



Łódź, 2022.07.19

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Krzysztofa Mińczuka pt.  
Interakcja pomiędzy zaangażowanymi w odpowiedź presyjną  
receptorami kannabinoidowymi CB1 i angiotensynowymi w jądrze  
przykomorowym podwzgórza czuwających szczurów z  
nadciśnieniem pierwotnym i normotensyjnych**

**Charakterystyka i znaczenie podjętej problematyki badawczej**

W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień dotyczących wzajemnych powiązań między układem endokannabinoidowym (ECS), a układem renina-angiotensyna (RAS). Obydwa układy uczestniczą m.in. w kontroli układu krążenia. Przedmiotem badań przeprowadzonych przez Pana mgr inż. Krzysztofa Mińczuka była ocena interakcji w obszarze jądra przykomorowego podwzgórza pomiędzy receptorami kannabinoidowymi typu CB1 a receptorami AT1 i AT2 dla angiotensyny II oraz receptorami Mas dla angiotensyny 1-7 w zakresie w regulacji ciśnienia tętniczego u czuwających szczurów z nadciśnieniem tętniczym pierwotnym (Spontaneously Hypertensive Rat; SHR) i szczurów normotensyjnych Wistar Kyoto (WKY) stanowiących grupę kontrolną. Zainteresowanie wzajemnymi powiązaniem pomiędzy układem ECS i RAS wzrosło w dobie pandemii COVID-19. Zmiany ekspresji konwertazy angiotensyny 2 (ACE2, swoistego receptora dla wirusa SARS-CoV-2) w przebiegu choroby skutkują bowiem niekorzystną dla organizmu funkcjonalną przewagą klasycznej osi RAS (angiotensyna I → ACE → angiotensyna II → receptor AT1) nad osią ochronną, tzw. alternatywną (angiotensyna II → ACE2 → angiotensyna 1-7 → receptor Mas/angiotensyna I → ACE2 → angiotensyna 1-9 → ACE2 → angiotensyna 1-7 → receptor Mas).

**Układ pracy, struktura podziału treści i poruszane zagadnienia**

Rozprawa doktorska składa się z liczącego 35 stron autoreferatu i dwóch publikacji stanowiących jej podstawę:

- pracy oryginalnej *Cross-Talk between CB1, AT1, AT2 and Mas Receptors Responsible for Blood Pressure Control in the Paraventricular Nucleus of Hypothalamus in Conscious Spontaneously Hypertensive Rats and Their Normotensive Controls*;
- pracy przeglądowej *Cross-Talk between the (Endo)Cannabinoid and Renin-Angiotensin Systems: Basic Evidence and Potential Therapeutic Significance*.

Do rozprawy dołączono oświadczenia Doktoranta i współautorów w/w publikacji oraz zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach na przeprowadzenie badań.

Układ autoreferatu ma klasyczny charakter: 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 (73 pozycje anglojęzyczne w przeważającej części opublikowane w okresie ostatnich 5 lat!), Streszczenie w języku polskim i Streszczenie w języku angielskim. Konstrukcję pracy należy uznać za logiczną i podkreślającą kolejność zagadnień, którymi zajmował się Doktorant. Ponieważ część eksperymentalna doktoratu jak i dane wprowadzające czytelnika w tematykę badawczą były przedmiotem dwóch obszernych publikacji stanowiących podstawę rozprawy, zostały one przedstawione w autoreferacie w formie skróconej z odniesieniami do odpowiednich fragmentów publikacji.

Szczegółowy, a jednocześnie klarowny opis kannabinoidów, ECS i RAS oraz efektów biologicznych wynikających z pobudzenia bądź hamowania tych dwóch układów wprowadzają czytelnika w tematykę związaną z badaniami prowadzonymi przez mgr inż. Krzysztofa Mińczuka. Do rodziny kannabinoidów należą trzy grupy związków: endokannabinoidy, fitokannabinoidy i syntetyczne kannabinoidy. Działania biologiczne kannabinoidów wynikają z pobudzenia różnych klas receptorów: przede wszystkim CB1 i CB2, a także GPR55, GPR18, TRPV1 i PPAR. Rycina 1 w autoreferacie i Rycina 2 w pracy przeglądowej przedstawiają efekty działania wybranych ligandów receptorów CB1. Z kolei Rycina 2 w autoreferacie i Rycina 3 w pracy przeglądowej przedstawiają elementy składowe RAS i główne efekty działania leków/związków modyfikujących oś klasyczną i oś alternatywną układu. Tabela 1

pracy przeglądowej zawiera przykłady leków, które działają na elementy składowe ECS i RAS.

RAS odgrywa istotną rolę w regulacji ciśnienia tętniczego krwi oraz utrzymaniu prawidłowego stężenia jonów sodowych i wody w organizmie. Jak słusznie podkreśla Doktorant zaburzenie równowagi pomiędzy osią klasyczną i osią alternatywną, przy przewodzie osi ACE/Angiotensyna II/Receptor AT1, prowadzi do rozwoju wielu stanów patologicznych, w tym w układzie krążenia (niewydolność serca, zawał mięśnia sercowego, nadciśnienie tętnicze), w układzie oddechowym, zaburzeń metabolicznych (cukrzyca), funkcji nerek, wątroby, przewodu pokarmowego, zaburzeń endokrynologicznych, neurodegeneracyjnych, hematologicznych, rozrodczych, mięśniowych.

Jak wspomniałam wcześniej przedmiotem badań przeprowadzonych przez Pana mgr inż. Krzysztofa Mińczuka była ocena interakcji w obszarze jądra przykomorowego podwzgórza (PVN) pomiędzy receptorami kannabinoidowymi typu CB1 a receptorami AT1 i AT2 dla angiotensyny II oraz receptorami Mas dla angiotensyny 1-7 w zakresie w regulacji ciśnienia tętniczego u szczurów. PVN jest jedną ze struktur ośrodkowego układu nerwowego zaangażowaną w regulację układu krążenia, którego funkcja ulega zaburzeniu w nadciśnieniu tętniczym, stanowiącym istotny czynnik ryzyka zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych. W PVN zlokalizowane są elementy składowe układu ECS i RAS, które modyfikują ciśnienie tętnicze krwi i częstość akcji serca. Nie dziwi zatem fakt, że w autoreferacie i pracy przeglądowej podane są informacje nt. tej struktury mózgowej.

## **Cel pracy**

Celem rozprawy doktorskiej było:

1. zbadanie potencjalnej interakcji pomiędzy receptorami CB1 a receptorami AT1 i AT2 dla Ang II i receptorami Mas dla Ang 1–7 w obrębie PVN szczurów czuwających;
2. zbadanie wpływu nadciśnienia pierwotnego na efekt presyjny stymulowany pobudzeniem receptorów AT1 i AT2 dla Ang II, Mas dla Ang 1–7 i kannabinoidowych CB1;
3. określenie mechanizmów leżących u podłoża interakcji pomiędzy ECS i RAS oraz ich potencjalnego znaczenia terapeutycznego.

## **Metodyka badawcza**

Badania przeprowadzono na samcach szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem pierwotnym (SHR) i ich normotensyjnej kontroli, szczurów Wistar Kyoto (WKY). Wybór szczurów SHR jest w pełni uzasadniony, albowiem są one szeroko stosowane jako model nadciśnienia pierwotnego u ludzi. U tego szczepu podwyższone ciśnienie tętnicze wynika częściowo ze zwiększonej aktywności układu współczulnego zależnego od PVN i RAS. Ponadto, większość leków hipotensyjnych wywołuje u szczurów SHR spadek ciśnienia tętniczego krwi. Rycina 3 w autoreferacie w klarowny sposób przedstawia schemat doświadczeń. Szczegółowy opis procedur doświadczalnych (zabiegu implantacji kaniuli i cewników, mikroiniekcji do PVN, izolacji substruktur PVN, pomiaru ciśnienia tętniczego krwi, badania ekspresji białek metodą Western blot), leków i odczynników chemicznych wykorzystanych w doświadczeniach oraz analizy statystycznej uzyskanych wyników znajduje się w rozdziale 2 dołączonej pracy oryginalnej.

## **Omówienie wyników**

Zawarta w autoreferacie Rycina 4 przedstawia podsumowanie najważniejszych wyników badań. Zgodnie z oczekiwaniami skurczowe, rozkurczowe i średnie ciśnienie tętnicze krwi u szczurów SHR było o około 60% wyższe w porównaniu ze szczurami WKY. Angiotensyna II, angiotensyna 1-7 oraz CP55940 (agonista receptorów kannabinoidowych CB1) podane do PVN czuwających szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem (SHR) i normotensyjnych WKY stymulowały wzrost ciśnienia tętniczego krwi; był on wyższy u SHR niż WKY. Presyjne działanie CP55940 obserwowano u zwierząt, którym wcześniej podano dożylnie AM251, antagonistę receptorów CB1. Najsilniejsze działanie hipertensyjne wykazywała angiotensyna II, a najłabsze angiotensyna 1-7. Losartan (antagonista receptorów AT1) i w mniejszym stopniu PD123319 (antagonista receptorów AT2) oraz A-779 (antagonista receptorów Mas) hamowały wzrost ciśnienia tętniczego krwi wywołany przez angiotensynę II i CP55940. Z kolei AM251 osłabiał wzrost ciśnienia tętniczego w odpowiedzi na angiotensynę II i angiotensynę 1-7. Co ciekawe, AM251 podawany zarówno dożylnie jak i do PVN zwiększał ciśnienie tętnicze zarówno u WKY jak i u

SHR. W opinii Doktoranta łagodne działanie presyjne AM251 prawdopodobnie wynika z antagonizowania wpływu endokannabinoidów pobudzających odpowiednio hamujące receptory presynaptyczne CB1 zlokalizowane obwodowo na zakończeniach nerwów współczulnych unerwiających naczynia oporowe lub receptorów CB1 w PVN odpowiedzialnych za spadek ciśnienia. W swoich badaniach Doktorant wykazał ponadto, że stopień ekspresji receptorów AT2 i Mas w PVN szczurów normotensyjnych (WKY) jest znamienne wyższy niż u szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem (SHR), natomiast receptorów CB1 jest wyższy u szczurów SHR. Rycina 4 autoreferatu w elegancki i klarowny podsumowuje uzyskane wyniki.

Pragnę podkreślić dojrzałość dyskusji, której najlepszym odzwierciedleniem jest praca przeglądowa wchodząca w skład dysertacji. Aktywność układu współczulnego zależy między innymi od równowagi pomiędzy aktywnością neuronów glutaminianergicznych i GABA-ergicznych w PVN. Ekspresja receptorów AT1 i CB1 w PVN szczurów SHR jest wyższa w porównaniu do szczurów WKY. Receptory te są zlokalizowane presynaptycznie głównie na neuronach glutaminianergicznych oraz GABA-ergicznych, a ich pobudzenie odpowiednio zwiększa aktywność glutaminianergiczną i zmniejsza aktywność GABA-ergiczną. Zarówno nasilenie wpływu pobudzającego (transmisja glutaminergiczna), jak i zmniejszenie wpływu hamującego (transmisja GABA-ergiczna) na układ współczulny może prowadzić do wzrostu ciśnienia tętniczego. A zatem wzrost gęstości receptorów AT1 i CB1 w PVN szczurów SHR w porównaniu do WKY może być przynajmniej częściowo odpowiedzialny za wyższe ciśnienie tętnicze krwi u tych zwierząt. Rycina 5 autoreferatu i pracy przeglądowej przedstawiają autorską hipotezę na temat mechanizmów zaangażowanych w odpowiedź presyjną wywołaną przez Ang II i CP55940 oraz interakcję pomiędzy receptorami AT1 i CB1 w PVN. Z kolei Rycina 6 autoreferatu i Rycina 4 pracy przeglądowej podsumowują wpływ antagonistów receptorów CB1 na efekty wywołane pobudzeniem receptorów AT1 w zakresie układu krążenia, przewodu pokarmowego i potencjałów pobudzających (EPSP) komórek jądra nadwzrokowego.

Jak pisze Doktorant powszechnie przyjmuje się, że receptory AT2 i Mas przeciwdziałają efektowi presyjnemu powstałemu w wyniku stymulacji receptorów AT1. Zmniejszenie ekspresji receptorów AT2 i Mas w PVN, a tym samym

hamującego wpływu na układ współczulny, może więc przyczyniać się do wzrostu ciśnienia tętniczego u szczurów SHR.

Wyniki uzyskane przez mgr inż. Mińczuka po raz pierwszy pokazały funkcjonalną interakcję pomiędzy angiotensyną 1-7 i receptorami Mas a receptorami kannabinoidowymi CB1 w ośrodkowym układzie nerwowym. Założone i zrealizowane cele badań prowadzonych przez Doktoranta mogą się przyczynić do zrozumienia złożonych interakcji pomiędzy ECS i RAS zachodzących w obrębie PVN. Uważa się, że antagoniści receptorów CB1, np. AM6545 czy JD5037, oraz związki hamujące rozkład endokannabinoidów mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w terapii bólu, stwardnienia rozsianego, choroby Parkinsona czy depresji. Wyniki badań mgr inż. Mińczuka wskazują na to, że w przypadku stosowania w/w związków należy rozważyć potencjalne ryzyko wnikające z ich interakcji z receptorami AT1.

### **Podsumowanie**

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Krzysztofa Mińczuka jest opracowaniem, które należy ocenić zdecydowanie pozytywnie. Drobne błędy edytorskie w autoreferacie nie umniejszają wysokiej wartości dysertacji. Treść rozprawy doktorskiej potwierdza, że Pan Mińczuk posiada dużą wiedzę z zakresu regulacji układu krążenia, układu endokannabinoidowego i układu RAS. Ponadto dysponuje bardzo dobrym warsztatem metodologicznym, potrafi właściwie zaplanować i przeprowadzić prace doświadczalne oraz analizować dane i zinterpretować uzyskane wyniki. To wszystko potwierdza umiejętność Doktoranta w zakresie samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Krzysztofa Mińczuka stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jest bardzo wartościowa i dotyczy zagadnień stosunkowo słabo poznanych. Podjęte badania uważam za uzasadnione i stanowiące istotny wkład w rozwój nauk farmaceutycznych.

**Przedłożoną mi do recenzji rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie oraz zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o nadanie Panu mgr inż. Krzysztofowi Mińczukowi stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Jednocześnie biorąc pod uwagę fakt, że podstawę dysertacji stanowiły dwie**

publikacje o łącznym IF 12.524 i punktacji MEiN 280 rekomenduję wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Spełnia ona wymogi Regulaminu Wyróżniania Rozpraw Doktorskich na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku.

Jolanta Lawińska