

Kraków, 31 października 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 farm. Patryka Remiszewskiego na temat
„Evaluation of the potential therapeutic significance of chronically administered cannabinoids in
experimental models of arterial and pulmonary hypertension in rats”
przygotowanej na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Malinowskiej.**

Podstawę formalną do wykonania recenzji stanowi Uchwała Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 29 września 2022 roku oraz pismo Dziekana Kolegium Nauk Farmaceutycznych prof. dr hab. Wojciecha Miltyka z dnia 30 września 2022 roku.

Nadciśnienie uznano za jedną z trzech najczęściej występujących chorób cywilizacyjnych. Jest główną przyczyną przedwczesnych zgonów wśród dorosłych, chociaż nie zawsze bezpośrednią. Szacuje się, iż w Polsce na nadciśnienie tętnicze choruje ponad 10 mln dorosłych i jest ono jednym z głównych przyczyn przedwczesnych zgonów. Nadciśnienie tętnicze to choroba, która nie boli, nie zakłóca normalnego życia, jest tak powszechna, że nie budzi powszechnego niepokoju. Ta pozorna „łagodność” nadciśnienia jest jedną z przyczyn obserwowanej epidemii jego rozwoju. Innym schorzeniem również związanym z podwyższonym ciśnieniem jest nadciśnienie płucne, czyli dolegliwość chorobowa, której istotą jest wzrost ciśnienia krwi w tętnicy płucnej i jej licznych rozgałęzieniach. Za przyczynę tej dolegliwości uważa się między innymi lewokomorową niewydolność serca oraz przewlekłą zatorowość płucną. Pogłębienie wiedzy w obu wieloczynnikowych schorzeniach związanych z podwyższonym ciśnieniem jest kluczowe w celu poprawy metod prewencji oraz leczenia nadciśnienia tętniczego oraz jego powikłań.

Praca doktorska mgr farm. Patryka Remiszewskiego dotyczy określenia roli kanabinoidów w czynności układu krążenia. W obliczu złożonych i niejednoznacznych mechanizmów działania anandamidu (AEA), jednego z najlepiej scharakteryzowanych endogennych kanabinoidów, na układ sercowo-naczyniowy zasadne są dalsze badania określające rolę systemu endokanabinoidowego w regulowaniu pracy całego układu krążenia. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska doskonale wpisuje się w ten nurt zagadnień, a pogłębienie wiedzy w tym zakresie wydaje się kluczowe w kierunku poprawy metod leczenia nadciśnienia tętniczego oraz jego powikłań. Praca doktorska finansowana była z trzech (3)



grantów w tym jeden był kierowany przez doktoranta z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, a jeden OPUS NCN kierowany przez Promotora.

Celem pracy była ocena wpływu przewlekle podawanych: (1) kanabidiolu (CBD) w pierwotnym i wtórnym nadciśnieniu tętniczym oraz (2) obwodowego antagonisty receptorów kanabinoidowych CB1, JD5037, samego lub w połączeniu z aktywatorem AMPK, metforminą, w nadciśnieniu płucnym.

Przedłożona mi do oceny praca doktorska autorstwa mgr farm. Patryka Remiszewskiego ma formę spójnego tematycznie zbioru składającego się z jednej (1) pracy przeglądowej i dwóch (2) oryginalnych artykułów naukowych prezentujących wyniki doświadczeń, które opublikowano w języku angielskim w indeksowanych czasopismach naukowych o bardzo dobrej renomie. Artykuły ukazały się w czasopismach, których wspólny wskaźnik oddziaływania (tzw. impact factor) wynosi 17.127 a punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki to 340. Jednak najważniejsza jest poruszana w publikacjach tematyka, która stanowi spójny nurt badań podejmujących próbę wskazania nowych kierunków leczenia nadciśnienia tętniczego. Powyższa tematyka jest nowatorska i oryginalna w wymiarze międzynarodowym. Ma wysoką wartość naukową i potencjalnie dużą przydatność kliniczną. Należy stwierdzić, że Autor podjął niezwykle istotny temat zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia.

Reasumując, cele rozprawy są nowatorskie, uzasadnione naukowo, prawidłowo sformułowane i dotyczą zagadnienia o ważnym znaczeniu poznawczym i potencjalnym znaczeniu klinicznym.

Wspomniane prace zostały wykonane w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w zespole prof. Barbary Malinowskiej, zespole o uznanej pozycji i specjalizującym się w patofizjologii układu krążenia.

We wszystkich opublikowanych pracach Doktorant jest pierwszym autorem co jednoznacznie wskazuje na Jego wiodący udział w powstaniu tych prac. Zbiór prezentowanych publikacji jest poprzedzony streszczeniem w języku polskim i angielskim, obszernym 14 stronicowym autoreferatem (strony 8-22), napisanym w języku angielskim, po którym następuje 3 stronicowy spis 41 pozycji piśmiennictwa. Piśmiennictwo jest adekwatne i świadczy o umiejętności selekcjonowania istotnych informacji związanych z podjętym tematem badań. Umieszczone pozycje piśmiennictwa są aktualne i znajdują się w bazach czasopism naukowych. Powstało więc dzieło w pełni kompletne. W związku z powyższym przedstawiona do recenzji praca spełnia warunki formalne stawiane rozprawom doktorskim. W mojej ocenie na uwagę zasługuje fakt, iż choć prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej napisane są po angielsku to rozprawa zawiera też część podsumowującą założenia i główne osiągnięcia pracy doktorskiej, która napisana jest w języku polskim (strony 28-29). Dzięki temu zabiegowi Doktorant miał możliwość doskonalenia prawidłowego prowadzenia wywodu naukowego w języku ojczystym i opanowania polskiego nazewnictwa.



Omówienie autoreferatu przedstawiającego publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej

Streszczenie nie jest nadmiernie rozbudowane, co stanowi zaletę, ponieważ zawiera ono jedynie najistotniejsze informacje. Następnie we Wstępie Doktorant charakteryzuje problem, którego dotyczy rozprawa. W sposób zwięzły a jednocześnie bardzo profesjonalny omawia nadciśnienie tętnicze oraz nadciśnienie płucne, charakteryzuje doświadczalne modele obu schorzeń. Rozdział ten daje szeroką panoramę etiologii, opisuje rolę kanabinoidów i układu endokannabinoidowego w obu patologiach. W sposób zwięzły, ale wyczerpujący przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą patogenezы chorób układu sercowo-naczyniowego oraz prezentuje dostępne metody leczenia i wynikające z nich ograniczenia. Co więcej Doktorant wskazuje nowe kierunki badań w farmakoterapii chorób układu sercowo-naczyniowego, co w bezpośredni sposób wprowadza czytelnika w główne zagadnienia badawcze niniejszej dysertacji tj. 1) roli układu kanabinoidowego i przewlekłych podań fitokannabinoidu, CBD u szczurów z pierwotnym i wtórnym nadciśnieniem i wpływem CBD na układ redoks, układ endokannabinoidowy oraz poziomy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (*ang. polyunsaturated fatty acids*, PUFA) w sercu i osoczu szczurów; 2) wpływu monoterapii oraz skojarzonego podawania obwodowego antagonisty receptora CB1, (JD5037) i aktywatora AMPK (metforminy) w eksperymentalnym modelu nadciśnienia płucnego; 3) wpływ przewlekłego podawania (endo)kannabinoidów na ciśnienie tętnicze w różnych modelach nadciśnienia systemowego i płucnego skonfrontowany z najnowszą literaturą tematu. Lektura tej części rozprawy wskazuje jednoznacznie, że Doktorant posiada dogłębną i aktualną wiedzę w poruszonym temacie.

W kolejnym rozdziale Doktorant określa główne cel pracy (rozdział 4, strony 12-13). Sposób realizacji wszystkich zaplanowanych badań opisany jest szczegółowo w publikacjach (nr 1 i 2) a skrótowo przedstawiony czytelnikowi w rozdziale 5 (strony 14-17).

Praca przeglądowa „*Why Multitarget Vasodilatory (Endo)cannabinoids Are Not Effective as Antihypertensive Compounds after Chronic Administration: Comparison of Their Effects on Systemic and Pulmonary Hypertension*” (rozdział 9) stanowi wartościowe wprowadzenie dla problemów badawczych podjętych w publikacjach oryginalnych (rozdziały 10 i 11). Wyniki badań eksperymentalnych zostały zwięzłe omówione w autoreferacie (rozdział 5 i 6).

Badania z zastosowaniem przewlekłych podań CBD pozwoliły określić jego rolę (a właściwie brak działania) w nadciśnieniu tętniczym. W dobie coraz większej liczby badań opisujących korzyści ze stosowania CBD, które wraz ze wzrostem zainteresowania opinii publicznej tą substancją, można określić „*Hope or hope?*” konieczne jest określenie działania wielokrotnych podań CBD (w przeciwieństwie do licznych badań z pojedynczymi podaniami CBD sugerującymi efektowne działanie terapeutyczne np. w badaniu Jadoon i wsp. 2017 [*Jadoon KA, Tan GD, O’Sullivan SE. A single dose of cannabidiol reduces blood pressure in healthy volunteers in a randomized crossover study. JCI insight, 2017; 2(12)*]). Doktorant w rzetelny sposób nie wykazał wpływu 14-dniowego przewlekłego podawania CBD na ciśnienie krwi, tętno czy masę ciała. W modelu eksperymentalnym zaobserwował jednak zmiany innych parametrów: u zwierząt z nadciśnieniem fitokannabinoid CBD zmniejszył



aktywność hydrolazy amidowej kwasów tłuszczowych (FAAH), peroksydację lipidów i obniżył, zależnie od modelu, poziomy endokannabinoidów o właściwościach rozszerzających naczynia krwionośne. W normotensji, odwrotnie, zwiększał on peroksydację lipidów i aktywował FAAH.

Za istotny wynik dysertacji uważam również obserwację porównującą skuteczność monoterapii w leczeniu zmian sercowo-płucnych wywoływanych przez nadciśnienie płucne do terapii skojarzonej celującej w układ endokannabinoidowy w połączeniu z hipotensyjnym wpływem metforminy (szeroko stosowanym lekiem przeciwcukrzycowym). Doktorant wykazał, że w modelu nadciśnienia płucnego monoterapia z użyciem JD5037 spowodowała częściowe odwrócenie zmian zwłóknieniowych/zapalnych w tkance serca. Sama metformina wykazywała podobną aktywność, ale dodatkowo obniżała ciśnienie prawokomorowe w sercu (RVSP) i zwiększała wysycenie krwi tlenem. Najsilniejszą aktywności (a zarazem najkorzystniejszą terapeutycznie) Autor zaobserwował, gdy JD5037 podawany był w połączeniu z metforminą. Przewlekła terapia (21-dniowa) skojarzona obniżała RVSP, przerost prawej komory i zwiększała saturację krwi. Wykazywała również tendencję do zmniejszania grubości naczyń płucnych. Obserwacja z przeprowadzonych badań znajduje wytłumaczenie w dokonanym przez Autora dogłębnym przeglądzie literatury świadczącym o różnicach w działaniu (endo)kannabinoidów w oparciu o ich specyficzność związaną z punktami uchwytu. Przedstawione badania są zbieżne z tezą, że związki o wielu punktach uchwytu (tzw. multitarget) nie są skuteczne jako leki przeciwcisnieniowe w leczeniu nadciśnienia tętniczego, ponieważ indukują odpowiedzi prowadzące zarówno do obniżenia, jak i wzrostu ciśnienia krwi, podczas gdy w nadciśnieniu tętniczym skuteczność wykazują zarówno (endo)kannabinoidy o wielu, jak i o pojedynczych i/lub sprecyzowanych (tzn. monotarget) mechanizmach działania.

Po przeanalizowaniu przedłożonej mi do recenzji rozprawy doktorskiej nasuwają się następujące kwestie/pytania:

1) W swojej pracy Doktorant starał się wykazać korzystniejsze działanie łącznego stosowania antagonisty obwodowych receptorów CB1 i aktywatora AMPK. Czy znane są inne sugerowane połączenia związków działających na układ kanabinoidowy i inne (jakie?) układy?

2) W publikacji przedstawionej w rozdziale 10. CBD nie obniżał ciśnienia krwi, gdyż, jak sugeruje Doktorant, związek ten działał na przeciwstawne punkty uchwytu. Biorąc pod uwagę szerokie potencjalne znaczenie terapeutyczne tego związku, czy takie wzajemnie znoszące się działanie opisano jeszcze przy innym jego terapeutycznym wskazaniu?

3) Najnowsze badania Golosova i wsp., 2022 [*Golosova D, Levchenko V, Kravtsova O et al. Acute and long-term effects of cannabinoids on hypertension and kidney injury. Sci Rep 12, 6080 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09902-6>*] wskazują, że przedłużona stymulacja receptorów kanabinoidowych może skutkować zaostreniem nadciśnienia i uszkodzeniem nerek. Czy Doktorant może skonfrontować wyniki własne (obejmujące fitokannabinoidy) z wynikami badań w/w autorów (ukierunkowane na endogenny układ kanabinoidowy) szczególnie w odniesieniu do możliwych



efektów CBD (i AEA) na regulatory szlaku wewnątrzkomórkowego?

Uwagi końcowe

Zaletą tej pracy doktorskiej jest jej spójność, wynikająca z bardzo dobrze zaplanowanych, konsekwentnie zrealizowanych celów badawczych. Rezultaty tej pracy wnoszą wiele nowych i wartościowych wyników, które zwięźle i rzeczowo skomentowane zostały przez Autora w Autoreferacie i trzech najistotniejszych wnioskach (strona 22).

Została mi przedstawiona do recenzji dobrze wykonana praca o istotnym znaczeniu poznawczym, jej wyniki przyniosły odpowiedzi na wiele ważnych pytań jak również ukazały szereg nowych problemów wyznaczających zarazem kierunki, w które należy zmierzać dążąc do ich rozwiązania w przyszłości. Autor zaplanował i zrealizował wszelkie badania laboratoryjne i biologiczne, które pozwoliły Mu zrealizować założone cele pracy. Doktorant wykazał się bardzo dobrym opanowaniem warsztatu badawczego i umiejętnością prowadzenia badań naukowych, stosowną wiedzą doświadczalną i kliniczną na temat zagadnień będących przedmiotem rozprawy oraz umiejętnością krytycznej analizy danych i logicznego formułowania wniosków. Wykazał także, że jest dobrze przygotowany do prowadzenia pracy naukowej zarówno od strony teoretycznej jak i stosowania nowoczesnych metod badawczych. Rozprawa jest napisana zwięźle i logicznie. Ma bardzo staranną formę graficzną i edytorską.

Dokonując krytycznej oceny dysertacji nie zgłaszam zastrzeżeń merytorycznych, które mogły wpłynąć na uzyskane wyniki badań. W podsumowaniu należy stwierdzić, że niniejsza rozprawa doktorska jest oryginalnym osiągnięciem Autora i stanowi istotny wkład do naukowej dyskusji na temat wskazania biologicznie aktywnych nowych leków działających w obrębie układu sercowo-naczyniowego.

W mojej opinii niniejsza praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wskazuje, że Autor posiada umiejętność samodzielnej pracy naukowej.

Przedłożoną mi do recenzji rozprawę doktorską pt. „*Evaluation of the potential therapeutic significance of chronically administered cannabinoids in experimental models of arterial and pulmonary hypertension in rats*” oceniam pozytywnie oraz rekomenduję Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku nadanie Panu mgr farm. Patrykowi Remiszewskiemu stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Dodatkowo ze względu na unikalny i nowatorski charakter pracy oraz fakt, że spełnia ona wymogi Regulaminu Wyróżniania Rozpraw Doktorskich na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku (łączny IF 17.127) wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.