

dr hab. n. farm. Magdalena Jasińska-Stroschein

Zakład i Katedra Biofarmacji

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr farm. Patryka Remiszewskiego

"Evaluation of the potential therapeutic significance of chronically administered cannabinoids in experimental models of arterial and pulmonary hypertension in rats"

Przedstawiona do recenzji praca została wykonana pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Barbary Malinowskiej, kierownika Zakładu Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Dokonując oceny formalnej rozprawy należy stwierdzić, że dysertacja licząca 136 stron i 15 rozdziałów stanowi cykl trzech wieloautorskich publikacji (dwóch oryginalnych i jednej przeglądowej). We wszystkich pracach Doktorant jest autorem wiodącym (pierwszym autorem). Wszystkie rozdziały dysertacji stanowią spójną całość. Wykaz publikacji (Rozdział 1) poprzedza wykaz skrótów (Rozdział 2); Wstęp (Rozdział 3); Cel pracy (Rozdział 4); Materiały, metody oraz omówienie wyników i dyskusja (Rozdział 5); Podsumowanie (Rozdział 6); Piśmiennictwo (Rozdział 7) – odpowiednio dobrane, liczące 41 pozycji literaturowych, w przeważającej części pochodzących z ostatnich pięciu lat; streszczenia w języku angielskim i polskim (Rozdział 8).

Artykuły naukowe (Rozdziały 9 – 11) dotyczące podjętego zagadnienia opublikowano w latach 2020-2022 w liczących się czasopismach z dyscypliny. Sumaryczny współczynnik oddziaływania złożonych prac wynosi 17,127, a suma punktów MNiSW 340 pkt. Jak wynika z oświadczeń współautorów (Rozdziały 13 – 14), udział Doktoranta w powstawaniu prac jest wiodący. Pan mgr Remiszewski każdorazowo uczestniczył we współpracowaniu koncepcji i planu pracy, był wykonawcą lub współwykonawcą opisanych eksperymentów, a ponadto przeprowadził analizę statystyczną uzyskanych danych, zinterpretował otrzymane wyniki oraz przygotował manuskrypty do druku i odpowiedzi na recenzje. Wkład ten procentowo oceniano na 50 – 75%. Na część eksperymentalną dysertacji, obejmującą prace z udziałem zwierząt doświadczalnych, otrzymano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Olsztynie (Rozdział 12).

Należy także podkreślić, że badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej były finansowane między innymi ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu OPUS 2015/19/B/NZ7/02270 oraz Funduszy Europejskich Wiedza Edukacja i Rozwój (POWR.03.02.00-00-I051/16 i 10/IMSD/G/2019).

Zainteresowania badawcze Doktoranta dotyczą poszukiwań nowych strategii terapeutycznych w nadciśnieniu tętniczym (NT) oraz w tętniczym nadciśnieniu płucnym (TNP). Nadciśnienie tętnicze jako choroba cywilizacyjna pozostaje najważniejszym modyfikowalnym czynnikiem ryzyka chorób układu krążenia. U większości pacjentów uzyskuje się dobrą kontrolę ciśnienia tętniczego, nie udało się jednak całkowicie wyeliminować problemu NT opornego. Na przestrzeni ostatnich 25 lat dokonał się znaczący postęp w diagnostyce oraz w leczeniu farmakologicznym choroby rzadkiej jaką jest TNP. Wdrożenie farmakoterapii celowanej, opartej głównie na algorytmach łączenia dwóch (trzech) leków o różnym mechanizmie działania na tętniczki płucne, zmniejszyło liczbę hospitalizacji, poprawiło jakość życia pacjentów i wydłużyło czas przeżycia. Nie uzyskano jednak długotrwałej normalizacji powstałych oporów płucnych i całkowitego odwrócenia zmian patomorfologicznych, co może prowadzić do postępującej niewydolności prawokomorowej i zgonu. Dla porównania, zgodnie z oceną rokowniczą pacjentów z TNP, kategorii niskiego ryzyka przypisano szacunkową śmiertelność roczną wynoszącą poniżej 5%; dla pacjentów z NT ta sama kategoria niskiego ryzyka oznacza 10-letnie ryzyko zgonu z przyczyn sercowych na poziomie 1% i mniej. Tym niemniej w obydwu przypadkach podkreśla się konieczność kompleksowego podejścia do terapii, uwzględniającego czynniki ryzyka i choroby współistniejące¹².

Właśnie temu zagadnieniu Doktorant poświęca część Wstępu, gdzie jasno i precyzyjnie uzasadnia podjętą tematykę badawczą. Następnie wskazuje na (endo)kannabinoidy, znane ze swoich silnych właściwości naczyniorozszerzających, jako potencjalne leki na różne rodzaje nadciśnienia. W szczególności, koncentruje się na ocenie efektów stosowania kannabidiolu (CBD) w pierwotnym i wtórnym nadciśnieniu tętniczym a także obwodowego antagonisty receptorów kannabinoidowych CB1, JD5037, w tętniczym nadciśnieniu płucnym. Spodziewane korzyści blokady receptorów kannabinoidowych CB1 na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego były już przedmiotem wcześniejszych poszukiwań badawczych zespołu kierowanego przez Prof. Malinowską. Pan mgr Remiszewski podjął się oceny wpływu przewlekłego podawania kannabidiolu na wybrane parametry hemodynamiczne: ciśnienie tętnicze i częstość akcji serca u szczurów z indukowanym pierwotnym i wtórnym nadciśnieniem tętniczym; a także na funkcjonowanie systemu obrony antyoksydacyjnej, oraz osoczowe i tkankowe poziomy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA). Kolejne cele badawcze dotyczyły oceny przewlekłego podawania w monoterapii lub w skojarzeniu obwodowego antagonisty receptorów kannabinoidowych CB1, JD5037, z metforminą będącą aktywatorem kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK), w tętniczym nadciśnieniu płucnym. Doktorant dokonał ponadto przeglądu dostępnej literatury dotyczącej potencjału hipotensyjnego (endo)kannabinoidów w nadciśnieniu systemowym i płucnym.

¹ Williams B et al; ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. Eur Heart J. 2018 Sep 1;39(33):3021-3104. doi: 10.1093/eurheartj/ehy339.

² Humbert M et al.; ESC/ERS Scientific Document Group. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. Eur Respir J. 2022 Aug 30;2200879. doi: 10.1183/13993003.00879-2022.

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono na dobrze znanych i stosowanych z powodzeniem w badaniach przedklinicznych – szczurzych modelach eksperymentalnych, tj. dwóch modelach nadciśnienia systemowego: spontanicznego (SHR; odpowiadającego ludzkiemu nadciśnieniu pierwotnemu) i indukowanego octanem deoksykortykosteronu i wysokosolną dietą (DOCA-salt; nadciśnienie wtórne), a także na modelu nadciśnienia płucnego wywołanym monokrotaliną (MCT). Do realizacji tak postawionych celów Doktorant zaplanował szeroki panel metod. Metodykę badań opisano skrótowo w Rozdziale 5. Jak wynika z opisu zawartego w poszczególnych publikacjach oryginalnych stanowiących podstawę dysertacji, obejmowała ona między innymi nieinwazyjne (*tail-cut*, telemetria) i inwazyjne (cewnikowanie naczyń tętnicznych) pomiary ciśnienia dla oceny parametrów hemodynamicznych; na potrzeby badań analitycznych i biologii molekularnej zastosowano techniki ultra lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej (UPL-CMS/MS) i gazowej oraz Western-blot; dokonano także histopatologicznej oceny pobranego materiału tkankowego (serce i płuca).

Wyniki badań podsumowano dokładnie i przejrzysto, w formie opisowej i graficznej. Uzupełniono je o trzy wnioski końcowe: (1) rezultatem przeciwnego działania przeciw- i pro-nadciśnieniowego podawanego przewlekle CBD, może być brak efektu hipotensyjnego w eksperymentalnych modelach pierwotnego i wtórnego nadciśnienia tętniczego u szczurów; (2) przewlekle, skojarzone podawanie metforminy i JD5037 wpływa na ograniczenie większości łagodnych zmian sercowo-płucnych, jakie wywołano w zastosowanym zwierzęcym modelu NP (tj. obniżenie ciśnienie skurczowego w prawej komorze serca, ograniczenie przerostu prawej komory, poprawa saturacji krwi, zmniejszenie grubości naczyń płucnych); (3) (endo)kannabinoidy o pojedynczym/sprecyzowanym (tzw. *monotarget*) mechanizmie działania, ale nie te o wielu punktach uchwytu (tzw. *multitarget*) mogą być kandydatem do dalszych badań nad ich zastosowaniem w nadciśnieniu systemowym; jednocześnie obie te grupy, mogą być dalej badane w kierunku leczenia TNP. To ostatnie – interesujące z punktu praktyki klinicznej wskazanie dotyczy preparatów dwuskładnikowych mających znaleźć zastosowanie w terapii ukierunkowanej na obwodowe receptory kannabinoidowe i ścieżkę sygnalizacyjną AMPK.

Poszczególne publikacje przeszły już proces recenzji przed ich przyjęciem do druku. Tym niemniej, z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kilka kwestii. W badaniach z zakresu farmakologii eksperymentalnej często wykorzystuje się modele zwierzęce służące ocenie skuteczności terapeutycznej substancji. Stanowią one użyteczne i stosunkowo tanie narzędzie w poszukiwaniu nowych szlaków sygnałowych i wyjaśnianiu mechanizmów leżących u podstaw rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Oczekuje się jednak aby przyczyna i fenotyp schorzenia były odwzorowaniem przebiegu procesu chorobowego u ludzi. Tymczasem wieloczynnikowa etiologia schorzenia, różnice międzygatunkowe, czy też wpływ dodatkowych czynników (wiek, płeć i inne) mogą decydować o braku idealnego „dopasowania” modelu zwierzęcego oraz niezadawalającej powtarzalności wyników uzyskanych w próbach przedklinicznych. Powyższe kwestie nie umknęły

jednak uwadze Doktoranta. Potrafi on z dojrzałością badacza krytycznie weryfikować otrzymane wyniki w kontekście ograniczeń metodologicznych, jakie mogą dotyczyć zwierzęcych modeli nadciśnienia systemowego i płucnego wykorzystanych na potrzeby niniejszej dysertacji.

Po pierwsze, otrzymane wyniki wskazują, że monokrotalina powodowała łagodne zmiany parametrów sercowych i płucnych, które mogą charakteryzować łagodne lub wczesne stadium PH. Rzeczywiście, szybki postęp choroby może zapobiec uruchomieniu korzystnych mechanizmów kompensujących upośledzenie funkcji prawej komory. Jednak, czy trzytygodniowy okres indukcji nadciśnienia płucnego jest wystarczający do wywołania powyższych mechanizmów? Jak opisano w pracy oryginalnej (*Front Pharmacol* 2022, 13), model oparty na jednorazowej iniekcji MCT jest powszechnie stosowany w badaniach przedklinicznych w nadciśnieniu płucnym. Przypuszcza się, że modele alternatywne (tzw. *two-hit*), oparte np. na podaniu monokrotaliny w połączeniu z usunięciem lewego płuca lub kombinacji Sugenu 5416 z przewlekłą hipoksją, mogą zapewnić lepsze odwzorowanie przebiegu schorzenia u ludzi i wywołać cięższą postać NP z przebudową naczyń płucnych, następczą dysfunkcją śródbrzońki i zmianami splotowatymi³⁴. Skuteczność ocenianych związków może zależeć także od doboru schematu badawczego – prewencyjnego lub terapeutycznego; ten pierwszy wydaje się w większym stopniu sprzyjać normalizacji parametrów hemodynamicznych i przerostowych w wyniku stosowania potencjalnych leków-kandydatów do terapii NP⁵.

Badania dotyczące nadciśnienia układowego przeprowadzono z wykorzystaniem szczurów SHR (nadciśnienie tętnicze pierwotne) i DOCA-salt (nadciśnienie tętnicze wtórne). Jak opisano w pracy oryginalnej (*Int J Mol Sci* 2020, 21), indukcję NT skrócono do okresu czterech tygodni. Pozwoliło to na uzyskanie porównywalnych wartości skurczowego ciśnienia tętniczego (do około 170 mmHg) w modelach SHR i DOCA. Warto dodać, że takie podejście zapobiega także obciążeniu płuc i progresji do niewydolności serca z dysfunkcją skurczową, która zwykle występuje u starszych osobników SHR.

Odnosząc się do promowanej praktyki leczenia skojarzonego zarówno NT jak i TNP, czy należy oczekiwać istotnych klinicznie interakcji między kannabinoidami a lekami dotychczas stosowanymi w farmakoterapii ww. schorzeń?

Powyższe komentarze w żaden sposób nie umniejszają mojej niezwykle pozytywnej opinii. Recenzowana rozprawa doktorska zasługuje na szczególne uznanie, świadczy o doskonałym przygotowaniu merytorycznym, umiejętności planowania, a następnie sukcesywnej realizacji badań naukowych. Doktorant wykazał się dobrym zrozumieniem zagadnień teoretycznych z zakresu tematu,

³ Vitali SH et al. The Sugen 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up. *Pulm Circ.* 2014;4:619–629.

⁴ Happé CM et al. Pneumonectomy combined with SU5416 induces severe pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*;2016;310:L1088–L1097.

⁵ Sztuka K et al. Systematic review and meta-analysis of interventions tested in animal models of pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2018; 110:55–63.

oraz potrafi podsumować i krytycznie omówić wyniki własne w odniesieniu do publikacji innych autorów.

Podsumowując stwierdzam, że cele pracy zostały zrealizowane, a osiągnięte oryginalne wyniki mają charakter poznawczy i aplikacyjny, oraz stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny. Tym samym praca autorstwa Pana mgr farm. Patryka Remiszewskiego "Evaluation of the potential therapeutic significance of chronically administered cannabinoids in experimental models of arterial and pulmonary hypertension in rats", w pełni odpowiada warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim. **Tym samym zwracam się z prośbą do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o nadanie Panu mgr farm. Patrykowi Remiszewskiemu stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy, wagę i obszerność tematu zrealizowanego w ocenianej pracy, wnioskuję o rozważenie możliwości wyróżnienia dysertacji.**