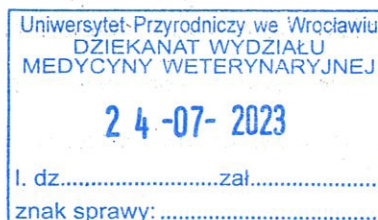


Dr hab. Marcin Szczepanik
Zakład Diagnostyki Klinicznej
i Dermatologii Weterynaryjnej
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 04.07.2023



Recenzja

Rozprawy doktorskiej lek. wet. Marty Rykały na temat: „**Identyfikacja układu receptorów endokannabinoidowych w skórze i mózgu koni**”. Recenzja została przygotowana zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 30 maja 2023 roku. Oceniana praca na stopień doktora w dyscyplinie Weterynaria została wykonana w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz Laboratorium Patologii Eksperymentalnej Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Katedry Patologii Klinicznej i Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Artur Niedźwiedz, promotorem pomocniczym dr n. biol. Piotr Kupezyk.

Od dłuższego czasu obserwowany jest na całym świecie trend legalizowania produktów pozyskiwanych z konopi. Związany jest on z powszechnym uznaniem prozdrowotnych właściwości kannabidiolu (CBD) w medycynie człowieka, co potwierdzone jest licznymi dowodami naukowymi. Również w medycynie weterynaryjnej kannabidiol zyskuje coraz szerszą grupę zwolenników wśród lekarzy weterynarii jak również opiekunów zwierząt, a jego skuteczność została szeroko udowodniona. CBD stosowany jest skutecznie u zwierząt cierpiących na różnego typu zaburzenia behawioralne, u psów z padaczką, w leczeniu *osteoarthritis*, chorobach alergicznych skóry (głównie atopowym zapaleniu skóry) limfocytarno-plazmocytarnym zapaleniu dziąseł u kotów oraz w terapii bólu.

W organizmach zarówno ludzi i zwierząt syntetyzowane są endokannabinoidy: anamid, arachidonyloglicerol, eter noladyny, wiroadamina, N-arachidoboilodopamina, które łączą się z receptorami kannabinoidowymi CB1R i CB2R, i tworzą wraz z elementami regulującymi (enzymami odpowiedzialnymi za ich syntezę i degradację) układ endokannabinoidowy. Jest to specyficzna sieć przekazywania sygnałów pomiędzy komórkami, która występuje w wielu zdrowych tkankach i jest aktywowana w przebiegu zjawisk patologicznych, np. stanach zapalnych. U człowieka receptory kannabinoidowe CB1R występują w mózdzku i pniu mózgu jak również w zakończeniach nerwów

obwodowych, jądrach i oczach. Natomiast receptory CB2R zlokalizowane są głównie w komórkach i tkankach układu immunologicznego. Badania dotyczące receptorów kannabinoidowych u zwierząt powadzone są od lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku. Dzięki nim zlokalizowane zostały one w obrębie centralnego układu nerwowego u psów, w układzie trawiennym u kotów, bydła i owiec jak również w rdzeniu kręgowym koni. Ostatnio publikowane badania potwierdziły również obecność tych receptorów w błonach maziowych stawu śródreźnego koni, zaznaczyć należy, że informacje dotyczące receptorów kannabinoidowych u tego gatunku są bardzo skąpe, co w pełni uzasadnia podjęcie tematu pracy doktorskiej. Identyfikacja tych receptorów w skórze koni jak dotychczas nie była przedmiotem badań, dzięki czemu praca ma charakter pionierski w skali światowej.

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 137 stron maszynopisu i posiada klasyczny układ z rozdziałami: wstęp, cel pracy badawczej, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo, praca poprzedzona jest również wykazem skrótów co ułatwia jej studiowanie (w skrócie CBD należy zamienić kanabidiol na kannabidiol). Niezwykle bogate piśmiennictwo obejmuje 214 pozycji literatury. W pracy znajduje się ponadto 11 tabel i 36 dobrej jakości rycin.

Wstęp liczący 31 stron omawia obecny stan wiedzy dotyczący receptorów endokannabinoidowych oraz zastosowanie kannabinoidów w leczeniu chorób u ludzi i zwierząt. Niezwykle interesujący jest rys historyczny, który rozpoczyna pracę, opisujący zastosowanie kannabinoidów od czasów starożytnych aż do współczesnych odkryć naukowych w tej dziedzinie. Lektura tego rozdziału pozwala Czytelnikowi na poznanie aktualnej wiedzy dotyczącej układu endokannabinoidowego i jego receptorów u ludzi i zwierząt. Wstęp porusza również temat fitokannabinoidów konopi i ich zastosowania w lecznictwie u człowieka i różnych gatunków zwierząt, w tym u koni. Ponadto omówione są analogi syntetyczne kannabinoidów z ich zastosowaniem, jak również zagrożeniami płynącymi z ich użycia. Ostatni rozdział wstępu opisuje budowę anatomiczną skóry konia i role receptorów CB1R i CB2R w neuroimmunologicznej homeostazie skóry, co wprowadza Czytelnika w szczegółowy temat pracy.

W tej części doktorantka nie ustrzegła się kilku edycyjnych błędów dotyczących przede wszystkim nazewnictwa. Przed przygotowaniem pracy do publikacji (oczywiście w przypadku publikowania jej w języku polskim) recenzent proponuje zastąpić infekcje – zakażenia, terapii – leczenia, układ pokarmowy – układ trawienny, cebulka włosa - korzeń włosa. Na stronie 13 proponuje dodać informacje dotyczącą skutecznego stosowania produktów opartych na kannabinoidach w przypadku zapalania dziąseł u kotów (cytowana w

tym miejscu pozycja 26 literatury). Na stronie 33 należy zastąpić atopia - atopowym zapaleniem skóry (co wynika z kontekstu cytowanej w tym miejscu pracy). Na stronie 39 informacja, że skóra właściwa jest grubsza od naskórka tylko na obszarach gęsto owłosionych nie jest właściwa, ponieważ naskórek jest zawsze cieńszy od skóry właściwej (skóra 1,6-6,1 mm naskórek ok 0,1 mm).

Doktorantka postawiła sobie pięć celów szczegółowych:

Analizę ekspresji mRNA dla genów *Cnr1* i *Cnr2* dla receptorów CB1R i CB2R w fragmentach mózgu pobranych pośmiertnie od koni zdrowych.

- Analizę ekspresji białek CB1R i CB2R w fragmentach mózgu pobranych pośmiertnie od koni zdrowych.

- Analizę ekspresji mRNA dla genów *Cnr1* i *Cnr2* dla receptorów CB1R i CB2R w pośmiertnie pobranych bioptatach skóry koni zdrowych.

- Analizę ekspresji białek CB1R i CB2R w pośmiertnie pobranych bioptatach skóry koni zdrowych.

- Analizę ilościową i analizę dystrybucji tkankowej receptorów CB1R i CB2R wraz z identyfikacją i kolokalizacją zakończeń nerwowych PGP 9.5 w pośmiertnie pobranych bioptatach skóry koni zdrowych.

Cele te są prawidłowo sformułowane, prawidłowo argumentowana jest również potrzeba przeprowadzenia tego typu badań. Odnosnie badania receptorów w skórze koni jest to praca o charakterze pionierskim w skali światowej, co pragnę podkreślić.

Jak wynika z dalszej części pracy, należy uznać, że wszystkie postawione cele zostały przez doktorantkę zrealizowane.

Na stronie 44 recenzent proponuje zastąpić słowo schorzenia- choroby.

Materiał wyselekcjonowany do przeprowadzenia badań jest wystarczająco liczny oraz, co należy podkreślić szczegółowo scharakteryzowany. W rozdziale dotyczącym pobrania materiału należałoby dodać informację o czasie jaki upłynął od uboju do pobrania i utrwalenia materiału. Przed pobraniem materiału do badań powierzchnia skóry została wielokrotnie potraktowana środkami dezynfekcyjnymi, czy tego typu postępowanie nie spowodowało uszkodzenia warstwy rogowej naskórka i tym samym nie wpłynęło na wynik

dotyczący badania histopatologicznego? W przypadku pobierania materiału do badania histopatologicznego, nawet w warunkach przyżyciowych nie zaleca się dezynfekcji miejsca skąd pobierany jest wycinek w związku z wpływem środków dezynfekcyjnych na naskórek a szczególnie warstwę rogową. Zastosowane metody, są prawidłowo dobrane i szczegółowo opisane. Na uwagę zasługuje ich bogaty zestaw użyty w pracy, są one aktualne, a w przypadku mikroskopii konfokalnej pionierskie, ponieważ ta technika, jak dotychczas nie była używana w weterynarii w ocenie skóry u koni. Ponieważ w pracy znajduje się aż 16 rycin przedstawiających zdjęcia z mikroskopii konfokalnej, a dzięki zastosowaniu tej techniki możliwe było określenie dystrybucji receptorów, w opinii recenzenta, można by poświęcić opisaniu tej techniki nieco więcej miejsca, przykładowo we wstępie pracy.

Wyniki

W rozdziale dotyczącym analizy histopatologicznej skóry na rycinie E przedstawiającej naskórek widoczne jest niezwykle cienka warstwa rogowa, przypuszczanie wynika to ze sposobu przygotowania skóry przed pobrania materiału, stosowne byłoby umieszczenie takiego komentarza w opisie preparatu.

Na rycinie F proponuje zastąpić cebulka (co jest określeniem potocznym)- korzeń włosa.

W dalszej części pracy doktorantka wykazała ekspresje obu receptorów kannabinoidowych CB1R i CB2R w skórze konia. Receptory te były obecne zarówno w skupiskach komórek nerwowych jak i w obszarze okołonaczyniowym i w komórkach śródbłonna. Receptory CB2R występowały w mniejszym zagęszczeniu. Ekspresja ta była niższa niż w stanowiącym materiał referencyjny mózgu w odniesieniu do receptora CB1R i zbliżona w odniesieniu do CB2R.

Analiza dystrybucji receptorów CBR została przedstawiona na zdjęciach z mikroskopii konfokalnej, która to technika nie stosowana była dotychczas w ocena skóry u koni, co jest kolejnym argumentem za pionierskim charakterem pracy. Technika ta umożliwiła również identyfikację ekspresji receptorów CB1R oraz CB2R w odniesieniu do pojedynczych keratynocytów, które zostały zidentyfikowane w obrębie błony komórkowej oraz w cytoplazmie, a w przypadku CB1R również w pojedynczych jądrach komórkowych. W przypadku CB1R ekspresja w cytoplazmie zmniejszała się w kierunku jąder, w przypadku CB2R była jednorodna.

Doktorantka wykazała, że ekspresja receptora CB1R w naskórku jest jednorodna i jest on obecny we wszystkich jego warstwach z nieco większą ekspresją w warstwie podstawnej naskórka. Receptory CB1R obecne były również w obrębie skóry właściwej zarówno w

warstwie brodawkowatej jak i siateczkowatej jak również w mieszkach włosowych, gruczołach łojowych i potowych. Gruczoły łojowe były strukturą, gdzie ekspresja receptora CB1R była najwyższa spośród wszystkich elementów skóry. Receptor CB2R (na stronie 97 jest błąd przedstawienia liter CBR2) wykazywały najsilniejszą ekspresję w skórze właściwej bezpośrednio pod naskórkiem, ponadto występowała w mieszkach włosowych, gruczołach łojowych i potowych.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że ekspresja receptora CB2R jest istotnie wyższa we wszystkich analizowanych warstwach skóry, a szczególnie w obrębie naskórka i powierzchniowej warstwie brodawkowatej.

Wszystkie wyniki są przekonująco zilustrowane na dobrej jakości rycinach z mikroskopii konfokalnej.

Porównując ekspresje białek receptorów CBR w mózgu i skórze doktorantka wykazała wyższą ich ekspresję w mózgu w przypadku CB1R i porównywalną w przypadku CB2R.

W dalszej części pracy doktorantka wykazała obecność mRNA genów CB1R i CB2R w skórze konia. Wyższa ekspresja notowana była w przypadku Cnr2 w stosunku do Cnr1. Zarówno w przypadku Cnr1 jak i Cnr2 ekspresja była niższa w skórze w porównaniu do mózgu.

Dyskusja liczy 10 stron maszynopisu. Doktorantka rozważa obecny stan prawy stosowania leków opartych na surowcach pozyskiwanych z konopi, podnosząc ograniczenia z jakimi obecnie spotykamy się w przypadku tych produktów, ograniczających lekarzy weterynarii do stosowania wyłącznie produktów już zarejestrowanych bez możliwości przepisywania recept na leki recepturowe.

Dyskusja w zwięzły sposób podsumowuje uzyskane wyniki dotyczące identyfikacji i dystrybucji receptorów kannabinoidowych w skórze. W związku z tym, że w odniesieniu do tego zagadnienia praca ma charakter pionierski w skali światowej, doktorantka nie miała bezpośredniej możliwości zastawienia uzyskanych wyników z pracami innych autorów dotyczących koni. Wyniki zostały porównane do rezultatów prac u innych gatunków zwierząt jak również u ludzi i są one zgodne z obserwacjami uzyskanymi u człowieka i zwierząt laboratoryjnych. Zgodzić należy się ze stwierdzeniem, że praca po raz pierwszy przedstawia szczegółową ekspresję genów i białek CBR w skórze u koni.

Doktorantka słusznie podnosi pewne ograniczenia dotyczące swojej pracy związane z niewielką liczbą koni od których pozyskano skórę, wykonania prac na ograniczonej liczbie ras oraz jedynie na jednej okolicy ciała. Świadomość ograniczeń pracy świadczy o dojrzałości

naukowej doktorantki. W tym miejscu wskazuje ona również dalsze kierunki proponowanych badań, rozszerzając je przede wszystkim na inne okolice ciała. Dzięki informacjom obecnym w dysertacji otwiera się również możliwość na aplikacyjne zastosowanie kannabinoidów u koni, co znajduje już pełne naukowe uzasadnienie w związku z wykazaniem receptorów dla nich w skórze u tego gatunku. Interesujące są propozycje aplikacyjnego zastosowania kannabinoidów u koni. Zgodzić należy się, że użycie ich w przypadku nadwrażliwości na alergeny owadów meszek i kuczmanów jest interesującą alternatywą dla obecnie stosowanych metod leczenia, które charakteryzują się niską skutecznością lub możliwymi poważnymi objawami ubocznymi. W związku z powszechnością występowania tej choroby (nawet do kilkudziesięciu procent w populacji) należy żywić głęboką nadzieję na zainteresowanie przemysłu farmaceutycznego prowadzeniem badań w tym kierunku. W opisie choroby jako recenzent proponowałbym wyeksponować świąd jako najważniejszy objaw, a powstające wykwity zwykle mają charakter wtórny do niego.

Ciekawą propozycją jest użycie kannabinoidów w uogólnionej chorobie ziarniniakowej. Problem ten, o nieznanym etiologii przebiega najczęściej w postaci złuszcząco strupiejącej, rzadziej guzkowej i dotyczy najczęściej skóry. Choroba może ponadto dotyczyć innych narządów, a leczenie w jej przypadku, oparte na lekach immunosupresyjnych często jest nieskuteczne. Niewykluczone, że immunomodulacja za pomocą kannabinoidów mogłaby okazać się pomocna ograniczając nasilenie objawów.

Propozycja użycia kannabinoidów jako wspomagającego leczenia ran jest również uzasadniona. Podobnie zastosowania kannabinoidów u koni z problemami nowotworowymi jak czerniaki, rak kolczystokomórkowy czy sarkoidy należy uznać za godną uwagi. Również użycie kannabinoidów w leczeniu miejscowym w celu łagodzenia skutków ubocznych miejscowych leków przeciwnowotworowych znajduje uzasadnienie. W tym miejscu recenzent proponuje by ujednoczyć nazewnictwo ponieważ na stronie 115 *squaomus cel carcinoma* występuje pod dwoma nazwami jako rak kolczystokomórkowy i płaskonabłonkowy. Recenzent proponuje użyć tej pierwszej nazwy chociaż druga, choć rzadziej również używana jest w literaturze. Stosowanie kannabinoidów jako suplementów diety w celu poprawy jakości okrywy włosowej jest kolejną interesującą propozycją ich zastosowania.

Wszystkie zaproponowane w dyskusji kierunki aplikacyjnego użycia kannabinoidów wynikają, z udowodnionego w pracy, występowania receptorów CBR w skórze konia.

Odnośnie poprawek związanych z nazewnictwem recenzent sugeruje zastąpić: schorzeń – chorób, terapii – leczenia.

Kolejnym rozdziałem dysertacji są wnioski. Doktorantka sformułowała 4 wnioski. Dwa pierwsze wynikają bezpośrednio z uzyskanych wyników, dwa kolejne dotyczą możliwości podjęcia konkretnych prac w oparciu o przedstawione w dysertacji wyniki.


W piśmiennictwie należałoby ujednoczyć sposób cytowania ponieważ w niektórych pozycjach w nawiasie po wolumenie podany jest dodatkowo numer, a w innych jest go brak.

Podsumowując całokształt przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej należy podkreślić nowatorstwo tematu badań, jak również zastosowanie nowoczesnych, również nowatorskich metod badawczych. Przeprowadzone badania nie miały wprawdzie w założeniu celu aplikacyjnego, ale uzyskane wyniki z całą pewnością będą mogły w przyszłości przełożyć się na leczenie chorób u koni.

Zastosowane metody badawcze wymagały od doktorantki wiele wysiłku, doktorantka doskonale je opanowała. Całość pracy jest niezwykle dobrze zaplanowana i zrealizowana, Wymienione w recenzji uwagi w zdecydowanej większości mają charakter edycyjny i łatwo mogą zostać poprawione lub też uzupełnione podczas przygotowania pacy do druku. Uzyskane wyniki zostały zestawione w sposób trafny z aktualnym piśmiennictwem, wnioski z wyników wyciągnięte są prawidłowo.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska pani lek. wet. Marty Rykały na temat: **„Identyfikacja układu receptorów endokannabinoidowych w skórze i mózgu koni”**. spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim i w pełni odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14.03.2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U z 2003 Nr 65 poz.595 z późniejszymi zmianami) w zw. z art. 179 ust.3 z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U z 30 sierpnia 2018 poz.1669). Przedstawiam Radzie Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wnioski o dopuszczenie Pani lek. wet. Marty Rykały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W związku z nowatorskim na skale światową tematem podjętych badań, zwracam się również z prośbą do Rady Dyscypliny Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z wnioskiem o nagrodzenie rozprawy doktorskiej stosowną dla Wydziału i Uniwersytetu nagrodą.


dr hab. Marcin Stępień
prof. UP w Lublinie
lekarz weterynarii
specjalista chorób psów i kotów
20-850 Lublin, ul. Paderewskiego 14/70
tel. 607 717 015