



Warszawa, 6 grudnia 2021 r.

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**lek. Agnieszki Segiet-Święcickiej**

**p.t. „Rola TNF w ośrodkowej regulacji układu krążenia w warunkach normo- i hipertensji.”**

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Klinicznej i Doświadczalnej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

pod promotorską opieką *dr hab. n. med. Tymoteusza Żery*

Częstość występowania nadciśnienia tętniczego na świecie wśród osób dorosłych wynosi 30–45%, a u osób po 60 roku życia ponad 60%. Nadciśnienie tętnicze jest głównym czynnikiem ryzyka zawału serca i udaru mózgu. Ze względu na starzenie się społeczeństwa, wzrost przeciętnej masy ciała i niską aktywność fizyczną, częstość występowania nadciśnienia tętniczego na świecie będzie rosła. Szacuje się, że liczba osób z nadciśnieniem tętniczym w 2025 przekroczy 1,5 miliarda. U około 90% pacjentów nadciśnienie tętnicze ma charakter pierwotny o nie do końca wyjaśnionej etiologii. Tradycyjnie nadciśnienie tętnicze uważa się za zaburzenie funkcji dwóch układów neurohormonalnych, autonomicznego układu nerwowego z nadmierną aktywacją jego komponenty współczulnej (SNS) oraz układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS). Układy te będąc kluczowym regulatorem częstości rytmu, kurczliwości mięśnia sercowego, oporu naczyniowego oraz diurezy i natiurezy w znacznej mierze decydują o wartościach ciśnienia krwi. Celem obecnie stosowanych interwencji farmakologicznych, mających na celu normalizację ciśnienia krwi, jest ograniczenie nadmiernej aktywacji RAAS i/lub SNS. Jednak u ponad 40% pacjentów leczonych za pomocą tych interwencji nie osiąga się prawidłowego ciśnienia krwi, a u ok. 10% pacjentów ciśnienie jest nadal nieprawidłowe pomimo stosowania co najmniej trzech leków przeciwnadciśnieniowych w maksymalnych tolerowanych dawkach. Obserwacje te sugerują, że patomechanizm nadciśnienia tętniczego jest jeszcze bardziej złożony niż pierwotnie sądzono i obejmuje zaburzenia innych układów. Coraz liczniejsze badania prowadzone zarówno u ludzi, jak i w zwierzęcych modelach nadciśnienia tętniczego, wskazują na istotny udział układu immunologicznego w rozwoju nadciśnienia tętniczego. W proces ten zaangażowane są liczne komórki układu odpornościowego, w tym limfocyty T, komórki prezentujące antygen (APC),



makrofagi, a także komórki NK i limfocyty B oraz produkowane przez nie cytokiny prozapalne. Udowodniono, że przewlekły stan zapalny w organizmie (np. w bardzo powszechnych i często lekceważonych chorobach przyzębia) ma istotny wpływ na rozwój nadciśnienia. Co ciekawe, również pojawienie się nadciśnienia może doprowadzić do rozwoju zarówno ogólnoustrojowego, jak i toczącego się lokalnie np. w centralnym układzie nerwowym, w nerkach lub w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej, stanu zapalnego.

Jedną z cytokin prozapalnych odgrywających ważną rolę w tym procesie jest TNF- $\alpha$ . Jest on produkowany głównie przez makrofagi i limfocyty, ale także lokalnie w centralnym układzie nerwowym przez komórki mikrogleju. Istotną rolę tej cytokiny w regulacji ciśnienia pokazały badania, w których zmniejszanie dostępności TNF- $\alpha$  dla jego receptorów przez podanie monoklonalnego przeciwciała przeciwko TNF lub tzw. fałszywego receptora dla TNF obniżało ciśnienie krwi zarówno u ludzi chorych na immunozależne schorzenia takie jak RZS, czy choroba Crohn'a, jaki i w modelach zwierzęcych nadciśnienia tętniczego. Jednak droga do wprowadzenia tego rodzaju interwencji w leczeniu nadciśnienia tętniczego jest jeszcze daleka ze względu na złożone i wielokierunkowe działanie tej cytokiny oraz fakt, że długotrwałe leczenie inhibitorami TNF jest obciążone wieloma działaniami niepożądanymi. Wskazane są więc dalsze badania nad złożonym mechanizmem działania tej cytokiny.

Mając powyższe na uwadze, Pani Monika Segiet-Święcicka jako cel nadrzędny swojej rozprawy doktorskiej obrała zbadanie roli TNF w regulacji ciśnienia tętniczego w warunkach normo- i hipertensji u szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (SHR). Podczas realizacji tego zadania zaplanowała 7 celów szczegółowych. Były nimi: (1) Ocena wartości ciśnienia tętniczego oraz czułości odruchu z baroreceptorów tętniczych i odruchu z chemoreceptorów obwodowych u szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem (SHR) i kontrolnych normotensyjnych szczurów Wistar-Kyoto (WKY). 2. Ocena wpływu podania TNF do układu komorowego mózgu na ciśnienie tętnicze u szczurów hipertensyjnych SHR i normotensyjnych WKY. 3. Ocena obecności receptora dla TNF typu 1 (TNFR1) w neuronach, komórkach mikrogleju i astrocytach w pniu mózgu szczurów hipertensyjnych SHR i normotensyjnych WKY. 4. Porównanie ekspresji TNF w obszarach krążeniowych ośrodkowego układu nerwowego (NTS, RVLM, PVN) szczurów hipertensyjnych SHR i kontrolnych szczurów normotensyjnych WKY. 5. Porównanie ekspresji receptora TNFR1 w obszarach krążeniowych ośrodkowego układu nerwowego (NTS, RVLM, PVN) szczurów hipertensyjnych SHR i kontrolnych szczurów normotensyjnych WKY. 6. Porównanie stężeń TNF i TNFR1 w surowicy szczurów hipertensyjnych SHR i normotensyjnych WKY. 7. Porównanie stężenia noradrenaliny w osoczu szczurów hipertensyjnych SHR i normotensyjnych WKY.



Cel rozprawy jest uzasadniony naukowo o ważnym znaczeniu poznawczym a także o potencjalnym znaczeniu klinicznym związanym z możliwością opracowania strategii leczniczych ukierunkowanych na blokowanie aktywności TNF w nadciśnieniu tętniczym. Co prawda, hipertensyjne działanie TNF było badane u szczurów w różnych modelach nadciśnienia, w tym u szczurów SHR. Jednak Autorka istotnie rozszerzyła zakres badań i uzyskała nowe informacje, szczególnie dotyczące efektów podania TNF bezpośrednio do komory bocznej mózgu oraz ekspresji TNF i jego receptorów typu 1 (TNFR1) w centralnych ośrodkach krążeniowych, odrębnie w częściach grzbietowej i brzusznej rdzenia przedłużonego oraz w podwzgórzu, zestawiając je z pomiarami ilości tych białek w surowicy.

Praca doktorska Pani Moniki Sieget-Święcickiej ma typowy dla rozpraw doktorskich układ. Jest to 125 stronicowa monografia opatrzona bogatą bibliografią liczącą aż 396 pozycji. Opatrzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim. Zawiera wykaz użytych skrótów oraz spis rycin i tabel. Do pracy dołączono pozwolenia Komisji Etycznej na przeprowadzenia zaplanowanych w projekcie badań i procedur z wykorzystaniem 78 szczurów. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobry język rozprawy i staranna szata graficzna. Pracę czyta się z dużą przyjemnością. Praktycznie nie znalazłam żadnych uchybień edytorskich.

Rozprawę rozpoczyna obszerny, ponad 30 stronicowy **Wstęp**. Doktorantka opisuje szczegółowo patogenezę rozwoju nadciśnienia odnosząc się do klasycznych modeli regulacji ciśnienia (nerkowej i naczyniowej) zaproponowanych odpowiednio przez Guytona i Folkowa, a następnie omawia rolę ośrodkowego układu nerwowego w regulacji ciśnienia. Dokładnie opisuje obszary ośrodkowego układu nerwowego związane z nerwową regulacją ciśnienia tętniczego zlokalizowane w rdzeniu przedłużonym i podwzgórzu ilustrując opis czytelną ryciną. Kolejne rozdziały poświęca roli procesu zapalnego w patogenezie rozwoju nadciśnienia oraz szeroko opisuje rolę wybranej do badań cytokiny prozapalnej – TNF- $\alpha$  i jej receptorów w tym procesie. Przytacza rzetelnie wyniki dotychczas przeprowadzonych badań w modelach zwierzęcych, w tym w modelu nadciśnienia tętniczego uwarunkowanego genetycznie (SHR). Odnosi się również do wyników badań klinicznych, w tym do toczących się obecnie u osób z nadciśnieniem opornym, których celem jest określenie skuteczności minocykliny, inhibitora mikrogleju, głównego producenta TNF w ośrodkowym układzie nerwowym. Wstęp jest mocną stroną rozprawy W moim odczuciu stanowi dobrze przygotowaną pracę przeglądową i ma duży walor edukacyjny. Świadczy o dużej erudycji Autorki, znajomości tematu i świadomości badanych procesów. Jest niezwykle rzetelną analizą literatury dotyczącej badanego zagadnienia (we wstępie Autorka zacytowała aż 310 pozycji).

**Materiał i Metody:** Doktorantka wykorzystwała do badań łącznie 76 szczurów (samce w wieku 16 tygodni), w tym 38 szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem tętniczym (SHR) i 38 szczurów normotensyjnych tego samego szczepu Wistar-Kyoto (WKY), służących jako kontrola.



Szczurom uśpionym za pomocą narkozy uretanowej podanej dootrzewnowo implantowano cewniki odpowiednio do tętnicy udowej i do żyły udowej w celu monitorowania parametrów hemodynamicznych (ciśnienie krwi i częstość rytmu) oraz podawania substancji do zbadania odruchu z baroreceptorów tętnicznych i chemoreceptorów obwodowych (odpowiednio fenylefryna - selektywny agonista receptorów adrenergicznych  $\alpha_1$  i cyjanek potasu - inhibitor fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach). Następnie implantowano kaniulę do komory bocznej mózgu w celu domózgowego podawania TNF. Ocenę ekspresji TNF i TNFR1 przeprowadzono w obszarach krążeniowych mózgowia, wyodrębniając i poddając oddzielnej analizie podwzgórze oraz część brzuszną i grzbietową rdzenia przedłużonego. Do ilościowej oceny białka TNF i TNFR1 w homogenacie tkankowym (odpowiednio w supernatancie i osadzie homogenatu po przeprowadzeniu lizy i wirowaniu z szybkością 6000 rpm) wykorzystano metodę immunoenzymatyczną ELISA. Przy pomocy tych samych zestawów ELISA przeprowadzono oznaczenie ilości TNF i TNFR1 w surowicy. Na poziomie mRNA oznaczono tylko ekspresję TNFR1 przy pomocy metody ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR). Ekspresję i lokalizację TNFR1 potwierdzono również w neuronach, mikrogleju i astrocytach pnia mózgu stosując barwienie immunofluorescencyjne i odpowiednie przeciwciała pozwalające na identyfikację receptora w tych komórkach. Stężenie noradrenalinę zmierzono w osoczu za pomocą zestawu ELISA.

Metody badawcze Doktorantka opisała w 19 stronicowym rozdziale i zilustrowała je dwoma schematami graficznymi przedstawiającymi protokoły pomiarowe. Opis jest jasny, czytelny i szczegółowy. Doktorantka szeroko uzasadnia wybór modelu do badań oraz dawki podawanych substancji. W pracy zapewniono właściwe kontrole, liczba zwierząt w poszczególnych grupach jest wystarczająca i powszechnie akceptowana w badaniach w modelach zwierzęcych. Na szczególną pochwałę zasługuje szczegółowa i rzetelna analiza statystyczna przeprowadzona w pracy oraz szczegółowy opis narzędzi statystycznych użytych do analizy danych zamieszczony w tekście pracy i pod każdą ryciną. Z opisu wynika, że Doktorantka doskonale rozumie i posługuje się zaawansowanymi narzędziami analizy statystycznej. Warto również podkreślić, że Doktorantka pracowała przy użyciu trudnego modelu badawczego wymagającego precyzyjnej instrumentacji zwierząt, co wymaga dużych umiejętności technicznych i nakładu pracy.

Uzyskane przez Doktorantkę **Wyniki** zostały przedstawione na 10 rycinach i w 6 tabelach. Doktorantce udało się wykazać, że w modelu nadciśnienia pierwotnego (SHR):

- Szczury SHR charakteryzowały się istotnie niższą czułością odruchu z baroreceptorów tętnicznych i istotnie wyższą czułością odruchu z chemoreceptorów obwodowych niż szczury normotensyjne WKY;



- Infuzja TNF do układu komorowego mózgu skutkowała istotnym wzrostem średniego ciśnienia tętniczego (MABP) u szczurów SHR i stabilizacją MABP względem obserwowanego spadku MABP po podaniu soli fizjologicznej u szczurów WKY;
- Stężenia TNF i TNFR1 w surowicy były niższe niż próg oznaczalności zastosowanej metody zarówno u szczurów SHR, jaki i WKY;
- Stężenie noradrenaliny w osoczu krwi obwodowej nie różniło się pomiędzy szczurami SHR i WKY;
- Ekspresja TNF na poziomie białka w obszarze brzuszynym (VM) i grzbietowym (DM) rdzenia przedłużonego była istotnie wyższa u szczurów SHR niż WKY i porównywalna w obu grupach w podwzgórzu;
- Ekspresja TNF była wyższa w obu obszarach rdzenia przedłużonego niż w podwzgórzu zarówno u szczurów SHR, jak i WKY;
- Ekspresja TNFR1 na poziomie białka była wyższa u szczurów SHR niż WKY jedynie w obszarze grzbietowym rdzenia przedłużonego;
- Ekspresja TNFR1 jest porównywalna w obszarach rdzenia i podwzgórza u szczurów WKY i wyższa w części grzbietowej rdzenia niż w pozostałych ośrodkach u szczurów SHR;
- Ekspresja TNFR1 na poziomie mRNA jest porównywalna we wszystkich badanych obszarach krążeniowych mózgowia zarówno u szczurów SHR, jak i WKY.

Prezentacja wyników jest bardzo staranna. Doktorantka zdecydowała się na przedstawienie danych bez względu na ich rozkład na wykresach pudełkowych z zaznaczeniem mediany, średniej, przedziałów kwartylowych oraz wartości maksymalnej i minimalnej. Przed publikacją wyników pracy, warto również zaznaczyć na wykresach wszystkie punkty pomiarowe, co dzisiaj staje się powszechnym wymogiem podczas submisji prac do czasopism o wysokim współczynniku oddziaływania. W moim odczuciu również nie jest potrzebne przedstawienie tych samych wyników w tabeli, na rycinie i w tekście pracy tak jak np. zrobiła to Autorka w przypadku Ryciny 6 i Tabeli 2.

**Dyskusja** jest 16 stronicowym opracowaniem, w którym Doktorantka z dużą świadomością omawia i konfrontuje swoje wyniki z danymi literaturowymi. Podobnie jak pozostałe rozdziały pracy Dyskusja jest napisana dobrym językiem i świadczy o dużej wiedzy Doktorantki na temat omawianych zagadnień. Dyskusję kończy rozdział **Ograniczenia pracy**. Przyznaję, że Doktorantka wymieniła i podjęła próbę uzasadnienia wszystkich ograniczeń, które nasunęły mi się podczas lektury tej pracy, co świadczy o jej krytycznym podejściu do wyników własnych badań, a jest to podejście dojrzałych badaczy. Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników sformułowała 7 **wniosków**, które odpowiadają postawionym w pracy celom.

W trakcie lektury tej ciekawej pracy nasunęło mi się kilka pytań i komentarzy.



1. Doktorantka pokazała istotny wzrost ciśnienia u szczurów SHR po podaniu TNF do komory bocznej mózgu w porównaniu do szczurów SHR, którym podano sól fizjologiczną. Natomiast u szczurów normotensyjnych WKY efekt presyjny podania TNF jest nieznaczny i Doktorantka opisuje go jako jedynie stabilizację ciśnienia w stosunku do jego bardziej nasilonego spadku u szczurów WKY po podaniu soli. Doktorantka tłumaczy spadek MABP długotrwałym działaniem narkozy. Jednak w innych pracach cytowanych przez Doktorantkę u szczurów uspionych przy pomocy narkozy uretanowej nie obserwowano spadku ciśnienia, a po podaniu TNF do mózgowia efekt presyjny był wyraźny (pozycje literatury 35, 144, 147) również w długiej (180 min) obserwacji. Takiego spadku MABP nie obserwowano również u szczurów normotensyjnych uspionych pentobarbitolem w długiej obserwacji. Czy może mieć na to wpływ miejsce podania TNF (komora boczna w pracy Doktorantki vs. narządy okołokomorowe w cytowanych pracach)? Czy Doktorantka może przy okazji innych badań prowadzonych w Zespole dysponującym zestawem do zdalnej rejestracji parametrów hemodynamicznych (publikacje cytowane pod numerami 139 i 142), miała szanse sprawdzić choć u pojedynczych zwierząt wpływ TNF podanego dokomorowo u czuwających szczurów SHR i WKY?
2. Dużą zaletą tej pracy jest podjęcie się zbadania ekspresji TNF i jego receptora typu 1 na poziomie białka odrębnie w poszczególnych obszarach ośrodków krążeniowych. Doktorantka pokazała, że ilość TNF rośnie u szczurów SHR zarówno w brzuszonym, jak i grzbietowym obszarze rdzenia przedłużonego zawierającym odpowiednio ośrodki RVLM i NTS. Natomiast ekspresja TNFR1 rośnie tylko w obszarze grzbietowym. Sugeruje to mniejszą dostępność receptora dla TNF w obszarze RVLM? Czy Doktorantka mogłaby spróbować przedyskutować sens biologiczny takiej regulacji?
3. TNF może występować w formie rozpuszczalnej powstającej w wyniku działania enzymu konwertującego TACE na błonową formę cytokiny. Obie formy mogą aktywować receptory dla TNF. Również receptor typu 1 dla TNF może występować w formie błonowej i w formie rozpuszczalnej. Czy Doktorantka jest pewna, że oznaczając ekspresję TNF wyłącznie w supernatancie a TNFR1 wyłącznie w homogenacie zidentyfikowała wszystkie formy TNF i jego receptora? Może warto by było wykonać oznaczenia zarówno TNF, jak i TNFR1 i w supernatancie i w homogenacie aby taką pewność uzyskać. Czy wiadomo jak forma TNF przeważa w ośrodkach krążeniowych rozpuszczalna, czy błonowa? Czy proporcja tych form może zmieniać się u szczurów hipertensyjnych np. w związku ze zmienioną aktywnością TACE? Czy rozwój nadciśnienia może mieć wpływ również na proporcję formy błonowej i rozpuszczalnej receptora?
4. Badania w pracy były przeprowadzone wyłącznie na osobnikach płci męskiej. Czy w literaturze są doniesienia (lub Doktorantka ma własne doświadczenia) na temat odmiennego wpływu TNF



lub innych cytokin prozapalnych na regulację ciśnienia u samców i u samic. Są bowiem dane sugerujące że znaczenie roli układu immunologicznego w progresji nadciśnienia może być zależne od płci. Stwierdzono na przykład odmienną ekspresję *Toll-like Receptors* w nerkach i tętnicach kreskowych u szczurów SHR. Zaobserwowano również, że podanie limfocytów T pochodzących od samców, ale nie od samic, częściowo odtwarza podatność myszy pozbawionych genetycznie limfocytów T i B (myszy Rag1<sup>-/-</sup>) na rozwój nadciśnienia wywołanego Angiotensyną II lub nefrektomią i dietą wysokosolną.

**Reasumując, rozprawę doktorską lek. Moniki Sieget-Święcickiej oceniam wysoko z powodu:** (1) wyboru ważnego i obecnie bardzo intensywnie badanego zagadnienia roli układu immunologicznego w patomechanizmie rozwoju nadciśnienia technicznego; (2) istotnego poszerzenia wiedzy o roli TNF i jego receptora w tym procesie ze szczegółową analizą ekspresji TNF i jego receptora w poszczególnych obszarach mózgowia; (3) przeprowadzenia badań w trudnym technicznie modelu eksperymentalnym.

Zabrakło mi próby zbadania mechanizmu presyjnego działania TNF podanego dokomorowo chociażby przez podanie TNF na tle jego inhibitorów, aby udowodnić lub wykluczyć jego działanie na drodze receptorowej chociażby, jak pisze Doktorantka w rozdziale *Ograniczenia pracy*, dotyczyłoby to głównie potwierdzenia lub wykluczenia działania poprzez receptory narządów okołokomorowych. Uważam również, że samo oznaczenie naoradrenaliny w osoczu jest niewystarczającym i mało miarodajnym parametrem obrazującym nasilenie aktywności współczulnej komponenty układu nerwowego. Często wzrost stężenie noradrenaliny w tkankach wyprzedza wzrost jej stężenia we krwi i warto by to stężenie również zmierzyć. Jednak są to raczej wskazówki, które mogą być pomocne przy publikacji wyników i nie umniejszają niewątpliwej wartości przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej.

**Ostatecznie stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Moniki Sieget-Święcickiej spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki ( Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.) W związku z tym, z przekonaniem, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Moniki Sieget-Święcickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Dyrektor Szkoły Kształcenia Doktorantów – Dziekan  
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego

  
dr hab. n. med. Urszula Mackiewicz, prof. CMKP