



Warszawa, 28 grudnia 2022 r.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**mgr Jolanty Weresy****p.t. „Wpływ antagonistów receptorów kannabinoidowych na efekty pobudzenia receptorów β -adrenergicznych w mięśniach przedsionków serca człowieka i szczura”**wykonanej w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstokupod promotorską opieką **prof. dr hab. Barbary Malinowskiej**

Układ endokannabinoidowy (ECS) jest odpowiedzialny za regulację i homeostazę większości procesów zachodzących w ludzkim organizmie. Wpływa m.in. na łaknienie, sen, metabolizm, proces uczenia się, funkcje rozrodcze, odpowiedź immunologiczną, a także na wielu poziomach reguluje funkcje układu krążenia. ECS to złożony system obejmujący liczne elementy, w tym endogenne kannabinoidy (anandamid -AEA i 2-arachidonoyloglicerol - 2-AG), ich receptory (sprzężone z białkami G klasyczne receptory CB1 i CB2 oraz receptory sieroce GRP55 i GRP18, a także nienależące do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G receptory waniloidowe przejściowego potencjału typu 1 - TRPV1) oraz enzymy biorące udział w ich syntezie, degradacji i transporcie. Nie mniej skomplikowana jest sygnalizacja uruchamiana przez aktywację receptorów wrażliwych na kannabinoidy zachodząca z pośrednictwem kilku typów białek G (G_i/o , G_s , $G_{q11,12,13}$) i obejmująca aktywację licznych wtórnych przekazyńników i zależnych od nich wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych.

Wpływ układu ECS na układ krążenia jest złożony i odbywa się zarówno poprzez bezpośrednią aktywację receptorów kannabinoidowych zlokalizowanych obwodowo w naczyniach i tkance mięśnia sercowego, jaki i poprzez wpływ na aktywację komponenty współczulnej i przywspółczulnej ośrodkowego układu nerwowego za pośrednictwem centralnych i obwodowych receptorów kannabinoidowych zlokalizowanych odpowiednio w mózgu i na współczulnych i/lub przywspółczulnych włóknach nerwowych. Aktywacja tych receptorów reguluje uwalnianie neuroprzekazyńników z zakończeń włókien nerwowych w sercu i aktywację m. in. receptorów adrenergicznych kluczowych w regulacji częstości rytmu, siły skurczu oraz tempa rozkurczu. Dodatkowo pojawiło się kilka doniesień wskazujących na możliwość wzajemnej interakcji, w bliżej nieokreślonym mechanizmie, pomiędzy aktywacją receptorów kannabinoidowych i adrenergicznych w mięśniu sercowym. Wypadkowe skutki modulacji receptorów układu ECS jak i ich wpływ na

aktywację receptorów adrenergicznych są nadal słabo poznane, a potrzeba ich zrozumienia pilna w kontekście kilku ważnych aspektów: (1) coraz częstszego używania marihuany, i co gorsze, syntetycznych kannabinoidów o bardzo wysokim powinowactwie do receptorów kannabinoidowych, w celach rekreacyjnych i odurzających; (2) dopuszczenia do użycia kannabinoidów w celach terapeutycznych, takich jak leczenie przewlekłego bólu, skutków ubocznych chemioterapii, zaburzeń łaknienia oraz (3) prób zastosowania modulatorów receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2 w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych takich jak miażdżyca, ostre epizody niedokrwienne, niewydolność serca, czy nadciśnienie.

Mając powyższe na uwadze, Doktorantka jako cel nadrzędny swojej rozprawy doktorskiej obrała poszerzenie wiedzy o roli zlokalizowanych w mięśniu sercowym receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2 w regulacji siły skurczu i częstości rytmu oraz o potencjalnej interakcji pomiędzy receptorami kannabinoidowymi i β -adrenergicznymi w sercu szczura i człowieka w warunkach normo- i hipertensji. W celu realizacji tego celu zaplanowała trzy zadania szczegółowe. Były nimi: (1) zbadanie wpływu antagonistów receptorów CB1 i CB2 na zachodzące za pośrednictwem receptorów β -adrenergicznych kardiostymulujące działanie izoprenaliny w izolowanych przedsionkach serca szczura oraz określenie potencjalnego mechanizmu odpowiedzialnego za interakcję pomiędzy receptorami kannabinoidowymi i β -adrenergicznymi; (2) określenie, czy podobna interakcja pomiędzy receptorami kannabinoidowymi i β -adrenergicznymi występuje w izolowanych beleczkach mięśniowych z uszka prawego przedsionka serca człowieka oraz (3) zbadanie wpływu nadciśnienia pierwotnego na interakcję pomiędzy receptorami kannabinoidowymi i β -adrenergicznymi w doświadczeniach na izolowanych przedsionkach serca szczura z nadciśnieniem spontanicznym (SHR). Dodatkowym celem było (4) określenie na podstawie dostępnej literatury potencjalnych mechanizmów leżących u podstawy zawału mięśnia sercowego w wyniku jednorazowego zażycia marihuany lub syntetycznych kannabinoidów.

W świetle istotnych deficytów w rozumieniu działania układu ECS w mięśniu sercowym i jego oddziaływania na układ adrenergiczny cel rozprawy uważam za uzasadniony naukowo o ważnym znaczeniu poznawczym, a także o potencjalnym znaczeniu klinicznym związanym z możliwością opracowania w przyszłości bezpiecznych strategii leczniczych ukierunkowanych na układ kannabinoidowy w chorobach układu sercowo-naczyniowego, w tym w nadciśnieniu tętniczym. Duże znaczenie ma również potencjalny efekt społeczny uwrażliwiający na ryzyko stosowania marihuany a szczególnie kannabinomimetyków o dużym powinowactwie do receptorów CB1 w celach rekreacyjnych i odurzających.

Rozprawa doktorska Pani mgr Jolanty Weresy ma postać cyklu publikacji, na który składają się dwie prace oryginalne i jedna praca przeglądowa. Prace zostały opublikowane w latach 2019-2022 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*Pharmacological Reports*, *Clinical and*

Experimental Pharmacology and Physiology i Cells). Współczynnik oddziaływania prac *Impact Factor* wynosi odpowiednio dla prac oryginalnych **2.754** (100 pkt. MEiN) i **2.963** (100 pkt. MEiN) oraz **7.666** dla pracy przeglądowej (140 pkt. MEiN). Łączny *Impact Factor* cyklu prac wynosi **13.383 (340 pkt. MEiN)**. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszą autorką a swój udział w powstaniu tych pracach ocenia odpowiednio na 70% i 60% w pracach oryginalnych oraz 50% w pracy przeglądowej. Udział obejmuje opracowanie koncepcji pracy, wykonywanie i planowanie doświadczeń, analizę statystyczną, interpretację wyników i współudział w pisaniu manuskryptów. Współautorzy wyrazili zgodę na włączenie wyżej wymienionych prac do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską Pani mgr Jolanty Weresy.

Cykl publikacji został uzupełniony 42 stronicowym opracowaniem zawierającym wprowadzenie do tematyki rozprawy, cel pracy, skrócony opis metod, omówienie wyników wraz z dyskusją, wnioski, bibliografię oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Dołączony został również spis dotychczasowych osiągnięć naukowych Doktorantki, imponujący jak na ten etap kariery naukowej (współautorstwo w 11 pełnotekstowych publikacjach o łącznym współczynniku oddziaływani IF=43.521, 1160 pkt. MEiN oraz współautorstwo rozdziału w monografii). Do opracowania dołączono również zgody Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie na wykorzystanie w doświadczeniach szczurów szczepu Wistar, SHR i WKY oraz Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego Białegostoku na wykorzystanie izolowanych fragmentów uszka przedsionka serca człowieka.

Zastosowana w pracy metodyka badawcza nie budzi wątpliwości. Została starannie opisana w obu pracach oryginalnych i streszczona w opisie rozprawy doktorskiej. Badania przeprowadzono na prawych i lewych przedsionkach serc pobranych od dorosłych szczurów płci męskiej ze spontanicznym nadciśnieniem tętniczym (SHR) i od szczurów kontrolnych (szczury szczepu Wistar Kyoto – WKY i szczepu Wistar) oraz na beleczkach mięśniowych izolowanych z uszek prawych przedsionków serca człowieka (materiał otrzymany śródoperacyjnie od 30 pacjentów (21 mężczyzn, 9 kobiet) podczas zabiegów pomostowania tętnic wieńcowych, operacji zastawek serca lub aorty wstępującej). Efekt chronotropowy agonistów receptorów β -adrenergicznych zbadano w kurczących się spontanicznie prawych przedsionkach szczurzych, a efekt inotropowy w lewych przedsionkach szczurzych pobudzanych elektrycznie z częstotliwością 2 Hz oraz w ludzkich beleczkach mięśniowych pobudzanych elektrycznie z częstotliwością 1 Hz. Doktorantka w celu zgłębienia mechanizmów wpływu antagonistów receptorów CB1 i CB2 na odpowiedź chronotropową i inotropową indukowaną stymulacją receptorów β -adrenergicznych zastosowała imponująco długą listę ligandów receptorów β -adrenergicznych i kannabinoidowych. W celu aktywacji receptorów β -adrenergicznych użyła nieselektywnych (izopreanalina) i selektywnych agonistów β_1 i β_2 (odpowiednio ksamoterol i fenoterol) oraz selektywnych antagonistów β_1 i β_2

(odpowiednio CGP20712A i ICI118551). Dodatkowo w celu wyodrębnienia potencjalnej roli receptorów β_1 adrenergicznych o niskim powinowactwie użyła agonisty tych receptorów (CGP12177) blokując jednocześnie klasyczne receptory β_1 i β_2 za pomocą propranololu. Podobną strategię przyjęła dla receptorów CB1 i CB2 stosując nieselektywnych agonistów (CP55940 i CBD) oraz selektywnych antagonistów CB1 i CB2 (odpowiednio AM251 i AM630). Szeroka gama związków i ich dobór wskazuje, że Doktorantka starannie zaplanowała analizę wpływu układu kannabinoidowego i adrenergicznego na czynność mięśnia sercowego oraz podjęła próbę wskazania mechanizmów ich potencjalnej interakcji. Użycie izolowanych przedsionków pozwala zbadać rolę receptorów kannabinoidowych obecnych w mięśniu sercowym i ich regulacyjny wpływ niezależny od receptorów w ośrodkowym układzie nerwowym. Bardzo wartościowym elementem pracy jest wykorzystanie materiału ludzkiego i porównanie wyników uzyskanych w modelu szczurzym i ludzkim w celu wskazania potencjalnego znaczenia translacyjnego użytego modelu zwierzęcego. Przy analizie części metodycznej pracy nasunęło mi się kilka pytań i uwag.

- Pewnym niedoborem w pracach jest niezbadanie wpływu selektywnych agonistów receptorów CB1 i CB2 na odpowiedź inotropową i chronotropową indukowaną agonistami receptorów β -adrenergicznych w celu uzyskania informacji czy obserwowane efekty antagonistów AM251 i AM630 są wynikiem działania na receptory kannabinoidowe czy też allosterycznego działania na receptory β -adrenergiczne. Nadzwyczaj pomocne w interpretacji uzyskanych wyników byłoby również zbadanie ekspresji receptorów CB1 i CB2 oraz β_1 i β_2 w materiale ludzkim oraz u szczurów normotensyjnych i SHR.
- Wartościowe byłoby również zbadanie wpływu antagonistów/agonistów CB1 i CB2 na siłę skurczu rozwijaną w prawym przedsionku szczura pozbawionym struktur z automatyzmem i pobudzanych elektrycznie w celu lepszego porównania z efektami tych antagonistów w materiale z prawych przedsionków serca ludzkiego.
- Dodatkowo chciałabym zapytać Doktorantkę dlaczego w przypadku pobudzania lewych przedsionków szczurzych użyła częstotliwości stymulacji 2Hz, znacznie niższej niż fizjologiczna u szczurów, podczas gdy belecзки mięśniowe pobrane z serca ludzkiego były pobudzane z częstością fizjologiczną. Czy w układzie pomiarowym użytym w doświadczeniach możliwe jest badanie preparatów i ich odpowiedzi inotropowej przy częstotliwości stymulacji powyżej 2 Hz?

Liczne wyniki uzyskane przez Doktorantkę zostały zawarte w dwóch publikacjach oryginalnych. W publikacji oznaczonej nr 1 w izolowanych prawych i lewych przedsionkach pobranych od szczurów szczepu Wistar Doktorantka wykazała, że:

- Zarówno selektywni antagoniści CB1 i CB2 (odpowiednio AM251 i AM630), jaki i ich nieselektywni agoniści (CP55940 i CBD) nie mieli wpływu na podstawową częstość rytmu (HR) i siłę rozwijaną w skurczu izometrycznym izolowanego przedsionka.

- W przedsionkach szczura aktywacja zarówno receptorów β_1 - i β_2 -adrenergicznych, jak i receptorów β_1 -adrenergicznych o niskim powinowactwie, bierze udział w regulacji siły skurczu i HR, ponieważ selektywni agoniści tych receptorów (ksamoterol, fenoterol i CGP12177) prowadzą do zależnej od dawki agonisty wzrostu HR i siły skurczu. Izoprenalina, będąca nieselektywnym agonistą receptorów β_1 i β_2 wywiera w tym modelu działanie chronotropowo- i inotropowo-dodatnie głównie poprzez receptor β_1 .
- Antagonista CB1 (AM251) moduluje indukowaną izoprenalina odpowiedzi chronotropową i inotropową w sposób silnie zależny od stężenia: niskie stężenie ($0.1 \mu\text{M}$) osłabia wzrost HR i nie ma wpływu na wzrost siły skurczu. Z kolei, stężenie pośrednie ($1 \mu\text{M}$) ma niewielki wpływ na wzrost HR ale istotnie zmniejsza maksymalną siłę skurczu, podczas gdy stężenie najwyższe ($3 \mu\text{M}$), podobnie jak najniższe, zmniejsza odpowiedzi chronotropową i nie ma wpływu na odpowiedzi inotropową.
- Antagonista CB2 (AM630) w analogicznych dawkach odpowiednio nie zmienia, zwiększa i zmniejsza odpowiedzi chronotropową na izoprenalina oraz zwiększa, nie zmienia (brak wpływu na E_{max}) i silnie zwiększa odpowiedzi inotropową.
- Nieselektywni agoniści receptorów CB1 i CB2 (CP55940 i CBD) nie wywierali wpływu na efekt chronotropowy izoprenaliny ale modulowali jej wpływ na siłę skurczu lewego przedsionka (wzrost pEC_{50} , bez istotnego wpływu na maksymalny efekt - E_{max}).
- Selektywny agonista β_1 (ksamoterol) powodował zależny od stężenia wzrost HR, który nie był modulowany przez antagonistów CB1 i CB2.
- Selektywny agonista β_2 (fenoterol) zwiększał HR i siłę skurczu w sposób zależny od stężenia. Tylko antagonist CB2 zmniejszał wzrost HR po fenoterolu, ale tylko dla jego niskich dawek. Antagoniści CB1 i CB2 nie mieli wpływu na wzrost siły skurczu indukowany fenoterolem.
- Wzrost HR i siły skurczu pod wpływem inhibitora fosfodiesterazy (IBMX), który zwiększał poziom cAMP nie był modulowany przez antagonistów receptorów CB1 i CB2.

W pracy oryginalnej oznaczonej nr 2 Doktorantka wykorzystała lewe i prawe przedsionki izolowane od szczurów SHR i WKY oraz ludzkie belecзки mięśniowe wyizolowane z uszek prawych przedsionków. U 87% procent dawców występowało nadciśnienie i taki sam ich procent przyjmował β -bloker o różnym stopniu kardioselektywności. Doktorantka wykazała, że:

- W beleczkach mięśniowych pobranych z uszka prawego przedsionka serca ludzkiego antagoniści CB1 i CB2 modulują maksymalną odpowiedzi chronotropową i inotropową indukowaną izoprenalina, podobnie jak u szczurów, w sposób silnie zależny od użytego stężenia. Antagonista CB1 (AM251) silnie zmniejszał wzrost siły skurczu indukowany przez izoprenalina w najniższym ($0.1 \mu\text{M}$) i najwyższym stężeniu ($3 \mu\text{M}$) i nieznacznie go zwiększał w stężeniu pośrednim ($1 \mu\text{M}$). Natomiast antagonist CB2 (AM630) działał silnie hamująco na inotropowy efekt izoprenaliny w stężeniu najniższym, aktywując w stężeniu pośrednim i pozostawał bez wpływu w stężeniu najwyższym.
- W przedsionkach szczurów izoprenalina i CGP12177 zwiększały HR i siłę skurczu w sposób zależny od stężenia. Wzrost HR pod wpływem agonistów receptorów β -adrenergicznych był porównywalny u szczurów SHR i WKY natomiast odpowiedzi inotropowa była wyraźnie osłabiona u szczurów SHR.
- Antagonista receptora CB1 (AM251) w stężeniu $1 \mu\text{M}$ nasilał dodatnią odpowiedzi chronotropową i inotropową indukowaną izoprenalina u szczurów WKY, natomiast u szczurów SHR nasilał odpowiedzi chronotropową i pozostawał bez wpływu na odpowiedzi inotropową.
- Agonista receptora CB2 (AM630) w stężeniu $1 \mu\text{M}$ u szczurów WKY nie wywierał wpływu na wzrost HR indukowany przez izoprenalina i nieznacznie obniżał maksymalny wzrost siły skurczu, a u szczurów SHR wyraźnie nasilał indukowany przez izoprenalina wzrost siły skurczu i pozostawał bez wpływu na wzrost częstości HR.

- Obaj antagoniści receptorów CB1 i CB2 nie modyfikowali dodatniego efektu chronotropowego agonisty receptorów β_1 o niskim powinowactwie (CGP12177). Natomiast AM251 nasilał efekt inotropowy CG12177 u szczurów SHR, podczas gdy AM630 zmniejszał go u szczurów WKY.

Do cyklu prac dołączona jest obszerna praca przeglądowa, w której Doktorantka podjęła się podsumowania dostępnych w literaturze doniesień o potencjalnych mechanizmach niepożądanych zdarzeń sercowo-naczyniowych, w tym ostrych incydentów wieńcowych, po zażyciu marihuany lub syntetycznych kannabinoidów. Przeanalizowała wyniki badań prowadzonych *in vivo* u ludzi i zwierząt eksperymentalnych, *ex vivo* w izolowanych sercach i fragmentach tkanek, a także *in vitro* w izolowanych komórkach i liniach komórkowych. Wyniki badań podsumowała w 5 obszernych tabelach i zobrazowała na czytelnym schemacie. Po analizie tego bardzo złożonego i bogatego materiału badawczego Doktorantka wysuwa wniosek, że główną przyczyną zawału serca u ludzi po zażyciu marihuany lub kannabinomimetyków może być nadmierna stymulacja katecholaminowa i związana z nią tachykardia, będące wynikiem pobudzenia centralnych receptorów CB1 przy słabo wyrażonym u ludzi efekcie hamującym uwalnianie katecholamin z zakończeń nerwów współczulnych wywieranym przez receptory presynaptyczne CB1. Inne postulowane mechanizmy, takie jak wpływ kannabinoidów na skurcz naczyń wieńcowych i powstawanie zakrzepów, będących główną przyczyną ostrych incydentów sercowych, a także działanie inotropowe kannabinoidów, czy zaburzenia pomiędzy podażą a wykorzystaniem energii w mięśniu sercowym są w świetle dostępnych danych mniej prawdopodobne. Dodatkowo analiza wyników licznych publikacji w tym obszarze, tak jak zresztą wyniki własne uzyskane przez Doktorantkę w pracach oryginalnych, uwidoczniała ogromną złożoność działania układu kannabinoidowego w układzie sercowo-naczyniowym i trudności w interpretacji uzyskanych wyników wynikające ze zmienności gatunkowej, skomplikowanego rozmieszczenia licznych receptorów wrażliwych na kannabinoidy w organizmie, stosowania w badaniach rozlicznych agonistów i antagonistów w różnych stężeniach i o różnym stopniu selektywności do poszczególnych typów receptorów kannabinoidowych oraz interakcje z układem adrenergicznym w sercu. W przypadku ludzi dodatkową komplikacją w ocenie wpływu kannabinoidów na układ krążenia jest droga podania, równoległe zażywanie innych substancji i leków oraz współistnienie chorób towarzyszących.

Pracę przeglądową uważam za cenne uzupełnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Jolanty Weresy. W świetle coraz częstszej legalizacji marihuany w celach rekreacyjnych, a także stosowania nowych syntetycznych kannabinoidów o bardzo wysokim powinowactwie do receptorów CB1 i CB2 w środkach odurzających oraz dopuszczenie do użytku przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków kannabinoidów w celach terapeutycznych opracowanie systematycznego przeglądu jest bardzo cenne i istotnie porządkujące wiedzę o mechanizmach działania kannabinoidów na układ krążenia oraz potencjalnych zagrożeniach płynących z ich używania, a także wskazujące na potrzebę

wykazania ostrożności w opracowywaniu strategii terapeutycznych skierowanych na układ kannabinoidowy w chorobach układu sercowo-naczyniowego.

Sformułowanie wniosków na podstawie tak licznych i trudnych interpretacyjnie wyników nie jest zadaniem łatwym. W moim odczuciu wniosek nr 2 nie jest do końca uprawniony, ponieważ działania antagonistów receptorów kannabinoidowych w sercu człowieka i szczura są często odmienne i wywołują przeciwstawne zmiany. Największą zgodność odpowiedzi odnotowano w przedsionkach szczurów SHR i w preparatach mięśniowych przedsionków pobranych od pacjentów (w większości z nadciśnieniem tętniczym) i być może o taką informację należałoby uzupełnić wniosek nr 2. Wniosek nr 3 mógłby zostać doprecyzowany przez dodanie, że mechanizm interakcji pomiędzy receptorami kannabinoidowymi i β -adrenergicznymi nie zależy od bezpośredniego wpływu tych agonistów CB1 i CB2 na wewnątrzkomórkowy poziom cAMP. Wniosek nr 5 mógłby w moim odczuciu zostać pominięty natomiast wniosek nr 6 uzupełniony o zidentyfikowane na podstawie przeglądu literatury potencjalne mechanizmy odpowiedzialne za indukcję zawału serca po zażyciu kannabinoidów, tak jak to Doktorantka podsumowała w konkluzji pracy przeglądowej.

W trakcie lektury tych dobrze napisanych i zaprojektowanych prac nasunęło mi się kilka pytań i komentarzy:

1. Czy Doktorantka ma pomysł jak wyjaśnić tak istotne, zależne od dawki, różnice w działaniu antagonistów receptorów CB1 i CB2 na indukowaną izoprenalina odpowiedzi chrono- i inotropową (zbliżony wpływ dawki najniższej i najwyższej i przeciwstawny dawki pośredniej)?
2. Jaka może być przyczyna istotnie różnego, a nawet przeciwstawnego, wpływu antagonistów receptorów CB1 i CB2 użytych w tych samych stężeniach na indukowaną izoprenalina odpowiedzi chrono- i inotropową u dwóch szczepów szczurów kontrolnych (Wistar Kyoto vs. Wistar) użytych odpowiednio w pracy nr 2 i nr 1? Rzeczywiście pomiędzy tymi szczepami odnotowano pewne różnice, o których wspomina Doktorantka w dyskusji pracy, dotyczące aktywności enzymu konwertującego angiotensynę, czy stężenia całkowitego cholesterolu, a także pewne różnice behawioralne. Jednak one nie tłumaczą tak odmiennych efektów obserwowanych dla antagonistów CB1 i CB2. Czy Doktorantka uważa, że pomiędzy tymi szczepami mogą istnieć tak wyraźne różnice np. w ekspresji receptorów CB1/CB2 lub/i β -adrenergicznych lub w ich wrażliwości na użytych antagonistów?
3. Czy w związku z dogłębną analizą literatury w badanym obszarze Doktorantka znalazła odpowiedź na pytanie czy receptory układu ECS są obecne w układzie bodźcoprzewodzącym serca u ludzi i u zwierząt? Doktorantka w pracy przeglądowej stwierdza, że do tej pory nie wykryto receptorów kannabinoidowych w układzie bodźcoprzewodzącym u zwierząt eksperymentalnych i u ludzi (Rozdział 2). Czy badania mające na celu potwierdzenie obecności tych receptorów w układzie bodźcoprzewodzącym w tym w węźle zatokowo-predsionkowym

były prowadzone i nie wykryto ich obecności, czy też ze względu na trudności w pozyskaniu materiału ich nie prowadzono?

4. Moim zdaniem jedną z ciekawszych obserwacji w tej pracy jest silnie wyrażony wpływ antagonisty CB2 na indukowaną izoprenalina odpowiedzi inotropową, która jest zgodna u szczurów SHR i w beleczkach mięśniowych pochodzących od pacjentów i przeciwny wpływ u szczurów normotensyjnych WKY. W pracy Pędzińska-Betiuk et al. (2017), w której Doktorantka jest współautorką wykazano, że ekspresja receptorów CB1 i CB2 nie zmienia się w lewej komorze u szczurów SHR? Czy wiadomo na podstawie badań własnych lub literatury, czy ekspresja tych receptorów zmienia się u szczurów SHR w przedsionkach? Z kolei w literaturze istnieją doniesienia, że u szczurów SHR, dochodzi do spadku ekspresji receptorów β 1-adrenergicznych i wzrostu ekspresji receptorów β 2-adrenergicznych. Pokazano również, że receptory β 2 w różnych stanach patologicznych mogą „przepinać się” na białko Gi. Czy zdaniem Doktorantki może to tłumaczyć osłabioną odpowiedź inotropową na izoprenalina u szczurów SHR i sugerować działanie antagonisty receptorów CB2 przez allosteryczne oddziaływanie na receptory β 2-adrenergiczne?

Reasumując, rozprawę doktorską mgr Jolanty Weresy oceniam wysoko. Wyniki, które Doktorantka przedstawiła istotnie poszerzają wiedzę o roli receptorów CB1 i CB2 w mięśniu sercowym oraz o wpływie ich ligandów na efekt chronotropowy i inotropowy indukowany aktywacją receptorów β -adrenergicznych. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, przeszły zatem wymagający proces recenzji i spełniły wysokie wymagania stawiane w renomowanych czasopiśmie naukowych, zarówno co do poziomu merytorycznego, jak i językowego oraz edytorskiego i dzięki ich dostępności stanowią już teraz ważny głos w dyskusji dotyczącej badanego zagadnienia.

Ostatecznie stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Jolanty Weresy spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora wymienione w art.187 *Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1688, z późn. zmianami)*. W związku z tym, z pełnym przekonaniem, **zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Jolanty Weresy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Jednocześnie z uwagi na fakt opublikowania wyników w prestiżowych czasopiśmie naukowych, uzyskanie wyników o ważnym znaczeniu poznawczym i społecznym, a także potencjalnym znaczeniu klinicznym, biorąc pod uwagę przedłożone mi kryteria wyróżniania rozpraw doktorskich w Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, **wnoszę wniosek o wyróżnienie rozprawy.**