



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Farmakodynamiki

Prof. dr hab. Magdalena Bujalska-Zadrozny
Zakład Farmakodynamiki
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1b
02-097 Warszawa

Warszawa, 17.08.2020r.

RECENZJA

Rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk farmaceutycznych Pana mgr Rafała Kossakowskiego pt. „Wpływ kannabidiolu na układ krążenia uśpionych szczurów normotensyjnych i ze spontanicznym nadciśnieniem” wykonanej w Zakładzie Fiziologii i Patofiziologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego W Białymstoku, pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. n. med. Barbary Malinowskiej.

Już ponad 4 tysiące lat temu w medycynie chińskiej kanabinoidy znajdujące się w konopiach były wykorzystywane w leczeniu wielu dolegliwości, w tym łagodzeniu bólu oraz lęku. Na początku XX wieku najpierw w Stanach Zjednoczonych a następnie w Europie zaczęto stopniowo zabraniać stosowania tych roślin, w końcu traktując je jako zwalczany prawnie narkotyk. W ostatnich latach Światowa Organizacja Zdrowia zmieniła stanowisko w sprawie leczniczej marihuany. Obecnie kannabinoidy są intensywnie badane przez naukowców w wielu zastosowaniach. Wciąż odkrywane są ich nowe potencjalne właściwości lecznicze. Niestety nie ma zbyt wielu badań klinicznych, które potwierdziłyby skuteczność i bezpieczeństwo tych związków u ludzi.

W lecznictwie wykorzystuje się tzw. medyczną marihuanę, która zawiera różne stężenia tetrahydrokannabinolu (THC). Niestety ośrodkowe działanie psychoaktywne tego związku często ogranicza jego stosowanie. W ostatnich latach uwagę zwrócił inny fitokannabinoid, zwany kanabidiolem (CBD), który jest pozbawiony działania psychoaktywnego. Co więcej, nawet ostre podanie CBD wydaje się nie wiązać z istotną toksycznością dla organizmu ludzkiego. Badania wskazują, że CBD posiada szereg cennych z punktu widzenia terapeutycznego działań w tym przeciwlękowe, przeciwzapalne i przeciwutleniające, przeciwdrgawkowe, zmniejszające spastyczność mięśni, oraz neuroprotektoryjne.

Z uwagi na coraz większe rozpowszechnienie dostępnych bez recepty olejków/olejów konopnych zawierających CBD, reklamowanych na wyrost jako skuteczne niemal na wszystko, istnieje konieczność dalszego badania kannabinoidów nie tylko ze względu na ich potencjalne działanie lecznicze, ale i bezpieczeństwo stosowania.

W ten nurt badawczy wpisuje się praca doktorska pana Rafała Kossakowskiego, w której Autor podjął się zbadania wpływu kannabidiolu (CBD) na układ krążenia. W świetle braku badań działania tego fitokannabinoidu w nadciśnieniu oraz niespójności danych dotyczących wpływu CBD na parametry krążenia u zdrowych osobników (zarówno zwierząt jak i ludzi) uważam prezentowane podejście badawcze za ważne i aktualne.

Co więcej, z uwagi na nasilającą się modę na stosowanie niepsychoaktywnych kannabinoidów (w tym CBD) w różnych stanach patologicznych, oddziaływanie CBD na układ krążenia a zwłaszcza jego wpływ na ciśnienie tętnicze krwi jest zagadnieniem istotnym także z punktu bezpieczeństwa stosowania tej substancji.

Rozprawa doktorska pana Rafała Kossakowskiego obejmuje 96 stron maszynopisu proporcjonalnie podzielonych na część teoretyczną i doświadczalną, w której zachowane są tradycyjne elementy opisu gwarantujące łatwy dostęp do pożądanych informacji. Maszynopis pracy jest zaopatrzony w sumie aż w 24 ułatwiające rozumienie tekstu ilustracje (w tym 16 rycin ilustrujących wyniki), a także 5 tabel, z czego 3 przedstawiają wyniki badań wykonanych przez Autora.

Wstęp Doktorant poświęcił przede wszystkim szeroko pojętym zagadnieniom związanym z kannabinoidami zarówno pochodzenia naturalnego (fitokannabinoidy) oraz syntetycznego. Autor skupił się zwłaszcza na kannabidiolu (CBD), analizując dostępne w piśmiennictwie dane dotyczące mechanizmu jego działania, aktywności biologicznej i potencjalnym działaniom niepożądanym.

Doktorant poddał szczegółowej analizie także wpływ kannabidiolu na układ krążenia u ludzi, zwierząt doświadczalnych, jego modulujący wpływ na różne odpowiedzi układu krążenia, naczynia krwionośne oraz wpływowi nadciśnienia tętniczego na układ endokannabinoidowy. Omówił także podstawy fizjologiczne i znaczenie odruchu Bezolda-Jarisha, który z uwagi na jego powiązanie z aktywnością receptorów TRPV1 i 5-HT₃ jest dobrym narzędziem naukowym do oceny aktywności farmakodynamicznej ligandów tych receptorów - a zatem także kannabidiolu - w modelach zwierzęcych. Wstęp świetnie koresponduje z założeniami pracy. Niepotrzebny (choć ciekawy) wydaje się jedynie oddzielny rozdział poświęcony kannabidiolowi w epilepsji.

We wstępie szczególnie interesujące są rozdziały dotyczące działania CBD na układ krążenia u szczurów. Autor dokonał analizy dostępnych danych wskazując, że w piśmiennictwie brak jednoznacznych wyników odnośnie wpływu CBD na układ krążenia u zwierząt. Interesujący wydaje się fakt, że w niektórych badaniach przewlekłe podawanie CBD wykazywało efekt kardioprotekcyjny oraz działanie rozszerzające naczynia krwionośne.

Co więcej, chociaż potrzeba więcej badań, aby stwierdzić to na pewno, CBD najprawdopodobniej może być przydatny w obniżaniu ciśnienia krwi i tętna podwyższonego pod wpływem stresu. Jednak nadal nie ma wystarczających dowodów na to, że CBD zapewnia podobne efekty w warunkach pozastresowych.

Na stronie 34 do opisu dziejów odkrycia odruchu Bezolda-Jarisha przez Bezolda i Hirta wkradł się błąd, mianowicie Bezold i Hirt nie mogli przyjąć założenia o depresyjnym wpływie weratryny na „ośrodek naczynioruchowy”, ponieważ ośrodek ten został dokładnie zlokalizowany i opisany przez rosyjskiego badacza Filippa Wasiljewicza Owsjannikowa dopiero cztery lata później, w 1871 roku.

Opracowanie części teoretycznej rozprawy stanowi logiczny ciąg uzupełniających się informacji z podkreśleniem występujących w nim elementów nowości. Doktorant wykazał umiejętność krytycznego korzystania z piśmiennictwa naukowego, zdolność selekcji i właściwej segregacji danych w odniesieniu do podjętego tematu, jak również zwięzłości opisu. Świadczy to o bardzo dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktoranta do rozwiązania podjętego zadania badawczego.

Cel pracy, którym była ocena wpływu kannabidiolu na podstawowe parametry układu krążenia (w szczególności SBP - ciśnienie krwi skurczowe, DBP - ciśnienie krwi rozkurczowe oraz częstość pracy serca - HR) uśpionych szczurów z nadciśnieniem (SHR) i normotensyjnych (WKY) oraz na zachodzący za pośrednictwem receptorów wanilloidowych TRPV1 i serotoninowych 5-HT₃ odruch Bezolda-Jarisha jest poprawnie sformułowany.

Warto zwrócić uwagę, że do tej pory brak badań dotyczących wpływu CBD na układ krążenia w nadciśnieniu tętniczym.

Metodyka: Do badań Doktorant wykorzystał samce szczurów z nadciśnieniem spontanicznym (SHR) oraz szczury normotensyjne WKY. Szczury SHR stanowią popularny model nadciśnienia pierwotnego stosowany w farmakologii doświadczalnej zaś szczury WKY są wykorzystywane jako kontrola normotensyjna dla szczurów z nadciśnieniem.

W celu realizacji założeń pracy Autor zaprojektował i przeprowadził badania eksperymentalne, które pozwoliły określić wpływ kannabidiolu na podstawowe parametry układu krążenia (ciśnienie tętnicze krwi skurczowe - SBP, ciśnienie tętnicze krwi rozkurczowe - DBP, częstość pracy serca - HR, dotyczy to CBD zarówno podawanego osobno jak i po uprzednim zablokowaniu kapsazepiną receptorów TRPV1) oraz na odruch Bezolda-Jarisha u szczurów uśpionych. Modulujący wpływ kannabidiolu na parametry układu krążenia oceniany był również w przypadku szczurów poddanych obustronnej wagoatomii.

W kolejnym eksperymencie Doktorant oceniał wpływ kannabidiolu na parametry układu krążenia u szczurów odrdzienionych oraz wpływ kannabidiolu na izolowane przedsionki. W jaki sposób te przedsionki rozciągano oraz jak mierzono siłę tego rozciągania (czyżby także za pomocą przetwornika izometrycznego użytego do pomiaru i rejestracji siły skurczów?); w opisie odnośnej metodyki w dziale 3.2.4. [str. 43] stwierdza się jedynie, że rozciągano je z siłą do 5 miliniutonów.

W części 3.3. „Wykaz odczynników” należałoby wyjaśnić, dlaczego kannabidiol użyty do doświadczeń *in vivo* pochodził z innego źródła niż ten wykorzystany w eksperymentach *in vitro* i czy miało to znaczenie dla przebiegu i wyników doświadczeń.

W recenzowanej pracy zabrakło działu/sekcji, w którym **w jednym miejscu** przedstawiono by w niedługi i spójny sposób zarys (organizację) **całego** postępowania doświadczalnego wraz z krótkim uzasadnieniem celowości przeprowadzonych eksperymentów. Jest to tym ważniejsze, że materia badanych zagadnień jest bardzo złożona. Przykładem może być uzasadnienie wykonania u części zwierząt odrdzienienia. Z punktu widzenia przejrzystości tekstu informacja taka powinna stanowić składnik postulowanej sekcji poświęconej organizacji i celowości eksperymentów a w ostateczności znaleźć się na początku sekcji 3.1.4. „Pomiar parametrów układu krążenia u szczurów odrdzienionych”. Tymczasem zawierające taki ładunek treściowy zdanie „Część doświadczeń wykonano na modelu szczura odrdzienionego, u którego OUN zniszczono mechanicznie za pośrednictwem metalowego pręta wprowadzonego do rdzenia kręgowego, umożliwiając ocenę aktywności obwodowej CBD z wykluczeniem ewentualnych wpływów ośrodkowych.” Doktorant zamieszcza dopiero w dyskusji na str. 65.

Obecny tekst skonstruowany z pominięciem proponowanej sekcji znacznie gorzej się czyta, ponieważ czytelnik musi składać sobie stopniowo w pamięci obraz wyłaniający się przy czytaniu kolejnych części pracy. Podobne zastrzeżenia można odnieść m.in. także do podawania dezypraminy oraz propranololu (objaśnione w dyskusji na str. 72 i 73) czy kapsazepiny (protokół eksperymentalny opisany na str. 40, ale stwierdzenie wprost po co ją podawano zawarto dopiero w dyskusji na str. 67).

W następnej części pracy („4. **Wyniki**”) Doktorant dokonał szczegółowej analizy wyników przeprowadzonych badań. Zostały one poddane analizie statystycznej, a następnie przedstawione w trzech tabelach i zilustrowane szesnastoma rycinami. Na stronach zawierających tabele 3 i 4 opuszczono numerację (powinno być 45 i 46).

W tej części pracy zwraca uwagę umiejętność przedstawiania przez Doktoranta uzyskanych wyników. W ramach tego w dziale 4.2.2. bardzo dokładnie przeprowadzono także analizę wpływu samego rozpuszczalnika CBD na parametry układu krążenia a w innych miejscach tekstu odniesiono się także do możliwego wpływu innych użytych rozpuszczalników na te parametry nie pozostawiając miejsca na wątpliwości, co świadczy o rzetelności pracy. Podobnie można się wyrazić np. o uwzględnieniu w dziale 4.2.3.1. faktu występowania różnic w zakresie bazalnych wartości HR, SBP i DBP w ten sposób, by nie zafałszowały one interpretacji wpływu samego CBD na te parametry.

Doktorant wykazał, że u szczurów uśpionych uretanem etylowym jednorazowe podanie kannabidiolu wywoływało zależny od dawki spadek HR, SBP i DPR, który był silniejszy u szczurów z

nadciśnieniem w porównaniu do szczurów normotensyjnych. Co interesujące, reakcja ta była niemal całkowicie zniesiona poprzez wcześniejsze podanie CBD, co może wskazywać na rozwój tachyfilaksji; to ostatnie zjawisko dotyczyło jednak głównie spadku HR (stymulowanej CBD odruchowej bradykardii) a nie ciśnienia krwi.

Z jednej strony, rozważając spadek ciśnienia u szczurów normotensyjnych jako działanie niepożądane CBD wykorzystywanego w leczeniu bólu, epilepsji czy spastyczności obserwację tę można uznać za mającą pozytywny wydźwięk (zmniejszenie działań niepożądanych), z drugiej strony zjawisko tachyfilaksji może w przyszłości ograniczyć wykorzystanie CBD jako potencjalnego środka w chorobach układu krążenia (np. jako środka kardioprotekcyjnego). Jaki jest zdanie Doktoranta na ten temat?

Moje zainteresowanie wzbudziło blokowanie przez CBD odruchu Bezolda-Jarisha stymulowanego w eksperymencie za pośrednictwem agonisty receptorów 5-HT₃ (fenylobiguanidu). Warto tu zwrócić uwagę, że serotonina odgrywa istotną rolę w regulacji układu sercowo-naczyniowego, zaś leki wpływające na układ serotonergiczny są powszechnie stosowane w terapii depresji, choroby Parkinsona, otyłości czy migren.

Jaki zatem wpływ mogłaby mieć obserwacja Doktoranta dotycząca działania CBD na odruch Bezolda-Jarisha? Czy w świetle dotychczasowej wiedzy a także wyników badań przeprowadzonych przez Doktoranta stosowanie CBD jako środka reklamowanego na wiele dolegliwości (co więcej sprzedawanego jako dodatek do żywności/suplement) może być niebezpieczne zwłaszcza u chorych stosujących leki antydepresyjne wpływające na układ serotoninowy, które stanowią obecnie większą część środków antydepresyjnych?

Przeprowadzenie doświadczeń na szczurach odrdzienionych pozwoliło ocenić czy działanie CBD na układ krążenia jest związane ze składową obwodową. Autor wykazał, że w tym układzie doświadczalnym CBD stymulował silny zależny od dawki wzrost HR i SBP, ale obniżał DBP. Reakcja ta nie była zależna od obustronnego wycięcia nadnerczy, zaś wzrost HR i SBP był silnie hamowany w obecności propranololu, z kolei inhibitor wychwytu zwrotnego noradrenaliny – dezypramina zmniejszała stymulowane CBD przyrosty HR i SBP z jednoczesnym nasileniem spadków DBP (ale tylko przy najwyższej dawce dezypraminy). Dodatkowo w badaniu *in vitro* CBD zmniejszała siłę skurczu przedsionków serca.

W pierwszej części **dyskusji** Doktorant po przedstawieniu założeń wstępnych skupił się na przeanalizowaniu rozbieżności w wynikach badań dotyczących działania kanabidiolu na układ krążenia. Trafnie zauważył, że wywoływane przez kanabidiol przy kolejnym podaniu zjawisko tachyfilaksji, obserwowana w innych badaniach nieliniowa zależność efektu od dawki (opisywana tzw. krzywa dzwonowa zależności) oraz rozpuszczanie przez badaczy lipofilnego CBD w różnych rozpuszczalnikach mogą wpływać na rozbieżności w dostępnych w piśmiennictwie wynikach badań. Istotne wydają się przytoczone przez Autora prace, w których niskie dawki kanabidiolu (1mg/kg *i.v.*) nie wpływały na częstość pracy serca oraz ciśnienie tętnicze krwi, natomiast wysokie (25 i 50 mg/kg *i.v.*) powodowały istotny spadek wartości BP. Szkoda że Doktorant nie zdecydował się na podanie większej dawki CBD (być może udałoby się wykazać efekt pułapowy).

W dalszej części dyskusji Doktorant dokładnie przeanalizował całość uzyskanych wyników.

W dyskusji zwraca uwagę zdolność Doktoranta do wnikliwej i krytycznej analizy wyników oraz wnioskowania dotyczącego przyczyn obserwowanych zjawisk, a także szczegółowego uzasadniania przyjętych w pracy rozwiązań. Przykładem mogą być kolejne części dyskusji, w których podano uzasadnienie, dlaczego w badaniach wykorzystano tylko jedną konkretną dawkę kapsazepiny, dokładnie przeanalizowano możliwe przyczyny obserwowanych dysproporcji w zakresie otrzymywanej odpowiedzi układu krążenia pomiędzy szczurami normo- i hipertensyjnymi oraz potencjalne mechanizmy oddziaływania CBD na układ krążenia. W dalszej kolejności obszernie

przedyskutowano także wpływ CBD na odruch Bezolda-Jarisha, zarówno zachodzący za pośrednictwem receptorów wanilloidowych TRPV1 jak i serotoninowych 5-HT₃.

Dyskusję zamyka podsumowanie, w którym Autor wymienia główne ustalenia pracy. Dodatkowo Autor zwraca uwagę na te elementy wykonanych w ramach rozprawy doświadczeń, które stanowią nowość, tzn. nie zostały dotąd uwzględnione przez innych autorów. Są to: [1] wykorzystanie szczurów SHR, co pozwoliło na symulację działania CBD w warunkach nadciśnienia; [2] nowatorski sposób rozpuszczania CBD, umożliwiający jego podanie donaczyniowe, co z kolei umożliwiło ocenę krótkotrwałych działań krążeniowych związku oraz [3] wykorzystanie modelu zwierzęcia oddrdżenionego, co pozwoliło na zróżnicowanie ośrodkowych i obwodowych następstw działania CBD. Elementy te dodatkowo znacznie podnoszą wartość pracy; pozwoliły one zaobserwować wyraźne działania CBD na układ krążenia nie opisane wcześniej.

Dyskusja została przeprowadzona poprawnie i uwzględniono w niej wszystkie ważniejsze wątki pracy. Do nielicznych zauważonych w niej błędów należy pomylenie w pierwszym zdaniu na str. 70 jednostek charakteryzujących bradykardię i wpływ na BP – (podano milimetry Hg).

Kończąc rozważania związane dyskusją, można postawić otwarte pytanie, czy dalsze badania nad wpływem kannabidiolu na układ krążenia nie powinny zostać przeprowadzone także na innych modelach regulacji ciśnienia krwi.

Po zamknięciu dyskusji Doktorant sformułował (w rozdziale szóstym) cztery **wnioski** syntetycznie podsumowujące przeprowadzone badania. Wnioski te nie budzą zastrzeżeń i właściwie odzwierciedlają uzyskane wyniki.

Siódmy rozdział pracy („**Streszczenie** / summary”) obejmuje dwa następujące po sobie streszczenia – najpierw w języku polskim a potem angielskim, o objętości ponad jednej strony każde. Streszczenia te nie budzą zastrzeżeń.

Ósmy rozdział pracy stanowi **wykaz 95 użytych skrótów**. W rozdziale tym pojawiły się niewielkie nieścisłości – np. na str. 80 błędnie rozwiązano skrót BRCP jako „białko odporności raka piersi” (zamiast poprawnie białko oporności (...)/oporności lekowej (...)); na str. 81 błąd dotyczył skrótu MCA (od „middle cerebral artery”), który rozwiązano jako „okluzja środkowej tętnicy mózgowej” zamiast poprawnie „tętnica środkowa mózgu”.

Kolejny, dziewiąty rozdział rozprawy stanowi **wykaz piśmiennictwa**, który obejmuje 229 publikacji zagranicznych i krajowych. Przegląd listy piśmiennictwa wskazuje, że Doktorant dokonał dokładnego przeglądu prawdopodobnie ogromnej części dostępnych pozycji z zakresu wymaganego przez tematykę pracy. Świadczy o tym fakt, że cytowane piśmiennictwo od 2019 r. sięga wstecz aż do roku 1970.

Przypadkowo stwierdzono, że cytowana w tekście kilkakrotnie praca Toczek i Malinowska (2018) w ogóle nie znalazła się w wykazie piśmiennictwa.

Pozostałe uwagi. W pracy można znaleźć niewiele drobnych literówek i błędów interpunkcyjnych co nie umniejsza bardzo dobremu merytorycznemu przygotowaniu – np. na ryc. 10 (str. 48) w czterech wykresach w górnym rzędzie w opisie osi rzędnych (pionowej) zamiast poprawnie „uderzenia/min” trzykrotnie wpisano po angielsku „beats/min” a raz „uderzeń/min”. Troszkę rażą trzy razy obok siebie powtórzone „PORÓWNWALNE WAROŚCI” (zamiast „PORÓWNYWALNE WARTOŚCI”) w treści ryc. 13 na str. 51.

W tekście rozprawy znaleziono kilka błędów w zakresie nazewnictwa, np. Cannabis (konopie) to rodzaj botaniczny a nie, jak to napisano na str. 15 rodzina (wtedy byłoby: konopiowate = Cannabaceae).

Część teoretyczna jak i doświadczalna rozprawy świadczy o przygotowaniu teoretycznym i manualnym Doktoranta, umiejętności organizowania pracy badawczej, a także planowania i rozwiązywania zagadnień naukowych.

Pracę doktorską Pana mgr Rafała Kossakowskiego oceniam bardzo pozytywnie. Podkreślam, że podjęta przez Doktoranta próba oceny wpływu CBD na układ krążenia u szczurów z nadciśnieniem pierwotnym ma charakter nowatorski i kieruje uwagę naukowców na potencjalne wykorzystanie tego związku przynajmniej we wspomaganiu leczenia tej choroby. Na uwagę zasługują prawidłowo zaplanowane i wykonane badania oraz wysoki stopień ich złożoności i trudności w wykonaniu. Warto zwrócić uwagę, że część wyników rozprawy została opublikowana w czasopiśmie „Frontiers in Pharmacology” o współczynniku wpływu (IF) równym 4,225 a Doktorant jest pierwszym Autorem tej pracy.

Przedstawiając powyższą ocenę kieruję do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie Pana mgr Rafała Kossakowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**KIEROWNIK
Zakładu Farmakodynamiki**

Magdalena Bujalska-Zadrach
prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Magdalena Bujalska-Zadrach