



WARSZAWSKI  
UNIwersYTET  
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD FIZJOLOGII DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

Warszawa, 17 września 2024 r.

### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne,

**mgr Anny Krzyżewskiej**

**pt.: „Ocena wpływu kannabidiolu na parametry zapalne i włóknienie w tkance płucnej i prawej komorze serca w szczurzym modelu nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną”**

uszykowanej pod opieką promotorską

Pani **prod. dr hab. n. farm. Hanny Kozłowskiej**

oraz opieką promotora pomocniczego Pani

**dr hab. n. farm. Marty Baranowskiej-Kuczko,**

w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Nadciśnienie płucne jest ważnym zagadnieniem klinicznym, stanowi istotne obciążenie dla systemów zdrowotnych, a pacjenci nim obarczeni mają istotnie gorsze rokowanie oraz pogorszoną jakość życia. Szacuje, że nadciśnienie płucne występuje u około 1% populacji. Jednak dostępne możliwości terapeutyczne nie zawsze są skuteczne. Jego etiologia jest różnorodna, od przypadku idiopatycznych i związane z ścianą naczyniową naczyń płucnych, poprzez niewydolność lewokomorową serca i wady zastawkowe serca, choroby obturacyjne płuc zmniejszające przekrój przez łożysko płucne, po powikłania choroby zakrzepowatorowej. Z tego powodu poszczególne modele doświadczalne nadciśnienia płucnego odzwierciedlają zazwyczaj jeden z patomechanizmów nadciśnienia płucnego. Jednym z najczęściej stosowanych modeli jest nadciśnienie płucne indukowane monokrotaliną, który najlepiej odpowiada nadciśnieniu płucnemu związanemu przebudową naczyń płucnych i wzrostem ich reaktywności.

Układ endogennych kannabinoidów jest chętnie badany w kontekście jego działań w ośrodkowym układzie nerwowym. Jednak prace ostatniej dekady jednoznacznie wskazują, że kannabinoidy mają również istotny wpływ na układ krążenia, w tym mogą mieć działanie naczyniorozszerzające w krążeniu płucnym, a tym samym mogą mieć znaczenie dla poszukiwań nowych form farmakoterapii uzupełniającej obecnie dostępne. W pracy doktorskiej Pani mgr Anna Krzyżewska podjęła istotną tematykę badawczą o ważnym znaczeniu poznawczym i potencjale translacyjnym dla farmakoterapii nadciśnienia płucnego. W badaniach będących podstawą recenzowanej pracy Doktorantka oceniła wpływ kannabidiolu, kannabinoidu bez działań psychoaktywnych, na krążenie płucne i prawą komorę w monokratolinowym modelu nadciśnienia płucnego u szczurów.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 105 stron, podzielona jest na 16 rozdziałów, które stanowią *Wykaz opublikowanych prac naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Cele pracy, rozdział podsumowujący Realizację celów, materiały i metody badawcze, wyniki i ich dyskusję, Wnioski, Piśmiennictwo*, po których zamieszczone są jako kolejne rozdziały: *streszczenia pracy doktorskiej w języku polskim i języku angielskim oraz reprints trzech prac* będące podstawą dysertacji. Praca zawiera też *Zgodę Lokalnej Komisji ds. Doświadczeń na Zwierzętach, Oświadczenia autorki i współautorów*, a także podsumowanie *Dorobku naukowego*.

*Wprowadzenie* jest spójne i sprawnie zapoznaje czytelnika z tematyką badawczą pracy. Doktorantka przedstawiła w nim kluczowe zagadnienia związane nadciśnieniem płucnym – epidemiologię, patofizjologię ze szczególnym uwzględnieniem szlaków sygnałowych transformującego czynnika wzrostu beta (TGF-beta1) i jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NFkappaB), modele eksperymentalne nadciśnienia płucnego, w tym model monokratolinowy, oraz znaczenie kannabinoidów i kannabidiolu. Na podkreślenie zasługuje włączenie w tej części pracy starannie przygotowanych trzech rycin, które graficznie podsumowują klasyfikację kliniczną, patogenezę i cele terapeutyczne w nadciśnieniu płucnym. Następnie Doktorantka przedstawiła uzasadnienie podjętej tematyki i cele pracy, do których zaliczają się: 1) analiza dostępnej literatury naukowej dotyczącej kannabinoidów, w tym kannabidiolu, i ich wpływu na krążenie płucne i potencjał terapeutyczny nadciśnienia płucnego; 2) ocena wpływu przewlekłego podawania kannabidiolu na parametry stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego, receptory kannabinoidowe CB1 i CB2 w płucach szczurów z



nadciśnieniem płucnym indukowanym monokrotaliną; 3) ocena potencjału przeciwzwłóknieniowego kannabidiolu i udziału szlaku sygnałowego TGF-beta1/SMAD2 w prawej komorze serca szczurów z nadciśnieniem płucnym w modelu monokrotalinowym. Cele i założenia pracy są sformułowane prawidłowo i wskazują na przemyślaną koncepcję pracy i przygotowany plan badawczy. W kolejnym rozdziale Doktorantka podsumowała materiały i metody użyte w pracy, w tym protokół doświadczalny (również zilustrowany ryciną), podział na grupy doświadczalne, użyty szeroki wachlarz metod biochemicznych, w tym Western blot, testy ELISA, immunohistochemia, metody histologiczne, chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas, elektroforeza kapilarna, a także pomiary in vivo ciśnienia w prawej komorze serca. W *Podsumowaniu wyników badań i dyskusji*, Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki i syntetycznie omówiła je w kontekście dostępnej literatury naukowej, a także przedstawiła rycinę podsumowującą układ endokannabinoidowy i związane z nim różnorodne mechanizmy biorące udział w rozkurczu tętnicy płucnej oraz dwie ryciny syntetycznie przedstawiające wyniki prac oryginalnych wchodzących w skład pracy doktorskiej. *Wprowadzenie i Podsumowanie* zaopatrzone są 60 pozycjami aktualnego i trafnie dobranego pozycji naukowych. Całość świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym i pogłębionej wiedzy Doktorantki dotyczącej patofizjologii nadciśnienia płucnego, endogennych kannabinoidów oraz o rozbudowanym warsztacie badawczym. Praca jest bardzo starannie zredagowana i trudno jest znaleźć w niej uchybienia edytorskie. Z obowiązku recenzenta chciałbym zaznaczyć, że przywoływane wytyczne ESC/ERS z 2015 roku są już zastąpione obecnie obowiązujące wytyczne ESC/ERS dotyczące nadciśnienia płucnego pochodzą z 2022 roku. Kopia zgody etycznej, oświadczenia i dorobek naukowy mogłyby być umieszczone jako załączniki/aneks pracy, a nie rozdziały. Uwagi te nie wpływają na moją wysoką ocenę dysertacji.

Podstawą rozprawy doktorskiej jest cykl trzech publikacji, w tym dwóch oryginalnych i jednej poglądowej, objętych wspólnym tytułem: „Ocena wpływu kannabidiolu na parametry zapalne i włóknienie w tkance płucnej i prawej komorze serca w szczurzym modelu nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną”. Do cyklu zaliczają następujące prace:

- **Krzyżewska A**, Baranowska-Kuczko M, Mińczuk K, Kozłowska H. Cannabinoids-A New Perspective in Adjuvant Therapy for Pulmonary Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 17;22(18):10048. doi: 10.3390/ijms221810048.

IF = 6,208, pkt. MNiSW=140 (Q1) (praca poglądowa)

- **Krzyżewska A**, Baranowska-Kuczko M, Jastrząb A, Kasacka I, Kozłowska H. Cannabidiol Improves Antioxidant Capacity and Reduces Inflammation in the Lungs of Rats with Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. *Molecules*. 2022 May 22;27(10):3327. doi: 10.3390/molecules27103327.

IF=4,600, pkt. MNiSW=140 (Q2) (praca oryginalna)

- **Krzyżewska A**, Baranowska-Kuczko M, Kasacka I, Kozłowska H. Cannabidiol alleviates right ventricular fibrosis by inhibiting the transforming growth factor  $\beta$  pathway in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2023 Aug;1869(6):166753. doi: 10.1016/j.bbadis.2023.166753.

IF=6,200, pkt. MNiSW=140 (Q1) (wskaźniki IF i kwartyli w roku publikacji) (praca oryginalna)

Wszystkie prace opublikowane były w latach 2021-2023 w czasopiśmie z listy *Journal Citation Reports* oraz ujętych w wykazie czasopism naukowych MNiSW. Łączny IF prac wynosi 17,008, punktacja MNiSW 420. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym oraz korespondującym autorem wskazując na wiodący jej udział w powstaniu prac, co potwierdzone jest również we wkładzie autorów opisanym w każdej pracy oraz w załączonych oświadczeniach współautorów. Należy podkreślić, że prace te zostały dostrzeżone przez międzynarodowe środowisko naukowe i do dnia sporządzenia recenzji były cytowane 34 razy wg bazy Scopus.

Pierwsza praca pt. „Cannabinoids - A New Perspective in Adjuvant Therapy for Pulmonary Hypertension” jest artykułem poglądowym podsumowującym dostępną literaturę naukową dotyczącą układu kannabinoidów i jego udziału w regulacji krążenia płucnego w warunkach fizjologicznych oraz w warunkach nadciśnienia płucnego. Praca szczegółowo omawia i zestawia dostępne publikacje dotyczące ekspresji składowych układu kannabinoidowego (m.in. stężenia anandamidu, receptorów CB1 i CB2, hydrolazy amidowej kwasów tłuszczowych FAAH) w płucach, naczyniach płucnych i śródbłonku płucnych, działanie rozkurczowe licznej rodziny kannabinoidów względem naczyń płucnych i potencjalnych mechanizmów związanych z tym działaniem (m.in. zależnych od śródbłonkowej syntazy tlenu azotu, receptorów kannabinoidowych, cyklooksygenazy, czy aktywności kanałów potasowych



aktywowanych jonami wapniowymi), oraz wpływem kannabinoidów na krążenie i naczynia płucne w modelach *in vivo* i *in vitro*. Dodatkowo, praca zyskuje dzięki zestawieniu tych informacji w czterech obszernych tabelach z przytoczeniem odpowiednich pozycji piśmiennictwa oraz podsumowanie znanych i potencjalnych mechanizmów w postaci ryciny. Niewątpliwą ważną zaletą pracy jest zwrócenie uwagi na mechanizmy zależne od śródbłotka i mechanizmy receptorowe działania kannabinoidów na naczynia płucne, a sama praca jest doskonałym źródłem informacji.

Druga publikacja pt. „Cannabidiol Improves Antioxidant Capacity and Reduces Inflammation in the Lungs of Rats with Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension” jest pracą oryginalną, w której mgr Anna Krzyżewska przeprowadziła doświadczenia w szczurzym modelu nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną i oceniała wpływ kannabidiolu na aktywność antyoksydacyjną i parametry zapalne w płucach. Doktorantka wykazała, że w badanym modelu u zwierząt z podwyższonym ciśnieniem w prawej komorze serca dochodzi do zmniejszenia potencjału antyoksydacyjnego, wzrostu markerów zapalnych (NF-kappaB, TNF, IL-1beta, białka MCP-1 i markera CD68) oraz dochodzi do wzrostu ekspresji receptorów CB1 i CB2. Przewlekłe podawanie CBD przez okres trzech tygodni istotnie zmniejszało ciśnienie w prawej komorze, poprawiało potencjał antyoksydacyjny, ograniczało ekspresję mediatorów zapalnych, i zmniejszało ekspresję receptora CB1 o działaniu pro-oksydacyjnym. W podsumowaniu Doktorantka wskazuje na kluczowy efekt kannabidiolu na zmniejszenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF-kappaB związanego z procesem zapalnym i związanego z tym zmniejszeniem ekspresji cytokin prozapalnych, chemokiny MCP-1 i infiltracji monocytów/makrofagów do tkance okołonaczyniowej, co łącznie wiązało się z zahamowaniem niekorzystnej przebudowy naczyń płucnych. Jednocześnie podanie kannabidiolu szczurom bez nadciśnienia płucnego nie miało istotnego wpływu na badane parametry. Praca ta jest dobrze zaplanowana metodologicznie, a na podkreślenie zasługuje użycie licznych metod badawczych (przewlekły model nadciśnienia płucnego i podawania badanej substancji *in vivo*, pomiary hemodynamiczne prawej komory serca, analizy Western blot, testy ELISA, immunohistochemia, chromatografia gazowa). Należy podkreślić też opis metod statystycznych i prawidłowe ich użycie. Praca wnosi nową wiedzę dotyczącą kannabidiolu jako substancji o działaniu przeciwzapalnym, poprawiającej właściwości antyoksydacyjne i zmniejszającej ciśnienie w prawej komorze, co może mieć potencjalne znaczenie dla poszukiwania nowych mechanizmów i substancji w terapii nadciśnienia płucnego.

Trzecia publikacja pt. "Cannabidiol alleviates right ventricular fibrosis by inhibiting the transforming growth factor  $\beta$  pathway in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats" jest pracą oryginalną, w której Doktorantka w tym samym modelu doświadczalnym oceniała wpływ kannabidiolu na włóknienie w prawej komorze serca, które występuje wtórnie do rozwoju nadciśnienia płucnego. Pani mgr Anna Krzyżewska potwierdziła w swojej pracy występowanie nasilonego włóknienia ze zwiększoną obecnością fibroblastów i fibronektyny w prawej komorze w przebiegu nadciśnienia płucnego, zwiększoną aktywność szlaku TGF-beta1/SMAD2, który związany jest z włóknieniem, a także zwiększone osoczkowe stężenia NT-proBNP, biomarkera niewydolności serca. Pod wpływem przewlekłego podawania kannabidiolu doszło do normalizacji ciśnienia prawokomorowego i stężenia NT-proBNP, ograniczenia włóknienia i związanego z nim ilością fibroblastów i ekspresją fibronektyny, częściowego zmniejszenia przerostu kardiomiocytów. Zarazem kannabidiol nie miał istotnego wpływu na badane parametry u szczurów bez nadciśnienia płucnego. Szczególnie wynik dotyczący NT-proBNP w mojej ocenie jest ważny w kontekście istotnie podwyższonego ciśnienia w prawej komorze serca oraz zwiększenia przekroju kardiomiocytów prawej komory, gdyż potwierdza cechy niewydolności prawokomorowej z wykorzystaniem markera będącego złotym standardem w biochemicznej diagnostyce niewydolności serca. Jednocześnie normalizacja NT-proBNP pod wpływem kannabidiolu jest pierwszy takim doniesieniem w piśmiennictwie, a ze względu na znaczenie peptydów natriuretycznych w diagnostyce i rokowaniu w niewydolności serca, istotnie zwiększa potencjał translacyjny prezentowanej pracy. Tak jak w poprzedniej pracy, w doświadczeniach przeprowadzonych przez Doktorantkę wykorzystano różnorodny wachlarz metod (przewlekłe doświadczenie w modelu nadciśnienia płucnego in vivo, pomiary hemodynamiczne, analizy histologiczne i immunohistochemiczne, Western blot, testy ELISA), co wskazuje na bogaty warsztat badawczy, a także umiejętność skutecznej współpracy z eksperymentatorami o różnych kompetencjach. Ważnym fragmentem pracy jest opis jej ograniczeń, w którym Doktorantka wskazuje na potrzebę włączenia samic w przyszłych doświadczeniach, zbadanie zależności w więcej niż jednym modelu nadciśnienia płucnego, a także rozbudowanie badań hemodynamicznych i czynnościowych prawej komory. Refleksje te świadczą o dojrzałości naukowej i świadomości ograniczeń własnego warsztatu, co jest ważną pozytywną cechą naukowca.



W oparciu o przeprowadzoną analizę dostępnej literatury (praca pogładowa) mgr Aneta Krzyżewska wyciągnęła następujące wnioski:

- kannabinoidy, w tym kannabidiol, regulują napięcie naczyń płucnych poprzez mechanizmy zależne i niezależne od śródbłonna (w tym mechanizmy receptorowe oraz mechanizmy enzymatyczne) przyczyniając się do zmniejszenia oporu płucnego, co może odgrywać ważną rolę w terapii nadciśnienia płucnego

W oparciu o uzyskane wyniki z badań doświadczalnych (dwie prace oryginalne), Doktorantka wyciągnęła następujące wnioski dotyczące kannabidiolu w modelu eksperymentalnym nadciśnienia płucnego:

- kannabidiol wywiera działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne w tkance płucnej poprzez hamowanie szlaku NF-kappaB i zmniejszenie ekspresji receptorów CB1 (o działaniu prozapalnym/prooksydacyjnym)

- kannabidiol wywiera działanie przeciwzwłóknieniowe w prawej komorze serca za pośrednictwem osłabienia szlaku sygnalizacyjnego TGF-beta1/SMAD2

- korzystne działanie kannabidiolu w modelu doświadczalnym nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną wpisują się w terapie celowane na rozkurcz tętnicy płucnej, zmniejszenie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego, ograniczenia włóknienia

- zasadnie jest dalsze badanie kannabidiolu i jego pochodnych jako terapii uzupełniającej w nadciśnieniu płucnym.

Wnioski te odzwierciedlają uzyskane przez Doktorantkę wyniki w pracach doświadczalnych oraz analizę dostępnego piśmiennictwa.

Moja ocena ogólna przedstawionej pracy doktorskiej przez Panią mgr Annę Krzyżewską jest pozytywna. Przeprowadzone doświadczenia wniosły istotną nową wiedzę dotyczącą patofizjologii nadciśnienia płucnego i udziału kannabidiolu w oparciu o wyniki z modelu doświadczalnego. Zaplanowanie, przeprowadzenie i interpretacja doświadczeń, a następnie ich dyskusja wymagało ogólnej i pogłębionej wiedzy teoretycznej, dobrze opanowanego warsztatu badawczego oraz dobrej organizacji pracy i umiejętności współpracy z innymi ośrodkami. W mojej ocenie całość pracy świadczy o wysokiej samodzielności naukowej mgr Anny Krzyżewskiej.

Lektura tej ciekawej pracy doktorskiej nasuwa następujące pytania do Doktorantki:

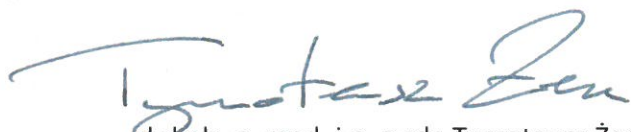
1. Jakie dodatkowe informacje mogłoby wnieść przeprowadzenie doświadczeń z selektywnymi antagonistami/agonistami receptora CB1?
2. Czy inhalacje egzogennych kannabinoidów mogą mieć pozytywny efekt u pacjentów z nadciśnieniem płucnym?

**Podsumowanie:**

Stwierdzam, że przedstawiona przez mgr Annę Krzyżewską rozprawa doktorska pt.: „Ocena wpływu kannabidiolu na parametry zapalne i włóknienie w tkance płucnej i prawej komorze serca w szczurzym modelu nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną” prezentuje wysoki poziom naukowy i spełnia kryteria prac doktorskich określone w Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 poz. 742).

Z pełnym przekonaniem zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Anny Krzyżewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również o wyróżnienie rozprawy ze względu na nowatorskie wyniki pracy wnoszące nową wiedzę dotyczącą procesów patofizjologicznych i znaczenia kannabinoidów w nadciśnieniu płucnym oraz ze względu na opublikowanie wyników rozprawy w trzech artykułach naukowych w czasopismach ujętych w wykazie *Journal Citation Reports* i znajdujących w górnych kwartylach Q1/Q2.



dr hab. n. med. i n. o zdr. Tymoteusz Żera