka postanowiła sprawdzić czy kannabinoidy mają potencjał terapeutyczny w leczeniu PAH. Stąd jako cel nadrzędny swojej pracy doktorskiej obrała ocenę wpływu przewlekłego podawania kannabidiolu (CBD), fitokannabinoidu pochodzącego z *Cannabis sativa*, pozbawionego działania psychoaktywnego, na wybrane elementy patomechanizmu PAH w naczyniach płucnych i RV. Podczas realizacji tego zadania zaplanowała dwa cele szczegółowe. Były nimi: (1) ocena wpływu przewlekłego podawania CBD na parametry stresu oksydacyjnego, mediatory stanu zapalnego i poziom klasycznych receptorów kannabinoidowych CB<sub>1</sub> i CB<sub>2</sub> w płucach szczurów z nadciśnieniem płucnym indukowanym monokrotaliną (MCT) oraz (2) ocena potencjału przeciwwłóknieniowego CBD oraz zaangażowania w ten efekt szlaku sygnałowego TGF-β1/SMAD2 w RV serca szczurów z nadciśnieniem płucnym indukowanym MCT. Celem dodatkowym był przegląd literatury dotyczącej wpływu kannabinoidów, w tym CBD, na krążenie płucne oraz ich ewentualnej przydatności w terapii nadciśnienia płucnego. **Cel rozprawy uważam za uzasadniony naukowo o ważnym znaczeniu poznawczym a także o potencjalnym znaczeniu klinicznym związanym z możliwością zastosowania CBD jako dodatkowej terapii wspomagającej leczenie nadciśnienia płucnego. Dodatkowo, realizacja tak zaplanowanych**

**badania może dostarczyć odpowiedzi na pytanie, czy CBD może być kandydatem na terapię ukierunkowaną zarówno na naczynia płucne, jak i na RV.**

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Krzyżewskiej ma postać cyklu publikacji, na który składają się dwie prace oryginalne i 1 praca przeglądowa. Prace zostały opublikowane w latach 2021-2023 w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (*International Journal of Molecular Science, Molecules* oraz *Bochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*). Współczynnik oddziaływania prac *Impact Factor* wynosi odpowiednio dla prac oryginalnych **4.600** (140 pkt. MNiSW), **6.200** (140 pkt. MNiSW) oraz **6.208** dla pracy poglądowej (140 pkt. MNiSW). Łączny *Impact Factor* cyklu prac jest imponujący i wynosi **17.008 (420 pkt. MNiSW)**. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszą autorką i swój udział w powstaniu tych prac ocenia na 60%. Współautorzy wyrazili zgodę na włączenie wyżej wymienionych prac do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską Pani mgr Anny Krzyżewskiej. Cykl publikacji został uzupełniony 40 stronicowym opracowaniem zawierającym wprowadzenie do tematyki pracy, cel rozprawy, skrócony opis metod, podsumowanie wyników wraz z dyskusją, wnioski, bibliografię oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Do opracowania dołączono również zgodę Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie na wykorzystanie w doświadczeniach 140 samców szczura rasy *Wistar* oraz spis dotychczasowych osiągnięć Doktorantki imponujący jak na ten etap kariery naukowej (8 pełnotekstowych publikacji o łącznym współczynniku oddziaływania IF=46.032, 2 monografie oraz udział w realizacji licznych projektów grantowych, w 4 z nich w funkcji kierownika, a w 16 jako wykonawca).

Przedstawiony mi do oceny materiał jest przygotowany bardzo starannie. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, przeszły zatem wymagający proces recenzji i spełniły wymagania stawiane w renomowanych czasopiśmie naukowych, zarówno co do poziomu merytorycznego, jak i językowego oraz edytorskiego. Omówienie prac jest napisane jasno, dobrym językiem i świadczy o bardzo dobrym rozeznaniu Doktorantki zarówno w aspektach klinicznych PAH, jak i w patomechanizmach leżących u podstawy jego rozwoju.

Badania zrealizowane w ramach pracy doktorskiej Pani mgr Anny Krzyżewskiej zostały wykonane w szczurzym modelu nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną (MCT). MCT powoduje trwałe i selektywne uszkodzenie śródbłonna naczyń płucnych. Co istotne, model ten dość dobrze odzwierciedla przebudowę tętniczek płucnych zachodzącą u pacjentów z PAH, oraz co bardzo ważne, dochodzi w nim do rozwoju niewydolności i zwłóknienia RV, podobnie jak u pacjentów z PAH. Nie obserwuje się w nim natomiast zmian spłotowych w naczyniach, które są typowe dla PAH u ludzi. Doktorantka świadomie omawia zalety, ale także ograniczenia użytego modelu. Należy podkreślić, że model ten pomimo ograniczeń jest obok modelu przewlekłej hipoksji połączonej z podaniem Sugenu 5416, powszechnie akceptowanym modelem PAH. Eksperymenty

wykonane w ramach pracy doktorskiej są kontynuacją badań wykonanych w tym samym Zespole i opublikowanych w pracy Sadowska i wsp. (2020). Doktorantka jest współautorką tej publikacji więc brała w nich czynny udział. W wymienionej powyżej publikacji u szczurów rasy *Wistar* płci męskiej wyindukowano nadciśnienie płucne jednorazowym podaniem monokrotaliny (60 mg/kg masy ciała) i następnie podawano dootrzewnowo przez 21 dni CBD lub jego rozpuszczalnik. Do grup kontrolnych włączono szczury bez nadciśnienia, którym podawano CBD lub odpowiednio rozpuszczalniki CBD i MCT w sposób analogiczny jak w grupach badanych. W 21 dniu od indukcji nadciśnienia płucnego pobrano i zabezpieczono tkankę płuc i RV od 6-7 zwierząt w każdej grupie. Tkanki te stały się materiałem do badań stanowiących pracę doktorską. Doktorantka użyła całego wachlarzu metod badawczych (m.in. Western blot, testy immunoenzymatyczne, chromatografia masowa sprzężona ze spektrometrią mas, a także metody histologiczne i immunohistochemiczne) do oceny odpowiednio parametrów stresu oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej oraz mediatorów stanu zapalnego, a także do oceny włóknienia, przerostu kardiomiocytów i elementów szlaków sygnałowych zaangażowanych w te procesy. Doktorantka w analizie i dyskusji własnych wyników wykorzystuje wyniki uzyskane w pracy Sadowska i wsp. (2020), w której CBD podawany przewlekłe od momentu indukcji nadciśnienia, skutecznie zmniejszał wzrost ciśnienia skurczowego w RV (RVSP), co pozwala wnioskować, że w znacznym stopniu zapobiegał wzrostowi oporu płucnego poprzez rozszerzenie tętniczek płucnych. Użyta w pracy metodologia nie budzi moich wątpliwości. Grupy kontrolne dobrano właściwie, liczba zwierząt (n=6-7), od których pobrano tkanki jest wystarczająca i powszechnie akceptowana w badaniach biochemicznych i histologicznych. Jedyne moje drobne zastrzeżenie dotyczy prezentacji wyników w publikacjach Doktorantki. Na rycinach wyniki przedstawiono jako wartości średnie±SEM bez uwidocznienia poszczególnych punktów pomiarowych, co nie daje pełnego wglądu w rozkład danych.

Liczne wyniki uzyskane przez Doktorantkę zostały zawarte w dwóch publikacjach oryginalnych, z których jedna zawiera badania wykonane w tkankach płuc, a druga w tkankach RV. Doktorantce udało się wykazać, że u szczurów z nadciśnieniem płucnym potencjał antyoksydacyjny w tkance płucnej (poziom TAC i GSH) spada, rośnie ilość mediatorów zapalnych (TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, MCP-1 i CD680) oraz dochodzi do wzrostu ekspresji klasycznych receptorów kannabinoidowych CB<sub>1</sub> i CB<sub>2</sub> (jest to obserwacja po raz pierwszy opisana w literaturze). Podawanie CBD w terapii ciągłej zapobiegało spadkowi poziomów TAC i GSH oraz wzrostowi ekspresji receptorów CB<sub>1</sub>, których aktywacja ma działanie prozapalne i prooksydacyjne. Nie miało natomiast wpływu na ekspresję receptorów CB<sub>2</sub>, których aktywacja wywiera przeciwstawne działanie. Dodatkowo w grupie zwierząt otrzymujących po indukcji nadciśnienia CBD, poziom mediatorów zapalnych był znacznie niższy niż w grupie otrzymującej placebo. Na podstawie tych wyników Doktorantka zaproponowała mechanizm korzystnego działania CBD w naczyniach płucnych, polegający na



zmniejszeniu stresu oksydacyjnego i zahamowaniu czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. W konsekwencji dochodzi do spadku mediatorów zapalenia: MCP-1, CD68, TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , zmniejszenia infiltracji monocytów i makrofagów do naczyń płucnych, zahamowania rozwoju stanu zapalnego naczyń i ich patologicznej przebudowy, co skutkuje mniejszym wzrostem oporu płucnego i ciśnienia skurczowego w RV.

W drugiej pracy oryginalnej, badając tkankę RV, Doktorantka zaobserwowała, że nadciśnienie płucne indukuje włóknienie śródmiąższowe i okołonaczyniowe, przerost poprzeczny kardiomiocytów, wzrost ilości fibronektyny, aktywację fibroblastów, aktywację szlaku prołóknieniowego TGF- $\beta$ 1/SMAD2 oraz wzrost poziomu białka Gal-3, uznawanego za nowy marker włóknienia. Zaobserwowała też obniżony poziom markera śródbłonna, VE-kadheryny, co w połączeniu z aktywacją szlaku TGF- $\beta$ 1/SMAD2 może sugerować aktywację w RV procesu przejścia endotelialno-mezenchymalnego (EndoMT). Przewlekłe podawanie CBD, częściowo zapobiegło przerostowi poprzecznemu kardiomiocytów, praktycznie całkowicie zapobiegło włóknieniu okołonaczyniowemu i śródmiąższowemu i istotnie obniżyło aktywację szlaku TGF- $\beta$ 1/SMAD i proces EndoMT. Co bardzo istotne, podawanie CBD zapobiegło wzrostowi poziomu markera niewydolności komór serca, NT-proBNP w surowicy co sugeruje, że funkcja RV była istotnie lepsza w grupie zwierząt otrzymujących CBD. Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników sformułowała 3 wnioski odpowiadające celom rozprawy.

W trakcie lektury tych ciekawych prac nasunęło mi się kilka pytań i komentarzy:

- *Jednym z nielicznych deficytów zaprezentowanych prac jest brak oceny funkcji RV, mierzonej za pomocą procentowej zmiany pola powierzchni prawej komory (FAC) lub amplitudy skurczowego ruchu pierścienia trójdzielnego (TAPSE), co utrudnia wnioskowanie, o stopniu dysfunkcji RV w tym badaniu i o wpływie CBD na jej funkcję. Ważnej informacji dostarcza w kontekście braku tych pomiarów pomiar stężenia NT-proBNP i cewnikowanie RV. Czy podczas cewnikowania RV przeanalizowano również zmianę ciśnienia rozkurczowego w RV, czy obserwowano wzrost tego ciśnienia w grupie z nieleczonym nadciśnieniem płucnym i czy CBD redukowało ewentualny wzrost tego ciśnienia? Jest to o tyle ważne, że to właśnie naprężenie rozkurczowe w ścianie komory jest bodźcem do indukcji rozstrzeni komory, skutkującej ostatecznie rozwojem niewydolności RV? Jaka może być przyczyna braku wpływu CBD na przerost RV mierzony indeksem Fultona, w pracy Sadowska i wsp. (2020) przy jednoczesnej redukcji przez CBD włóknienia i przerostu poprzecznego kardiomiocytów? Czy zdaniem Doktorantki może to świadczyć o rozstrzeni RV?*
- *Ostatnio przedmiotem uwagi w kontekście patofizjologii nadciśnienia płucnego są kanały przejściowego potencjału podtypu kanonicznego (TRPC). Wykazano, że w nadciśnieniu płucnym u ludzi i zwierząt dochodzi do istotnego wzrostu tych kanałów nie tylko w mięśniówce gładkiej naczyń płucnych, ale również w RV. Kanały te są zaangażowane w regulację skurczu naczynia, a w RV pełnią rolę mechanoreceptorów uruchamiających patologiczną przebudowę w odpowiedzi na wzrost naprężenia w ścianie komory. Modulacja tych kanałów mogłaby mieć potencjalne znaczenie w terapii PAH ukierunkowanej zarówno na naczynia płucne, jak i na RV? Czy Doktorantka ma informacje czy kanały TRPC mogą być punktem uchwytu dla kannabinoidów, tak jak podtyp waniloidowy kanałów z tej rodziny?*


- Doktorantka wykazała spektakularny wpływ CBD na proces włóknienia w RV. U szczurów u których indukowano nadciśnienie płucne i tuż po indukcji rozpoczęto podawanie CBD przebudowa RV, szczególnie jeśli chodzi o włóknienie praktycznie nie zachodzi, a stopień zwłóknienia jest podobny jak w grupie kontrolnej. Czy zdaniem Doktorantki ten efekt wynika wyłącznie z tego, że prawa komora w grupie leczonej jest poddana znacznie mniejszemu obciążeniu następczemu niż w grupie nieleczonej, czy też CBD wywiera dodatkowo bezpośrednie działanie antywłóknienowe w RV. W jaki sposób, zdaniem Doktorantki, można by sprawdzić to eksperymentalnie?
- Autorka opierając się na wynikach swoich własnych prac i prac Zespołu, dostarcza mocnych przesłanek, że CBD mógłby stanowić terapię uzupełniającą w leczeniu PAH. W tym kontekście niezwykle interesujące byłoby sprawdzenie czy CBD wywiera dodatkowe korzyści gdy jest stosowany łącznie z innym lekiem/lekami zatwierdzonymi do leczenia PAH. Czy może znane jest Doktorantce z literatury takie podejście, czy nie zostało to jeszcze zbadane w modelach zwierzęcych PAH. Ciekawym byłoby również sprawdzenie, czy stosowanie CBD przynosi korzyści gdy rozpoczęcie terapii ma miejsce już w rozwiniętym nadciśnieniu płucnym?

Doktorantka do cyklu publikacji dołączyła również pracę pogładową, w której omawia szczegółowo obecność elementów układu kannabinoidowego w krążeniu płucnym u ludzi i zwierząt oraz potencjalne mechanizmy, za pomocą których kannabinoidy wywierają działanie rozszerzające tętnice płucne. Ponadto Doktorantka dokonała przeglądu dotychczasowych doniesień o wpływie kannabinoidów na przebieg PAH w modelach zwierzęcych *in vivo* i ich działaniu na niedotlenione ludzkie komórki mięśni gładkich tętnic płucnych *in vitro*. Jak wynika z przeglądu, liczba badań na ten temat jest jeszcze bardzo skromna, z czego ważnych wyników dostarczają badania Zespołu, w którym Doktorantka pracuje. Opracowanie to w mojej ocenie jest bardzo cennym kompendium wiedzy dotyczącej działania kannabinoidów w krążeniu płucnym, a także zachętą do poszerzenia wiedzy w nadal niezgłębionym obszarze potencjału terapeutycznego kannabinoidów, w tym CBD, w nadciśnieniu płucnym.

**Reasumując, rozprawę doktorską mgr Anny Krzyżewskiej oceniam bardzo wysoko.** Wyniki, które Doktorantka przedstawiła wskazują na ciekawe aspekty działania CBD, który może stanowić bardzo atrakcyjną terapię uzupełniającą do obecnie istniejącej w leczeniu PAH. Szczególnie ważne jest wykazanie hamującego wpływu CBD na włóknienie RV. Zapobieganie włóknieniu RV w leczeniu PAH może poprawić rokowanie pacjentów nie tylko poprzez wpływ na funkcję komory, ale także na redukcję ryzyka arytmicznego, o którym wiadomo, że silnie koreluje ze stopniem zwłóknienia tkanki mięśnia sercowego. Wyniki pracy mogą mieć potencjalne zastosowanie kliniczne i przyczynić się do skuteczniejszego leczenia chorych z nadciśnieniem tętniczym. Ważne jest to, że wyniki zostały już opublikowane w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania i dzięki ich dostępności stanowią ważny głos w dyskusji dotyczącej badanego zagadnienia.

Ostatecznie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Anny Krzyżewskiej spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora wymienione w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2023, poz. 742). W związku z tym, z pełnym przekonaniem, **zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Anny Krzyżewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość rozprawy, fakt opublikowania wyników w czasopiśmie naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania oraz uzyskanie wyników o potencjalnym znaczeniu klinicznym **wnoszę wniosek o wyróżnienie rozprawy.**

Dyrektor Szkoły Kształcenia Doktorantów - Dziekan  
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego

  
prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Urszula Mackiewicz