



Prof. dr hab. Krzysztof Tokarski

Kraków 18.08.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Sanetra pt: "Circadian and periprandial rhythms of the rat Dorsomedial Hypothalamus under high-fat diet"

Imię i nazwisko kandydata: mgr Anna Sanetra

Tytuł rozprawy doktorskiej: *"Circadian and periprandial rhythms of the rat Dorsomedial Hypothalamus under high-fat diet"*

Promotor: prof. dr hab. Marian Lewandowski

Promotor pomocniczy/drugi promotor/kopromotor (jeżeli powołany): dr Katarzyna Palus

Recenzent: prof. dr hab. Krzysztof Tokarski

Przedstawiona do recenzji praca Pani mgr Anny Sanetry „*Circadian and periprandial rhythms of the rat Dorsomedial Hypothalamus under high-fat diet*” powstała pod kierunkiem prof. dr hab. Mariana Lewandowskiego i dr Katarzyny Palus w Zakładzie Neurofizjologii i Chronobiologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego. Praca ma charakter zbioru tematycznie powiązanych artykułów naukowych opatrzonych rozszerzoną dyskusją i wstępem. Napisana została w języku angielskim.

1. Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań (25-200 słów):

Badania zaprezentowane w pracy są interesujące i naukowo istotne. Autorka skupiła się na badaniu właściwości grzbietowo-przyśrodkowego podwzgórza (ang. *dorsomedial hypothalamus*; DMH) – struktury zaangażowanej między innymi w pobieranie pokarmu, a regulowanej przez szereg czynników takich jak dostępność pożywienia, stan metaboliczny (głód i sytość) czy rytmy okołodobowe. Badanie tychże rytmów jest istotnym elementem pracy, ze względu na powiązanie zaburzeń odżywiania z zaburzeniami rytmiki okołodobowej.

Wartość dzieła w związku z tym wynika z dwóch przesłanek. Po pierwsze: czysto podstawowej, opartej o lepsze poznanie architektury i własności poszczególnych części DMH, poszerzenie wiedzy o rytmiczności zachodzących tam procesów i wpływie perturbacji związanych z dietą czy zaburzonym okołodobowym wzorcem aktywności. Po drugie: klinicznej, związanej z sygnalizacją za pośrednictwem neuropeptydów z rodziny pochodnych glukagonu. Agoniści receptorów GLP1R (dla których ligandami są wspomniane neuropeptydy) są wysoce



skutecznymi, lecz również kontrowersyjnymi, lekami używanymi m.in. w terapii otyłości. Przedstawione badania poszerzają wiedzę o chronobiologicznym, okołodziennym aspekcie działania tych leków i mogą być – zdaniem Autorki – w przyszłości przydatne dla ulepszenia farmakoterapii zaburzeń odżywiania.

Wspomniane cele są dobrze zdefiniowane, a następnie dogłębnie przedyskutowane. Do ich realizacji użyto szeregu nowoczesnych i dobrze dobranych technik eksperymentalnych, a uzyskane oryginalne wyniki rozszerzają stan wiedzy w dziedzinie i stanowią nową jakość.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów (25-200 słów):

Oś pracy stanowią trzy artykuły opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych (*impact factor*: 3,7 – 5,7; punkty MEiN: 100-140). Dorobek Autorki wyszczególniony w pracy zawiera też siedem dalszych publikacji, z czego jedna pierwszego autorstwa – wszystkie te artykuły również opublikowano w szanowanych czasopismach. Łączny dorobek powstały z udziałem Autorki uzyskał, w latach 2021-2023, 43 cytacji; 12 po najbardziej rygorystycznym, obejmującym wszystkich współautorów, odjęciu autocytacji (dane za bazą Scopus).

„Wiodące” artykuły, stanowiące podstawę ocenianej pracy, ukazały się w latach 2022-23. Stanowią one spójną całość eksplorującą wybrany temat badawczy. W toku opisanych badań opisano zróżnicowanie neuronów z poszczególnych obszarów DMH pod względem podstawowych parametrów elektrofizjologicznych, zbadano wzorce ich okołodobowej aktywności. Wykazano, że towarzyszące przyjmowaniu diety wysokotłuszczowej zaburzenie okołodobowego wzorca przyjmowania pokarmu prowadzi do dysregulacji rytmów w neuronach DMH. Następnie wykazano, że zakłóceniom rytmu aktywności DMH można potencjalnie zapobiec poprzez restrykcję czasową przyjmowania pokarmu. W dalszej kolejności scharakteryzowano ekspresję receptorów GLP1R i GLP2R, odpowiedź neuronów DMH na ligandy tych receptorów (w tym: okołodobową rytmikę tej odpowiedzi), wreszcie – zbadano wpływ diety i restrykcji pokarmowej na wzorce ekspresji endogennego neuropeptydu GLP1 oraz białka wczesnej odpowiedzi komórkowej cFos (markera aktywności neuronalnej).

Opublikowane wyniki są wartościowe naukowo i wpisują się w zdefiniowane w pracy cele naukowe, natomiast towarzyszący im teoretyczny wstęp i dyskusja są dobrze dopasowane do całokształtu tych badań i stanowią ich wartościowe uzupełnienie i podsumowanie.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

(umiejętność wprowadzenia w tematykę badawczą i jasność sformułowanych hipotez badawczych, dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków) (25-200 słów):

Publikacje naukowe zawarte w recenzowanej rozprawie cechuje wysoki poziom zaawansowania użytych technik. Łączą one elektrofizjologię (*patch clamp* i rejestracje zewnątrzkomórkowe z użyciem macierzy wieloelektrodowych), techniki immunohistochemiczne, molekularne (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* – RNAScope) i analizę obrazu mikroskopowego. Na uwagę zasługuje rzetelne podejście do modelowania statystycznego i prezentacji danych, które wykracza poza prosty kanon: zespół autorów wykorzystał w pełni możliwości oprogramowania statystyczno-matematycznego (R, Matlab) do analizy danych (korzystając np. z modeli



mieszanych czy statystyk kołowych takich jak F Watsona-Williamsa) i wizualizacji wyników. Opisane badania odznaczają się niewątpliwie dużą czasochłonnością, wymagały bowiem licznych eksperymentów elektrofizjologicznych i obrazowania z użyciem dużej liczby zwierząt – ten znaczny nakład pracy należy docenić. Same publikacje, jak również ich teoretyczna obudowa w postaci ocenianej dysertacji, prezentują zebrane dane w sposób klarowny, rozsądny i krytyczny. Zaś sama dyskusja podsumowująca zebrane artykuły jest napisana syntetycznie i zwięźle; nie stanowi jedynie powtórzeń czy powielenia dyskusji z poszczególnych prac, ale ujmuje materiał przekrojowo.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.) (25-200 słów):

Recenzowana praca jest napisana w języku angielskim, posiada klarowny i czytelny układ, zawarto w niej wszelkie wymagane sekcje. Autorka unika zbędnego powielania informacji, odsyłając czytelnika do artykułów w jasny i prosty sposób (w otwierającym sekcję artykułów zarysie metod i w zamykającym ją podsumowaniu wyników). Natomiast tam, gdzie pojawia się większa objętość tekstu – w sekcjach Introduction oraz Discussion, napisanych przez Autorkę od nowa na potrzeby pracy doktorskiej – mamy do czynienia z klarowną, przemyślaną wypowiedzią. Językowo praca stoi na bardzo dobrym poziomie, można znaleźć w niej co najwyżej pojedyncze niezręczności czy drobne edytorskie pomyłki (wyszczególnione poniżej), które nie zmieniają sensu wypowiedzi, nie utrudniają jej zrozumienia ani nie wpływają na płynność lektury. Całość czyta się z przyjemnością.

4. Uwagi krytyczne

Jak wspomniano powyżej, w tekście można znaleźć nieliczne i niezbyt poważne błędy edytorskie (najczęściej są to proste literówki trudne do wychwycenia w korekcie; przykładowo „*ever*” -> „*exert*” czy „*few*” -> „*fed*”, rzadziej homofony jak „*seizing*” -> „*ceasing*”). Autorka ma tendencję do kalki interpunkcyjnej typowej dla piszących po angielsku osób, których językiem ojczystym jest polski: zbędnego stosowania przecinka przed „*that*” w niektórych zdaniach złożonych. W jednym miejscu dobór słów zasługuje na komentarz: na stronie 23. Autorka pisze o konsekwencjach manipulacji GLP1R w DMH: „[...] *GLP1R knockout specifically in the DMH impairs [...]*”. Zacytowane w tym zdaniu prace (skądinąd bardzo interesujące) użyły jednak różnych metodologii – celowanej do struktury lezji (Maejima i wsp.), interferencji RNA (Lee i wsp.) oraz faktycznego lokalnego knockoutu z użyciem wektora wirusowego i rekombinazy *Cre* (Huang i wsp.). Jest to skrót myślowy niezbyt szkodliwy, ale jednak zmieniający nieco sens wypowiedzi.

Wszystkie wspomniane uwagi to oczywiście detale nie wpływające w żadnym wypadku na pozytywny odbiór dzieła, nie ma zatem sensu wymieniać ich szczegółowo, a jedynie nadmienić, że potknięć tego typu jest niewiele i praca robi wrażenie pisanej i edytowanej bardzo starannie.



Kilka nasuwających się w związku z opisanymi w rozprawie badaniami kwestii, o które chciałbym zapytać:

- Agoniści GLP1R (m.in. Ozempic, Saxenda, ale też i inne leki z tej grupy) są obecnie badani w ramach monitorowania bezpieczeństwa (*pharmacovigilance*) przez Europejską Agencję Leków, po nielicznych, lecz niepokojących doniesieniach o podwyższonym ryzyku samobójstw u pacjentów. Czy istnieją powody, by przypuszczać, że jakiś mechanizm związany z sygnalizacją związaną z peptydami z rodziny pochodnych proglukagonu w ośrodkowym układzie nerwowym stoi bezpośrednio za tym działaniem niepożądanym, przykładowo, czy istnieją jakieś przesłanki dotyczące zaangażowania DMH w nastrój, impulsywność lub inne neuropsychologiczne korelaty samobójczości?
- Kwestia płci: w poszczególnych pracach ograniczenie badania do samców szczurów jest podyktowane wpływem cyklu estralnego na przyjmowanie pokarmu i metabolizm. Zaburzenia odżywiania są jednak, oczywiście, zróżnicowane tak płciowo, jak i społecznie (genderowo) u ludzi. Czy istnieją jakieś dane na temat dymorfizmu płciowego w obrębie DMH? Czy mogłoby mieć to jakieś potencjalne znaczenie kliniczne?
- Zarówno w recenzowanej pracy jak i w publikacji oryginalnej (Sanetra i wsp., 2023) zarysowany został dalszy problem badawczy w postaci zidentyfikowania mechanizmów regulacji neuronów DMH przez peptydy z rodziny pochodnych glukagonu – m.in. identyfikacji mechanizmów komórkowych czy zbadania efektów sieciowych. Z bardziej anatomicznej perspektywy: czy wiadomo coś o hamujących wejściach z innych struktur do DMH i o ich ewentualnej okołodobowej cykliczności?

5. **Ocena końcowa** (uzasadnienie 25-200 słów):

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca jest wartościowa poznawczo, prezentowane badania są szeroko zakrojone i ciekawe, a sama treść rozprawy stoi na bardzo wysokim poziomie naukowym, edytorskim i językowym. Spełnia ona wszelkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Co więcej, zarówno same wyniki eksperymentalne, jak i ich osadzenie w wyważonej, dobrze podanej dyskusji świadczą o dużej wiedzy i dojrzałości naukowej, skłaniają mnie do zwrócenia się z wnioskiem o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Sanetry.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **mgr Anny Sanetry** spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **mgr Anny Sanetry** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

TAK/NIE



Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Uzasadnienie wniosku (25-200 słów)

Recenzowana praca dotyczy istotnej naukowo tematyki, dodatkowo odznaczającej się dużym znaczeniem klinicznym i społecznym. Prezentowane badania stoją na wysokim poziomie naukowym i metodologicznym, natomiast sama rozprawa jest wyczerpująca, zreżymie napisana i doskonale świadczy o wiedzy i dojrzałości naukowej Autorki. Zasluguje więc w mojej ocenie na uznanie i wyróżnienie.

TAK/NIE

18.08.2023

data sporządzenia recenzji

podpis recenzenta