



Prof. dr hab. Ewa Słomińska  
Katedra i Zakład Biochemii  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
[eslom@gumed.edu.pl](mailto:eslom@gumed.edu.pl)

Gdańsk, 2024.09.15



RPW/8009/2024  
Data: 2024-10-07  
UMB

**Senat**  
**Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku**

### Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Anny Krzyżewskiej**

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

Temat przesłanej do oceny rozprawy doktorskiej jest aktualny i ważny nie tylko ze względów klinicznych, ale także poznawczych. Dotyczy bowiem połączenia badań nad tętnicznym nadciśnieniem płucnym oraz właściwościami leczniczymi kannabidiolu.

Wiadomo, że tętnicze nadciśnienie płucne jest chorobą, w przebiegu której dochodzi do wzrostu oporu w krążeniu płucnym, zwiększonego obciążenia następczego prawej komory serca, co w konsekwencji doprowadza do jej przerostu i zmian zwłóknieniowych, które w konsekwencji doprowadzają najpierw do przerostu mięśnia sercowego a następnie do przedwczesnej śmierci pacjenta. Obecnie nie ma skutecznej terapii pozwalającej na pełne wyleczenie pacjenta. Stosowane strategie terapeutyczne zalecają stosowanie leków o działaniu naczyniorozszerzającym, które jedynie przyczyniają się do poprawy stanu i jakości życia pacjentów. Biorąc pod uwagę etiologię tej choroby należałoby rozważyć wielokierunkowe leczenie przyczyniające się do zmniejszenia oporu naczyniowego w krążeniu płucnym z jednoczesnym przeciwdziałaniem zmianom proliferacyjnym i zwłóknieniowym a także o działaniu przeciwzapalnym i antyoksydacyjnym.

Badania nad właściwościami kannabidiolu trwają już od wielu lat ale nadal jest więcej niewiadomych niż potwierdzonych danych na temat jego szerokiego i bezpiecznego stosowania. Do tej pory stosuje się go w leczeniu padaczki lekoopornej i spastyczności mięśni w przebiegu



stwardnienia rozsianego. Wiadomo, że jako składnik *Cannabis sativa* nie wykazuje działania psychoaktywnego i oznacza się wysokim profilem bezpieczeństwa. Wykazano jego działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne, zapobiegające włóknieniu a także rozszerzające naczynia płucne. Dodatkowe obserwacje (na razie na modelach eksperymentalnych) wykazują, że związek ten obniża ciśnienie skurczowe w prawej komorze przy jednoczesnym braku wpływu na ciśnienie ogólne.

Przytoczone przesłanki wskazują, że podjęte przez Doktorantkę zagadnienie jest jak najbardziej uzasadnione. Należy zaznaczyć, że tematyka badań i prezentowane w tej rozprawie wyniki są kontynuacją i rozwinięciem badań realizowanych w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej przez zespół kierownika jednostki – prof. dr hab. Barbarę Malinowską oraz promotora rozprawy prof. dr hab. Hannę Kozłowską i promotora pomocniczego- dr hab. Martę Baranowską – Kuczko.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest oparta na cyklu trzech publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, w tym jednej pracy przeglądowej pt. „*Cannabinoids - A New Perspective in Adjuvant Therapy for Pulmonary Hypertension*” i dwóch prac oryginalnych: 1) pt. “*Cannabidiol Improves Antioxidant Capacity and Reduces Inflammation in the Lungs of Rats with Monocrotaline- Induced Pulmonary Hypertension*”, 2) pt. “*Cannabidiol alleviates right ventricular fibrosis by inhibiting the transforming growth factor  $\beta$  pathway in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*”. Wszystkie prace opublikowano w uznanych, recenzowanych czasopismach naukowych, o łącznej wartości współczynnika oddziaływania (*Impact Factor*) ponad 17, a sumaryczna liczba punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla cyklu publikacji wynosi 420. We wszystkich pracach będących podstawą rozprawy doktorskiej mgr Anna Krzyżewska jest pierwszym autorem, co świadczy o jej dominującym udziale w ich powstaniu. Potwierdzają to zamieszczone w rozprawie oświadczenia Doktorantki i współautorów. Mgr Anna Krzyżewska ocenia swój udział w przygotowaniu publikacji na 60% a polegał on na „opracowaniu koncepcji metodologii i planu badań, walidacji metod badawczych, wykonaniu części eksperymentalnej, interpretacji wyników, analizie statystycznej, przeglądzie elektronicznych baz publikacji naukowych i zgromadzeniu piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptów, a także pozyskaniu części źródeł finansowania”. Wszyscy współautorzy mają znacząco mniejszy udział w przygotowaniu publikacji i wyrażają zgodę na wykorzystanie przez Doktorantkę powyżej wymienionych publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Zanim przejdę do omawiania osiągnięcia naukowego chciałabym skomentować przesłaną w formie książkowej rozprawę doktorską. Zawiera ona typowy układ dla tego typu prac: Spis treści,





Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej, Realizacja celów naukowych, materiały i metody badawcze, podsumowanie wyników badań i dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Pełnotekstowe publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej, Oświadczenia autorów i współautorów.

Wprowadzenie zawiera kompendium wiedzy na temat nadciśnienia płucnego, w tym klinicznej klasyfikacji, patogenezę i następstwa tej choroby a także aktualnej wiedzy o stosowanej terapii wraz z mechanizmami ich działania. Zawiera także opis stosowanego w badaniach eksperymentalnych modelu nadciśnienia płucnego – modelu monokrotalinowego. Osobny podrozdział poświęcono właściwościom kannabidiolu ze szczególnym zwróceniem uwagi na ich właściwości przeciwzapalne, antyoksydacyjne, zmniejszające włóknienie.

Przechodząc do oceny dalszej części rozprawy doktorskiej to Doktorantka przedstawiła trzy cele do zrealizowania. Pierwszy z nich dotyczy przeglądu piśmiennictwa na temat wpływu kannabinoidów, w tym CBD na krążenie płucne oraz właściwości tego związku, które mogą być przydatne w terapii nadciśnienia płucnego. Moim zdaniem cele stawiane w rozprawie doktorskiej powinny dotyczyć części doświadczalnej. Rozumiem, że wpisanie tego celu było podyktowane włączeniem pracy przeglądowej do cyklu publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej.

Dwa kolejne cele są sformułowane w sposób jasny i przemyślany. Doktorantka podjęła się trudnego zadania a mianowicie oceny wpływu stosowania kannabidiolu na parametry stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego w płucach szczurów oraz wykazanie potencjału przeciwzwłóknieniowego tego związku w prawej komorze serca szczurów z nadciśnieniem płucnym indukowanym monokrotaliną. Ponadto podjęła się wyjaśnienia mechanizmu działania kannabidiolu na wybrane ścieżki sygnałowe.

Biorąc pod uwagę metodykę pracy, to Doktorantka do realizacji założonych celów badawczych zastosowała wiele złożonych i nowoczesnych technik badawczych, w tym: western blot, elektroforezę kapilarną, chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas. Ponadto wykorzystywała testy immunoenzymatyczne, metody histologiczne i immunohistochemiczne. Warsztat badawczy wykorzystany do realizacji badań jest właściwy a jego wykorzystanie przez Doktorantkę oceniam bardzo wysoko. Świadczy to o dużym doświadczeniu badawczym mgr Anny Krzyżewskiej na tym etapie rozwoju naukowego.



Do przedstawionego schematu doświadczeń nie mam żadnych zastrzeżeń, stosowany model nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną jest od dawna stosowanym modelem badawczym w Jednostce.

W przedstawionym podsumowaniu wyników badań i dyskusji w sposób niezwykle uporządkowany i wnikliwy przedyskutowano uzyskane wyniki. Doktoranta dobrze przedyskutowała i skonfrontowała uzyskane wyniki z danymi z piśmiennictwa, a ich interpretacja jest wnikliwa i ostrożna. Świadczy to o dobrej znajomości poruszanej w rozprawie problematyki oraz dobrej znajomości piśmiennictwa w zakresie prowadzonych badań.

W dalszej części zostały przedstawione najważniejsze wnioski z uzyskanych wyników. Wnioski są prawidłowo sformułowane i w pełni udokumentowane wynikami przeprowadzonych doświadczeń.

Przechodząc do omawiania osiągnięcia naukowego przedstawione w cyklu publikacji pragnę już na wstępie zaznaczyć, że oceniam je bardzo dobrze.

W pracy przeglądowej dokonano wnikliwej analizy światowego piśmiennictwa naukowego pod kątem wykorzystania i działania kannabidiolu w nadciśnieniu płucnym, w tym na płucne naczynia krwionośne. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że w krążeniu płucnym zarówno ludzi jak i zwierząt wykazano obecność ligandów endokannabinoidowych, klasycznych i nieklasycznych receptorów kannabinoidowych a także enzymów zaangażowanych w metabolizm kannabinoidów. Kannabinoidy wykazują zależne od stężenia działanie rozszerzające tętnice płucne a wynika to z wpływu tych związków na mechanizmy zależne od śródbłonna w tym: 1) syntazę tlenu azotu, 2) pochodne kwasu arachidonowego i enzymy biorące udział w ich przemianie, 3) kanały potasowe. Wykazano także działanie kannabidiolu poprzez odpowiednie receptory. W pracy przeglądowej na podstawie dostępnych danych przedstawiono schemat obrazujący lokalizację elementów układu endokannabinoidowego oraz potencjalne mechanizmy zaangażowane w wywołany kannabinoidami rozkurcz tętnic płucnych. Wykazano także, że nie ma w piśmiennictwie przekonujących danych doświadczalnych, że kannabinoidy mogą stać się elementem terapii stosowanym w nadciśnieniu płucnym, nawet na modelach zwierzęcych. To skłoniło Doktorantkę do podjęcia badań w tym temacie a uzyskane wyniki przedstawiono w dwóch pracach oryginalnych.

Do najważniejszych wyników zamieszczonych w tych publikacjach należą obserwacje, że:

- 1) Stosowanie przewlekle kannabidiolu w płucach szczurów z indukowanym monokrotaliną nadciśnieniem płucnym powodowało zwiększenie stężenia parametrów oksydacyjnych





- (TAC i GSH), obniżenia ilości receptorów CB1 (a zatem zmniejszenia działania prozapalnego i prooksydacyjnego) i zmniejszenia poziomów mediatorów stanu zapalnego (NF-kB, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1 i CD68)
- 2) Działanie kannabidiolu jest powiązane ze szlakiem NF-kB. Zaproponowano mechanizm działania przeciwzapalnego.
  - 3) Potwierdzono, że kannabidiol nie wykazuje wyżej wymienionego działania u zwierząt zdrowych, co może świadczyć o jego działaniu ograniczonym do stanów patologicznych i potwierdzać dobry profil bezpieczeństwa przy jego stosowaniu
  - 4) Przewlekłe podawanie kannabidiolu w nadciśnieniu płucnym indukowanym monokrotaliną u szczurów spowodowało obniżenie stężenia w osoczu NT-proBNP (markera niewydolności serca), zmniejszyło obszar włóknienia śródmiąższowego i okołonaczyniowego a także obniżało stężenie markerów włóknienia (TGF- $\beta$ 1Gal-3, SMAD2 i pSMAD2) w prawej komorze serca szczura
  - 5) Wykazano działanie kannabidiolu poprzez szlak TGF- $\beta$ 1/SMAD2

W mojej ocenie wyniki są interesujące, wymagają co prawda jeszcze pogłębionych badań nad włączeniem kannabidiolu do terapii stosowanej w nadciśnieniu płucnym, ale stanowią krok w tym kierunku.

Na zakończenie mojej recenzji chciałabym podkreślić bardzo duży dorobek naukowy i doświadczenie badawcze Doktorantki. Z przedstawionych informacji wynika, że oprócz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej mgr Anna Krzyżewska jest współautorem 5 publikacji naukowych, 2 monografii naukowych, 12 doniesień konferencyjnych. Łączny współczynnik oddziaływania (IF) wynosi ponad 42. Była kierownikiem 4 projektów naukowych finansowanych z subwencji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz współwykonawcą w 16 projektach naukowych finansowanych z Narodowego Centrum Nauki i subwencji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Odbyła 3-miesięczny staż w Department of Physiology University Medical Center w Amsterdamie. Jak na tak młodą osobę jej osiągnięcia naukowe w mojej ocenie są wybitne i zasługują na uznanie.

**W podsumowaniu stwierdzam, że mgr Anna Krzyżewska jest w pełni ukształtowanym pracownikiem naukowym, posługującym się wieloma technikami badawczymi, zdolnym do rozwiązywania skomplikowanych problemów. Jej rozprawa doktorska ma charakter oryginalnej, bardzo dobrej pracy doświadczalnej spełniającej wszelkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z obowiązującą podstawą prawną: art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j.Dz.U.z 2023 poz. 742). Dlatego też**



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

Jednocześnie biorąc pod uwagę doskonały warsztat badawczy Doktorantki, co jest wyróżniające na tym etapie rozwoju naukowego oraz fakt, że niezwykle interesujące wyniki które uzyskała zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Anny Krzyżewskiej.

Z poważaniem

Prof. dr hab. n. med. Ewa Słomińska