



Kraków, 21 lipca 2022 roku

Prof. dr hab. Katarzyna Starowicz-Bubak  
Zakład Neurochemii  
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN  
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Krzysztofa Mińczuka pt.:**  
***„Interakcja pomiędzy zaangażowanymi w odpowiedź presyjną receptorami kanabinoidowymi CB1 i  
angiotensynowymi w jądrze przykomorowym podwzgórza czuwających szczurów z nadciśnieniem  
pierwotnym i normotensyjnych”***  
**przygotowanej na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku  
napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Malinowskiej.**

Rozprawa doktorska mgr inż. Krzysztofa Mińczuka dotyczy zbadania interakcji pomiędzy układem endokannabinoidowym (ang. endocannabinoid system, ECS), a układem renina-angiotensyna (ang. renin–angiotensin system, RAS) w patofizjologii układu krążenia ze szczególnym uwzględnieniem roli jądra przykomorowego podwzgórza (ang. paraventricular nucleus, PVN) u szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i normotensyjnych.

Nadciśnienie tętnicze stanowi istotny problem społeczny. W Polsce problem ten dotyczy prawie 35% populacji w wieku powyżej 18 roku życia. Według wybranych polskich badań epidemiologicznych przeprowadzonych w latach 1997–2017 nadciśnienie tętnicze występuje od 29% (NATPOL PLUS) do 45% (WOBASZ II) dorosłej populacji oraz nawet u 75% osób w wieku 65 r.ż. i powyżej (PolSenior). Nadciśnienie tętnicze jest czynnikiem ryzyka wielu chorób, w tym m.in. udaru mózgu, choroby niedokrwiennej serca, niewydolności serca, niewydolności nerek czy retinopatii nadciśnieniowej. Jeśli nie dojdzie do zmiany stylu życia (odpowiednia dieta, wysiłek fizyczny, walka z nałogami) w Polsce, częstość występowania nadciśnienia wśród dorosłych Polaków w ciągu najbliższych 25 lat zwiększy się do ponad 50%, a liczba pacjentów przekroczy 15 mln. W przypadku kosztów świadczeń udzielonych z powodu udaru, udział kosztów świadczeń udzielonych osobom z odnotowanym w danych NFZ nadciśnieniem tętniczym wynosił w 2018 r. 86% (611 mln zł) (za: Nadciśnienie tętnicze [RAPORT NFZ, Warszawa 2019]). Nadciśnienie tętnicze jest także najczęstszą bezpośrednią przyczyną zgonów w Polsce i na świecie (dane wg WHO i AHA). Dlatego tak ważnym elementem postępowania w nadciśnieniu jest prewencja pierwotna, która polega na wpływie na uwarunkowania środowiskowe, zwłaszcza na styl życia. Niezależnie od wytycznych Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (PTNT) dotyczących zasad postępowania w nadciśnieniu

tętnicznym, nie należy ustawać w poszukiwaniu nowych, obiecujących metod leczenia tej choroby. Co więcej, obecnie stosowane leki hipotensyjne mogą mieć działanie niepożądane. W związku z tym potrzebne są nowe cele terapeutyczne i metody kontrolowania nadciśnienia i współistniejących z nim chorób. Najnowsze badania potwierdzają związek między florą bakteryjną jelit (mikrobiomem przewodu pokarmowego) a chorobami układu sercowo-naczyniowego. W ciągu ostatnich kilku lat zwrócono szczególną uwagę na tzw. oś jelitowo-mózgową i wykazano, że układ endokannabinoidowy stanowi ważną jednostkę homeostatyczną jelita, co uzasadnia ukierunkowanie strategii leczenia nadciśnienia tętniczego na kanabinoidy. Wykrycie w ostatniej dekadzie XX wieku endogennych kanabinoidów u człowieka i różnych gatunków zwierząt oraz fakt, że odgrywają one istotną rolę w patomechanizmie hipotensji związanej z szokiem krwotocznym, septycznym czy zawałem serca dowodzi, że związki te wykazują daleko szersze właściwości niż przypuszczano do tej pory. Nie mam zatem najmniejszych wątpliwości, że temat podjęty przez Doktoranta jest innowacyjny i ważny, doskonale wpisując się w aktualnie toczoną w przestrzeni publicznej dyskusję na temat legalizacji medycznej marihuany, szczególnie w aspekcie bieżących zmian legislacyjnych umożliwiających m.in. uprawę konopi innych niż włókniste w celu uzyskania surowca przeznaczonego do sporządzania leków recepturowych (ustawa z dnia 24 marca 2022 roku o zmianie ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii).

Rozprawa doktorska została przygotowana na podstawie dwóch prac (jednej oryginalnej i jednej przeglądowej) opublikowanych w 2022 roku w czasopismach o wysokich współczynnikach oddziaływania. Łączny impact factor 12.524 (pkt MNiSW= 280). Opublikowanie badań w takich czasopismach niewątpliwie potwierdza ich interesującą tematykę, prawidłowe zaplanowanie i przeprowadzenie, jak również właściwą interpretację uzyskanych wyników. Ważną częścią pracy jest praca przeglądowa, w której Autor przedstawił dowody i potencjalne znaczenie terapeutyczne zależności między układami (endo)kannabinoidowymi i renina-angiotensyna, zwracając szczególną uwagę na ich konsekwencje terapeutyczne. Na podkreślenie zasługuje omówienie roli fitokannabinoidów jako terapii adiuwantowej przeciwko COVID-19, podejmując aktualne wyzwanie wobec zagrożenia epidemiologicznego. Praca napisana jest poprawnym i zrozumiałym językiem, od strony formalnej nie wzbudza zastrzeżeń. Rysunki są wykonane starannie i właściwie opisane, a powoływanie się na źródła jest prawidłowe. Układ rozprawy jest logiczny i przejrzysty. Projekt badawczy został zrealizowany w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem wybitnego eksperta prof. dr hab. Barbary Malinowskiej, która od szeregu lat konsekwentnie prowadzi badania w zakresie fizjologii i farmakologii układu krążenia, a w centrum Jej zainteresowań naukowych znajdują się receptory kanabinoidowe i ich działanie, w tym molekularno-biologiczna i farmakologiczna charakterystyka receptorów kanabinoidowych, w szczególności neurochemicznych i molekularnych podstaw oddziaływania kanabinoidów na mózg. Badania prof. Malinowskiej mają duże znaczenie dla wyjaśnienia zaburzeń funkcjonowania układu nerwowego, dysponuje Ona doświadczeniem i znaczącym dorobkiem naukowym w zakresie tematyki ocenianej

rozprawy doktorskiej, Doktorantowi zapewniona została bardzo dobra opieka w ramach wykonywanej pracy. Ponadto jednostka naukowa stworzyła znakomite warunki do przeprowadzenia zaplanowanych prac badawczych.

### **Formalny opis rozprawy**

Przedstawiona mi do recenzji praca liczy łącznie 109 stron i 6 rycin (Rozdziały 1-8), a piśmiennictwo składa się z 73 pozycji, aktualnych i dobranych w umiejętny sposób. Rozprawa zawiera *Wykaz publikacji* będących podstawą rozprawy doktorskiej, *Wykaz stosowanych skrótów*, *Wprowadzenie*, *Cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej*, opis *Realizacji celów naukowych*, *materiały i metody badawcze*, *podsumowanie wyników badań i dyskusję*, *Wnioski*, *Piśmiennictwo oraz Streszczenia w j. polskim i angielskim*. Badania opisane w dysertacji zostały sfinansowane dotacji SUB/2/DN/22/004/2213 oraz nr SUB/2/DN/21/004/2213 (wyniki przedstawione w rozdziale 9) oraz nr SUB/2/DN/22/002/2213 (wyniki przedstawione w rozdziale 10), których kierownikiem był Doktorant i/lub prof. Barbara Malinowska. Pan mgr inż. Mińczuk jest pierwszym autorem w obu publikacjach, a pozostali współautorzy złożyli oświadczenia potwierdzające Jego istotny udział w opracowaniu koncepcji badań, ich realizacji oraz przygotowaniu prac do druku, na podstawie ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.).

### **Ocena merytoryczna rozprawy**

W dobrze zredagowanych rozdziałach *Wprowadzenia* Autor omawia zagadnienia, które uzasadniają wybór tematu badań. Przedstawia informacje dotyczące kanabinoidów i układu endokannabinoidowego, układu renina-angiotensyna, roli PVN w regulacji ciśnienia tętniczego. *Wprowadzenie* jest napisane w sposób niezwykle przemyślany, z uwzględnieniem najnowszych wyników badań innych autorów. Tekst *Wprowadzenia* dobrze ilustrują dwie ryciny.

Doktorant następnie przedstawia trzy (3) główne cele swojej dysertacji tj. 1) zbadanie potencjalnej interakcji w PVN szczurów czuwających pomiędzy receptorami CB1 a receptorami AT1 i AT2 dla Ang II i receptorami Mas dla Ang 1–7; 2) zbadanie wpływu nadciśnienia pierwotnego na efekt presyjny stymulowany pobudzeniem receptorów w PVN AT1 i AT2 dla Ang II, Mas dla Ang 1–7 i kanabinoidowych CB1; 3) określenie mechanizmów interakcji pomiędzy ECS i RAS oraz ich potencjalnego znaczenia terapeutycznego na podstawie dostępnej literatury. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej lub Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach. Wszystkie badania Doktorant przeprowadził powszechnie uznanymi metodami, według obowiązujących na świecie standardów. Metody statystyczne zostały dobrane właściwie do projektu badania i charakterystyk badanych grup i nie budzą wątpliwości. Pragnę zwrócić uwagę na dużą dokładność i staranność opisu przeprowadzonych doświadczeń.

Doświadczenia przeprowadzone przez Pana mgr inż. Mińczuka przyniosły szereg wyników, które mają istotną wartość merytoryczną, a co więcej, część z nich ma charakter nowatorski. Bardzo ważnym wynikiem badań, o potencjalnym znaczeniu praktycznym jest stwierdzenie, że mikroiniekcja Ang II, Ang 1-7 i CP55940 (po dożylnym podaniu antagonisty receptora CB1 AM251) do PVN wywołała reakcje presyjne u czuwających szczurów za pośrednictwem receptorów AT1/2, Mas i CB1, oraz że odpowiedzi presyjne były silniejsze u szczurów z samoistnym nadciśnieniem (SHR) niż u szczurów WKY. W oparciu o uzyskane wyniki Doktorant postuluje, że silniejszy efekt presyjny w SHR może częściowo wynikać z wyższej (AT1 i CB1) i niższej (AT2 i Mas) ekspresji receptora w PVN, RVLM i NTS w porównaniu z WKY. Autor opierając się przede wszystkim na własnych nowatorskich badaniach wykazał również wzajemną interakcję między receptorami kanabinoidowymi CB1 a receptorami Ang II i Ang 1-7 odpowiedzialnymi za stymulację odpowiedzi presyjnej w PVN. Te postulowane i interesujące rozwiązania terapeutyczne powinny zostać wyjaśnione w kolejnych badaniach a mechanizm współdziałania receptorów CB1 i AT1 powinien być brany pod uwagę dla planowanych celów terapeutycznych.

*Wyniki* przeprowadzonych badań zaprezentowano w sposób przejrzysty, z odpowiednimi odniesieniami do opublikowanych już prac ułatwiających zapoznanie się z dysertacją. Przedstawione wyniki są bardzo wartościowe i istotne także z punktu widzenia klinicznego. Otrzymane wyniki uzupełniają aktualną wiedzę, która wciąż jest bardzo ograniczona, jeśli chodzi o właściwe zrozumienie *i)* roli receptorów AT1/2, Mas i CB1 w regulacji ciśnienia krwi u czuwających szczurów, *ii)* interakcji pomiędzy receptorami kanabinoidowymi CB1 a receptorami dla Ang II i Ang 1-7, odpowiedzialnymi za stymulację odpowiedzi presyjnej i jej terapeutycznym znaczeniu. Doktorant w sposób wyczerpujący i wnikliwy omawia oraz poddaje analizie uzyskane wyniki z danymi zawartymi w aktualnym piśmiennictwie. Nie zapomina także (co niezwykle ważne!) o prezentacji słabych stron badania. Przedstawiona dyskusja świadczy o dużej dojrzałości naukowego badacza, Jego wiedzy ogólnej i co ważne zdolności do krytycznej oceny uzyskanych wyników.

Ważne i niezwykle pomocne jest także umiejętne zestawienie uzyskanych wyników, w *Podsumowaniu* i *Wnioskach końcowych*, które stanowią odpowiedź na cele i założenia pracy doktorskiej.

W dobrze napisanej *Dyskusji* (zbiorczo w Rozdziale 5) Autor odnosząc się do dostępnego piśmiennictwa analizuje uzyskany materiał doświadczalny. Przedstawia wyniki, które jednoznacznie wskazują na interakcję pomiędzy układem angiotensynowym i (endo)kanabinoidowym w PVN zaangażowanymi w regulację układu krążenia. Autor wykazał również, że u zwierząt z nadciśnieniem spontanicznym odpowiedź presyjną indukowana pobudzeniem AT1R, AT2R oraz MasR jest silniejsza niż w normotensji, co prawdopodobnie wynika z odmiennego wzrostu gęstości receptorów angiotensynowych i kanabinoidowych w jądrach mózgu kluczowych do regulacji układu krążenia.

**Moim obowiązkiem jako recenzenta była ocena nie tylko aspektów merytorycznych, ale i interpretacyjnych dysertacji mgr inż. Krzysztof Mińczuka, tak więc z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na kilka aspektów interpretacji wyników.**

1. Angiotensyna 1-7 jest powszechnie znana jako związek obniżający ciśnienie krwi, a w pracy doktorskiej badany jest jej efekt presyjny. Proszę o wyjaśnienie powyższej rozbieżności.
2. Antagonista receptorów kannabinoidowych CB1 rimonabant był swego czasu stosowany w otyłości. Czy w oparciu o uzyskane w niniejszej pracy wyniki można przewidzieć wpływ rimonabantu na ciśnienie krwi?

Pragnę jeszcze raz pogratulować Doktorantowi i Pani Promotor niniejszej pracy, podkreślając, że wszystkie powyższe uwagi w żaden sposób nie umniejszają bardzo wysokiej oceny niniejszej dysertacji.

### **Ocena końcowa**

Podsumowując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Doktoranta, który wyśmienicie opanował wymagający warsztat badawczy. Przedstawiona mi do recenzji praca stanowi w pełni samodzielne i logiczne rozwiązanie dobrze sformułowanego i bardzo interesującego problemu badawczego. Warto w tym miejscu ponownie podkreślić innowacyjność badania, a także znaczenie tej pracy dla potencjalnej interakcji farmakodynamicznej lub farmakokinetycznej pomiędzy receptorami AT1/AT2 dla Ang II, Mas dla Ang 1-7 oraz CB1 dla (endo)kannabinoidów. Badania przeprowadzono przy zastosowaniu powszechnie uznanych metod. Wyniki zanalizowano stosując właściwie dobrane metody statystyczne, a następnie przeprowadzono wnikliwą dyskusję w świetle najnowszej literatury przedmiotu.

Przedłożoną mi do recenzji rozprawę doktorską pt. *„Interakcja pomiędzy zaangażowanymi w odpowiedź presyjną receptorami kannabinoidowymi CB1 i angiotensynowymi w jądrze przykomorowym podwzgórza czuwających szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i normotensyjnym”* oceniam pozytywnie oraz rekomenduję Senatowi 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 zwracając uwagę na innowacyjność rozprawy, znaczenie poruszanego tematu oraz na dużą wartość translacyjną uzyskanych wyników, rekomenduję wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Dysertacja spełnia wymogi Regulaminu Wyróżniania Rozpraw Doktorskich na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku (łączny IF = 12.524).

Kierownik  
Zakładu Neurochemii  
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk  
Prof. dy. hab. Katarzyna Starowicz-Bubak