

Recenzent: Prof. dr hab. Jan Konopacki  
Recenzja sporządzona dnia: 31. 07. 2023 r.

## Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Sanetry pt.:

### **„Circadian and prandial rhythm of the rat Dorsomedial Hypothalamus under high-fat diet”**

wykonanej w Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego  
pod kierunkiem  
prof. dr hab. Mariana Lewandowskiego

#### **1. Uwagi ogólne**

Badania ostatnich kilkunastu lat wskazują, że wewnętrzny zegar biologiczny może być przyczyną wielu chorób, w tym wysokiego ciśnienia krwi, odporności na insulinę oraz otyłości. Badania te ujawniły również obecność dodatniego sprzężenia między zbyt dużą lub zbyt małą ilością snu a otyłością i chorobami układu krążenia. Uważa się obecnie, że tzw. zespół metaboliczny jest chorobą mózgu. Pogląd ten może mieć wpływ na sposoby leczenia chorób takich jak otyłość czy nadciśnienie, ponieważ wiążą je z zakłóceniami ośrodkowego zegara biologicznego.

Pomimo znacznego postępu w leczeniu, częstość występowania przypadków nadwagi stale rośnie. Uważa się, że w Polsce jest obecnie ponad 25% ludzi otyłych. Jest to następstwo m. in. sprzyjającego otyłości środowiska i promocji wysoce przetworzonego i kalorycznego pokarmu. Z tego względu otyłość zależna od diety jest obecnie najczęściej wykorzystywanym modelem eksperymentalnym w badaniach etiologii tej choroby. Bez wątplenia badania nad ośrodkowymi mechanizmami leżącymi u podstaw otyłości są wyzwaniem współczesności i z tego względu powinny być z uwagą odnotowywane.

#### **2. Charakterystyka rozprawy**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska adresuje powyżej przedstawione problemy. Rozprawa ma niestandardową strukturę. Tworzą ją: zgrabnie napisany wstęp, metoda, wyniki oraz dyskusja w języku angielskim. Dodatkowo doktorantka zamieściła cykl 3 prac naukowych opublikowanych w European J. Neurosci.; Nutriens oraz Molecular and Cellular Neurosci., o sumarycznym wskaźniku oddziaływania (IF) wynoszącym ponad 15. Autorka zamieściła również bardzo dobrze zredagowane streszczenia - w języku polskim i angielskim oraz spis stosowanych skrótów. Całość jest bardzo starannie wykonana pod względem edytorskim i dobrze zredagowana. Uważam jednak, że przedstawiona forma rozprawy doktorskiej jest za obszerna. Nie straciłaby na jakości

gdyby doktorantka zdecydowała się na zamieszczenie nieco bardziej rozszerzonego streszczenia w języku polskim oraz trzech opublikowanych prac.

Piszący recenzję miał ułatwione zadanie. Badania przedstawione w rozprawie zostały bowiem wcześniej krytycznie ocenione przez co najmniej 6 recenzentów a wysoki łączny IF pism, w których zostały opublikowane wyniki określa bardzo wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań.

Przedmiotem zainteresowania doktorantki było grzbietowo-przyśrodkowe jądro podwzgórza (DMH), struktura, która uważana jest za klasyczny ośrodek sytości. Wcześniejsze badania przeprowadzone na gryzoniach wykazały, że okolica ta jest szczególnie wrażliwa na restrykcyjne podawanie pokarmu, umożliwiające przewidywanie dostępu do posiłku. Głównym celem przeprowadzonych przez mgr Annę Sanetrę eksperymentów była charakterystyka DMH szczurów pod kątem rytmu biologicznego tej struktury wywołanego antycypacją pokarmową. Drugim celem badań było określenie zmian fizjologicznych DMH wywołanych wysoko tłuszczową dietą (HFD) przed pojawieniem się symptomów otyłości. Zdefiniowane klarownie cele naukowe realizowane były w 3 obszarach: 1/ elektrofizjologicznej charakterystyki DMH, występowania rytmów okołodobowych oraz około-posiłkowych, 2/ badania zmian w DMH pojawiających się przy ekspozycji zwierząt na wysokotłuszczową dietę, 3/ próby korekty wewnętrznej rytmiki DMH, zaburzonej przez HFD.

Badania przeprowadzono metodą hybrydową (*ex vivo*) na 4-8 tygodniowych szczurzych samcach w dwóch fazach. Pierwszą fazę stanowiły klasyczne eksperymenty *in vivo*, w których zwierzęta poddane były ekspozycji na określony rodzaj diety: kontrolnej lub HFD. Druga faza to eksperymenty *in vitro* polegające na sekcjonowaniu i utrzymywaniu w warunkach pozaustrojowych skrawków mózgowych zawierających DMH. Rejestracje elektrofizjologiczne z pojedynczych neuronów wykonywano techniką patch-clamp. W badaniach zastosowano m. in. metodę rejestracji zewnątrzkomórkowej przy pomocy wielu elektrod, barwienie immuno-fluorescencyjne oraz technikę oceny aktywności neuronalnej przy użyciu białka cFos. Muszę przyznać, że jestem pełen uznania dla doktorantki. Praca w zespole naukowym wykorzystującym liczne i bardzo trudne techniki laboratoryjne wymagała od mgr Anny Sanetry umiejętności pracy w zespole oraz znakomitego teoretycznego przygotowania i opanowania dużej liczby metod laboratoryjnych w ograniczonym czasie reżymu szkoły doktorskiej.

Przeprowadzone badania wykazały po raz pierwszy zmiany w fizjologii DMH u zwierząt eksponowanych na HFD. Podwyższony poziom częstotliwości wyładowań komórkowych w DMH w okresie nocnym był blokowany u tych zwierząt, które eksponowane były na HFD przez 2-4 tygodnie. Co więcej, HFD obniżała próg pobudliwości komórkowej w fazie jasnej powodując podwyższenie częstotliwości wyładowań komórkowych. Tak więc HFD *per se* wywoływała zmiany w rytmice okołodobowej aktywności komórkowej DMH. Wynik ten uważam za nadzwyczaj cenny. Ma on bowiem poza walorami naukowymi istotne znaczenie terapeutyczne.

Powyzsza tematyka kontynuowana była w kolejnym obszernym cyklu badawczym. Badano wpływ HFD na zmiany aktywności neuronalnej DMH adresując głównie zmiany w cyklu dzień/noc. Okazało się, że cykl specyficznej aktywności neuronalnej DMH ulega zaburzeniu po 4 tygodniach pobierania HFD, to znaczy jeszcze przed pojawieniem się

wzrostu masy ciała. Jak słusznie zauważa doktorantka, wyniki te sugerują, że zaburzenie aktywności DMH jest bezpośrednim czynnikiem indukującym otyłość. Co więcej, w obecności HFD aktywność komórkowa DMH podwyższała się podczas dnia, gdy aktywność eksploracyjna zwierząt była relatywnie mała. W osobnych doświadczeniach, w których zastosowano ograniczenie dostępu do pokarmu tylko do fazy ciemnej, obserwowano zniesienie negatywnego wpływu HFD na zegar biologiczny DMH określający zwyczaje posiłkowe zwierząt.

Prezentowany cykl prac kończą bardzo ciekawe badania farmakologiczne poświęcone sygnalizacji za pośrednictwem pochodnych proglukagonu (PGDP). Jako agonistę receptora GLP1 zastosowano exendin-4 (Exn-4) i oxyntomodulinę (Oxm), należącą do grupy hormonów w jelitowych, które pełnią w organizmie kilka funkcji, między innymi wpływają na proces trawienia i apetyt. Jak się okazało, większość wrażliwych na PGDP neuronów DMH wykazywała podwyższenie stopnia wyładowań w odpowiedzi na podanie Exn-4 oraz Oxm. W obecności HFD wrażliwość tych neuronów na wspomniane białka uległa zanikowi.

### **3. Uwagi i pytania**

Na str. 33 (Ryc. 2a) pierwszej pracy autorka opisuje bardzo ciekawie zachowującą się subpopulację neuronów (15%). Podzielałam wątpliwość autorki. Za zdrowe uważa się neurony, które spontanicznie (bez prądu hyperpolaryzującego) generują potencjał spoczynkowy ok -50 mV. Podobne kryterium przyjęli wspomniani przez autorkę Bailey i wsp. Pokazane na Ryc. 2a dwa neurony zachowywały się przy potencjale -40 i -45 mV podobnie. Jednak w drugim neuronie przy potencjale -45 pojawiały się rytmiczne oscylacje (DLAMO) podobne do tych, które pojawiły się przy prawie identycznym potencjale (-46 mV) w drugim neuronie. Wspomniane rytmiczne oscylacje (DLAMO) w pierwszym neuronie pojawiły się przy iniekcji prądu hyperpolaryzującego do -46mV a w drugim spontanicznie. Co ciekawe, pomimo znacznego stopnia zdepolaryzowania, neurony te uznać należy raczej za zdrowe na co wskazuje oporność wejściowa. Jeżeli tak, to DLAMO pojawia się w tych neuronach przy ściśle zdefiniowanym oknie potencjału błonowego (45-46mV). Problem związku tych neuronów z cyklem okołodobowym oraz oscylatorem pokarmowym pozostaje sprawą otwartą. Byłbym ciekawy stanowiska doktorantki w poruszanej kwestii.

### **4. Podsumowanie**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dowodzi, że mgr Anna Sanetra jest doskonale przygotowana pod względem teoretycznym jak również znajomości wielu trudnych technik laboratoryjnych do dalszej pracy naukowej. Duża erudycja autorki sprawiła, że prezentowane prace zostały napisane w sposób bardzo starannie przemyślany i doskonałym językiem angielskim. Recenzowana rozprawa doktorska stanowi przemyślane koncepcyjnie, dobrze wykonane i opisane rozwiązanie istotnego problemu naukowego. Całość składa się na wartościową i dojrzałą pracę naukową. Autorka wykazała się doskonałą znajomością literatury a cytowane w zgłoszonych pracach naukowych pozycje piśmiennictwa to prace bardzo starannie przez autorkę wyselekcjonowane.

Należy odnotować, że cykl badań przedstawiony w rozprawie doktorskiej został sfinansowany w ramach trzech projektów, w tym środków z Narodowego Centrum Nauki, Grant OPUS13. Wyniki uzyskane przez doktorantkę jednoznacznie wskazują na znaczny związek występowania otyłości z wczesnymi zmianami w aktywności pojedynczych neuronów DMH tworzących ośrodkowy zegar biologiczny.

#### **5. Wniosek końcowy**

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r., poz. 478, 619, 1630). Na tej podstawie przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie mgr Anny Sanetry do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bardzo wysoki poziom naukowy przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz fakt, że przedstawiona została ona jako cykl prac opublikowanych w bardzo dobrych pismach z listy JCR upoważnia mnie do wystąpienia dodatkowo z wnioskiem o stosowne jej wyróżnienie.

Łódź, dnia 31. 07. 2023 r.

  
Prof. dr hab. Jan Konopacki