



Bydgoszcz, 13 maja 2019 r.

Katedra Higieny, Epidemiologii i Ergonomii
Zakład Ergonomii i Fizjologii Wysiłku Fizycznego
ul. M. Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz
e-mail: p.zalewski@cm.umk.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lekarz medycyny Oleny Wojno, pt.: *Interakcja układu apelinergicznego i wazopresynergicznego w regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego u szczurów na diecie wysokotłuszczowej.*

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Agnieszki Cudnoch-Jędrzejewskiej, na I Wydziale Lekarskim Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Projekt badawczy, którego częściowym rezultatem jest, m.in. przedłożona do recenzji praca, został sfinansowany z grantu Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM 11 (UMO-2016/21/N/NZ4/03758).

Zasadnicze zagadnienia pracy dotyczą roli ośrodkowego układu nerwowego w regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego za pośrednictwem złożonych neuronów sercowo-naczyniowych, które mają swoją reprezentację w wielu obszarach mózgu, podwzgórza i rdzenia przedłużonego. Do najistotniejszych, dotąd poznanych elementów ośrodkowej kontroli układu sercowo-naczyniowego można zaliczyć: dogłównie brzuszno-boczną część rdzenia przedłużonego (RVLM), doogonowy brzuszno-boczny obszar rdzenia przedłużonego (CVLM), jądra przykomorowe (PVN), jądro pasma samotnego (NTS) oraz jądro olbrzymiokomórkowe, tylne jądra szwu, obszar noradrenergiczny A5 mostu oraz jądro dwuznaczne. Część z wymienionych struktur stanowią specyficzne elementy autonomicznego układu nerwowego ściśle kontrolujące obwodowe mechanizmy odruchów z baroreceptorów i chemoreceptorów tętnicznych. Aktywność autonomicznego układu nerwowego



w zakresie kontroli ciśnienia tętniczego i częstości skurczów serca, cechuje się tonicznym i specyficznym oddziaływaniem na obwodowe efekторы układu sercowo-naczyniowego. Zaburzenia czynnościowe autonomicznego układu nerwowego mogą stanowić odrębne jednostki chorobowe, jednakże bardzo często stanowią integralny element patomechanizmu wielu chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym nadciśnienia tętniczego, zaburzeń rytmu serca, choroby niedokrwiennej serca oraz większości chorób metabolicznych, część z nich określane są mianem chorób cywilizacyjnych. Zaburzenia metaboliczne oraz zaburzenia czynnościowe ze strony autonomicznego układu nerwowego będące składowymi, m.in. nadciśnienia tętniczego czy otyłości, często mają charakter subkliniczny, poprzedzając na wiele lat wcześniej, wystąpienie określonych objawów klinicznych. Stąd badania podstawowe w zakresie szczegółowego przebiegu tych patomechanizmów są niezwykle istotne. Poznanie złożoności i zależności tych procesów umożliwia wdrożenie działań już na etapie profilaktyki pierwotnej, hamując lub ograniczając proces patogenezy tychże schorzeń.

Niewątpliwie, jedną z najistotniejszych chorób cywilizacyjnych stanowi otyłość, która dotyka znacznego odsetka populacji krajów wysokorozwiniętych. Przyczyny występowania otyłości są złożone, do najważniejszych należy brak równowagi między spożywanymi a wydatkowymi kaloriami, spowodowany nadmiernym przyjmowaniem pokarmów, w szczególności tych bogatych w węglowodany proste, tłuszcze, szereg szkodliwych związków smakowych i konserwujących. Dodatkowo, ograniczenie wzmożonej i regularnej aktywności fizycznej, będącej najważniejszym czynnikiem regulacyjnym procesów metabolicznych obok zbilansowanej diety, przyczynia się w sposób drastyczny do powstawania i progresji praktycznie większości chorób cywilizacyjnych.

Rola układu wazopresynergicznego w patogenezie wielu chorób metabolicznych, jest bezsporna i udokumentowana licznymi badaniami w tym zakresie. Jednakże wciąż istnieje szereg niepoznanych mechanizmów oddziaływania wazopresyny na poziomie ośrodkowego układu nerwowego oraz jej rola, np. w patomechanizmie nadciśnienia tętniczego. Z kolei, inne doniesienia wskazują na aktywność biologiczną układu apelinergicznego w regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego i w metabolizmie węglowodanów, jako niezwykle istotny element w zrozumieniu modulującego wpływu otyłości na ośrodkowy układ nerwowy. Apelina, a w szczególności jej wpływ na układ



wazopresynergiczny, może stanowić ważny czynnik łączący patomechanizm zależności otyłości i chorób sercowo-naczyniowych.

Podjęty przez Doktorantkę temat badawczy jest interesujący poznawczo ale również istotny z punktu widzenia możliwości aplikacji uzyskanych wyników badań w praktyce klinicznej. Badania podstawowe, zwłaszcza tak złożone eksperymenty na modelach zwierzęcych, niejednokrotnie stanowiły punkt wyjścia do rozważań nad przebiegiem szeregu procesów chorobowych w populacji ludzkiej. Podjęty temat jest również ściśle związany z wykształceniem i obszarem dociekań naukowych Doktorantki.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lekarz medycyny Oleny Wojno jest bardzo starannie zredagowanym wydrukiem opracowania komputerowego. Dysertacja została przygotowana na wysokim poziomie edytorskim; liczy 123 strony tekstu, zredagowanego poprawnie zarówno pod względem językowym i rzeczowym; zawiera 33 ryciny, które w sposób przejrzysty i zrozumiały obrazują przedstawione zagadnienia; składa się z 7 rozdziałów wraz z właściwymi dla nich podrozdziałami. Na uwagę zasługują zakres wykorzystanego piśmiennictwa, liczący aż 256 pozycji. Literatura przedmiotu została dobrana i wykorzystana umiejętnie i spójnie, co świadczy o dogłębnej znajomości przedmiotu rozprawy. Opis bibliograficzny został poprawie zastosowany, zgodnie z metodyką *Vancouver reference style*, w kolejności następowania odwołania. Praca zawiera wykaz zastosowanych oznaczeń i akronimów, co jest pomocne przy jej lekturze.

Zastosowany układ pracy jest konwencjonalny dla tego typu opracowań naukowych, powszechnie wykorzystywany w dysertacjach doktorskich z dziedziny medycyny.

Wstęp pracy został przygotowany w sposób spójny i syntetyczny. Doktorantka ustrzegła się nadmiernego rozpisywania i skupiła się na opisie tylko niezbędnych w analizie przedmiotu, zagadnień. Obszar rozważań zawartych we Wstępie dotyczył opisu podstawowych elementów układu wazopresynergicznego i apelinergicznego, a w szczególności istotnego udziału układu apelinergicznego w regulacji aktywności neuronów wazopresynergicznych. Występowanie takiej zależności pozwala przypuszczać o istnieniu ośrodkowej interakcji między układem apelinergicznym



i wazopresynergicznym, najprawdopodobniej odgrywającej istotną rolę w regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego.

Założenia i cele pracy zostały sformułowane prawidłowo i w sposób rzeczowy przedstawiają analizowane zagadnienia. Doktorantka wskazała ceł główny pracy oraz uzupełniające cele szczegółowe, których zrealizowanie pozwoliło na wykazanie roli interakcji układu wazopresynergicznego i apelinergicznego w ośrodkowej regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego u normotensyjnych szczurów Sprague Dawley na diecie standardowej lub wysokotłuszczowej. Realizacja celów szczegółowych opierała się o kompleksową ocenę odpowiedzi hemodynamicznej na serie infuzji dokomorowych określonych czynników stymulujących oraz wpływ zastosowanej diety na ekspresję wybranych sekwencji mRNA oraz stężenie swoistych białek w ośrodkowym układzie nerwowym i osoczu. Za niepotrzebne w tym punkcie dysertacji, wydaje się być powielanie niektórych informacji podanych już we wstępie, założenia powinny mieć bardziej charakter hipotez badawczych niż opisu przedmiotu badań.

Metodyka badań została przygotowana bardzo starannie i zrozumiale wraz z zastosowaniem właściwych podrozdziałów i uszczegółowień. Doktorantka zastosowała ryciny, które w sposób odpowiedni obrazują przebieg wszystkich procedur badawczych. Materiał badawczy stanowiło 100, 4-tygodniowych, normotensyjnych szczurów szczepu Sprague Dawley (SPRD/Mol/Lod), płci męskiej. Zwierzęta przebywały pojedynczo w klatkach, w wystandaryzowanych dla tego rodzaju eksperymentów warunkach środowiskowych. Zwierzęta od czwartego tygodniu życia, po odstawieniu od matki, były karmione przez 9 tygodni paszą standardową – NFD (n=48); lub wysokotłuszczową – HFD (n=52), przygotowaną na bazie NFD. Dla celów badań biochemicznych i molekularnych grupę badanych osobników zwiększono o n=16, odpowiednio po 8 osobników do każdej z grup. Projekt uzyskał pozwolenie od II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (6/2013) i był zgodny z dyrektywą UE 2010/63/UE dotyczącą badań na zwierzętach.

W toku eksperymentu przeprowadzono szereg kompleksowych procedur badawczych, które w pełni odpowiadały postawionym przez Doktorantkę celom szczegółowym. U osobników żywych obejmowały: procedury pomiaru masy ciała, procedury chirurgiczne z seriami infuzji dokomorowych wraz z przeprowadzoną synchronicznie analizą zmienności parametrów hemodynamicznych oraz pobranie krwi żyłnej; procedury pośmiertne obejmowały pomiary masy ciała, mikroskopowa ocenę adipocytów tkanki tłuszczowej, badania biochemiczne i molekularne. Charakterystyka procedur została



przedstawiona przejrzysto i wyczerpująco, a procedury zostały wykonane zgodnie z obowiązującymi standardami dla tego typu badań. Weryfikacja procedur chirurgicznych została przeprowadzona w oparciu o ocenę wybarwienia układu komorowego mózgu badanych szczurów.

Zastosowane metody statystyczne nie budzą zastrzeżeń. Testy statystyczne zostały dobrane odpowiednio, z uwzględnieniem charakterystyki równości i jednorodności wariancji oraz liczby porównań analizowanych zmiennych.

Wyniki zostały przedstawione w sposób kompleksowy, czytelny i spójny. Prezentacja uzyskanych wyników odpowiada kolejno zastosowanym procedurom badawczym, daje to możliwość łatwego i zrozumiałego ich odniesienia do listy postawionych przez Doktorantkę *celów szczegółowych*.

Dyskusja i Wnioski przedstawionych wyników eksperymentu została przeprowadzona przez Doktorantkę w sposób bardzo kompleksowy. Doktorantka przeprowadziła szczegółową dyskusję każdego z aspektów przeprowadzonego eksperymentu. Doktorantka wykazała się biegłą znajomością zagadnień stanowiących istotę podjętego projektu badawczego, m.in. poprzez prawidłowe wykorzystanie odniesień do piśmiennictwa. Dyskusja jest konsekwentna i wielowymiarowa, co pozwoliło na wykazanie obecności ośrodkowej interakcji między układem apelinergicznym i wazopresynergicznym odgrywającej istotną rolę w regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego u szczurów szczepu SPRD na diecie standardowej lub wysokotłuszczowej. Doktorantka wykazała, że presyjny efekt ośrodkowo podanej apeliny-13 został zniesiony przez poprzedzającą infuzję antagonisty V1aR. Efekt ten był obserwowany jedynie u szczurów na diecie standardowej. U zwierząt będących na diecie wysokotłuszczowej nie obserwowano istotnych zmian ciśnienia tętniczego. Dowiedziono również, że dokomorowa infuzja wazopresyny przyczynia się do istotnego wzrostu ciśnienia tętniczego w obu grupach zwierząt. Natomiast, jedynie u szczurów na diecie wysokotłuszczowej obserwowano zniesienie presyjnego efektu wazopresyny po wcześniejszym podaniu antagonisty receptora APJ apeliny. Wpływ dokomorowo podanych substancji na regulację parametrów hemodynamicznych zdeterminowany był w dużym stopniu przez dietę wysokotłuszczową, która w sposób istotny zmieniała ekspresję mRNA i poziom białek receptorów APJ, V1a i V1b w podwzgórzu i w rdzeniu przedłużonym, a tym samym wpłynęła na interakcję między układami apelinergicznym i wazopresynergicznym odgrywającej rolę w ośrodkowej regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego. Stąd konkluzja końcowa, wskazuje, że postawione przez Doktorantkę założenia zostały potwierdzone a cele badawcze



w pełni zrealizowane. Jestem przekonany, że przedstawione zagadnienie badawcze może z powodzeniem stanowić materiał do wartościowej publikacji naukowej.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zadać kilka pytań dotyczących pracy, uściślenie i wyjaśnienie niektórych zagadnień może przyczynić się do lepszego przygotowania przyszłej publikacji i nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji:

1. Uzyskane wyniki badań na modelu zwierzęcym wydają się być obiecujące w perspektywie zastosowania ich w praktyce klinicznej w populacji ludzkiej. Jednak doświadczenia innych badaczy wskazują, że przeniesienie wprost modeli zwierzęcych do badań klinicznych, napotyka często na wiele trudności. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować potencjalne obszary badań klinicznych, w których uzyskane wyniki miałyby zastosowanie?
2. Przedstawiona praca została przygotowana pod wieloma względami na wysokim poziomie, jednak każdy eksperyment badawczy i przeprowadzone wnioskowanie mają swoje ograniczenia. Czy Doktorantka mogłaby wskazać potencjalne ograniczenia pracy?
3. Procedura chirurgiczna obejmowała serie infuzji dokomorowych. Wiadomym jest fakt, że podanie czynników modulujących wg opisanej metodyki może oddziaływać na więcej struktur niż tylko obszar poddany obserwacji, w tym przypadku jąder przykomorowych. Czy zasadnym nie byłby wybór metod izolowanego oddziaływania na specyficzne obszary mózgowia?
4. Z opisanej metodyki wynika, że zapis parametrów hemodynamicznych był przeprowadzony w sposób ciągły *beat-to-beat*, taka charakterystyka sygnału stwarza szersze możliwości analityczne. Czy możliwe byłoby zastosowanie metod nieliniowych w analizie odpowiedzi układu sercowo-naczyniowego na dynamicznie zmieniające się warunki środowiska wewnętrznego analizowanych układów biologicznych?

Moja ogólna ocena rozprawy lekarz medycy Oleny Wojno jest wysoka. Doktorantka wykazała się wyjątkową starannością oraz konsekwencją w realizacji projektu badawczego i przygotowaniu rozprawy. Przedmiot pracy jest interesujący i wnosi istotne wartości poznawcze. Doktorantka zachowała odpowiednie proporcje treści i formy przedstawionych zagadnień, metod przedstawienia wyników, dyskusji i wniosków końcowych, co przemawia za jej dojrzałością jako badaczki i naukowca.



Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882 z późn. zm.) oraz rekomenduje Wysockiej Radzie I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dopuszczenie lekarz medycyny Oleny Wojno do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Recenzowana praca cechuje się wyjątkową wartością poznawczą i godną pochwały konsekwencją, stąd wnoszę o przyznanie wyróżnienia w uznaniu jej wartości naukowych.

Dr hab. Paweł Zalewski, prof. UMK