

Wrocław, dn. 17 lipca 2024 r.

Do:

Rada Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawski Uniwersytet Medyczny

**Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza Michała Proczki pt.
„Wpływ wazopresyny i receptora V1a na odpowiedź krążeniową i oddechową u szczurów
normo- i hipertensyjnych”**

Nadaktywność odruchu z chemoreceptorów tętniczych towarzyszy wielu chorobom układu sercowo-naczyniowego, w tym nadciśnieniu tętniczemu i niewydolności serca i stanowi czynnik niekorzystnego rokowania, prawdopodobnie przyczyniający się do progresji choroby i zwiększonej śmiertelności poprzez generowanie lub potęgowanie aktywacji układu współczulnego. Na gruncie tych obserwacji zaproponowano metody terapeutyczne, ukierunkowane na dezaktywację lub stłumienie odruchu z chemoreceptorów tętniczych. Metody chirurgiczne, w postaci jedno- lub obustronnej resekcji lub ablacji kłębków szyjnych, choć skuteczne w zakresie trwałego wyciszenia odruchu i poprawy wybranych parametrów klinicznych (tolerancji wysiłku, ciśnienia tętniczego, czy napięcia współczulnego w pomiarze mikroneurograficznym), wydają się być związane z pewnymi niepożądanymi efektami towarzyszącymi (w tym, opisywanym przez nasz zespół pogorszeniem oksygenacji krwi w grupie pacjentów z niewydolnością serca), co stawia pod znakiem zapytania ich potencjalną przydatność kliniczną.

Nieinwazyjną alternatywę dla podejścia chirurgicznego może stanowić modulacja farmakologiczna. Jak pokazują niedawne doświadczenia na zwierzęcych modelach nadciśnienia tętniczego, istotne znaczenie w sensytyzacji komórek chemowrażliwych kłębków szyjnych odgrywa wzmożona ekspresja receptorów purynergicznym P2X3 oraz obniżona ekspresja receptorów dla glukagonopodobnego peptydu 1 (GLP-1). Wykorzystanie antagonistów P2X3 oraz agonistów GLP-1 skutecznie wyciszało odruch z chemoreceptorów tętniczych, czemu towarzyszył cały szereg korzystnych zmian parametrów klinicznych.

Projekt badawczy, zrealizowany w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej koncentruje się wokół postulowanej roli układu wazopresynergicznego w modulowaniu czynności odruchu z chemoreceptorów tętniczych i wykorzystuje szczurzy model nadciśnienia tętniczego (linia SHR, *spontaneously hypertensive rat*). Mimo licznych przesłanek wskazujących na istnienie takiej relacji, podjęty przez Doktoranta kierunek pozostaje stosunkowo słabo poznany. W powyżej zarysowanym kontekście temat rozprawy należy uznać za wartościowy, ambitny i potencjalnie istotny w perspektywie klinicznej. Projekt badania uzyskał finansowanie ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu „Diamantowy Grant”, co również świadczy o wysokim poziomie merytorycznym przedsięwzięcia.

Przedłożona do oceny praca liczy 155 stron standardowego maszynopisu i prezentuje typową dla rozprawy doktorskiej strukturę, obejmującą sześć głównych rozdziałów, tj. wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję i piśmiennictwo. Rozdziały siódmy i ósmy rozprawy stanowią odpowiednio, zgoda Komisji Bioetycznej oraz praca pogładowa, której Doktorant jest pierwszym autorem, prezentująca aktualny stan wiedzy w obszarze, którego dotyczyło badanie doktorskie, opublikowana na łamach uznanego periodyku *Frontiers in Physiology*. Całości dopełniają, umieszczone na początku rozprawy, spis tabel i rycin, wykaz skrótów, oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozprawa zawiera dwie tabele oraz aż dziewiętnaście rycin.

Przyjęty w rozprawie podział nie budzi zastrzeżeń, podobnie jak proporcje objętości poszczególnych rozdziałów. Uwagę zwraca imponująca liczba 453 pozycji, w znakomitej większości anglojęzycznych, jakie Doktorant przywołuje w pracy. Stanowi to pewną miarę ogromu wysiłku, jaki musiał zostać włożony w przygotowanie rozprawy. Wszystkie (bądź prawie wszystkie), kluczowe w badanym obszarze prace zostały umieszczone w wykazie piśmiennictwa, a sposób cytowania prac jest prawidłowy.

W obszernym, ponad 20-stronicowym wstępie Doktorant w uporządkowany, rzeczowy i drobiazgowy sposób (fragmentami, być może nawet *nazbyt* drobiazgowy) zarysowuje tło literaturowe przeprowadzonego eksperymentu. Baza faktograficzna badania została prawidłowo rozdysponowana pomiędzy „Wstęp” oraz „Dyskusję”. We „Wstępie” odnajdziemy szeroki kontekst literaturowy, obejmujący: (1) omówienie fizjologii wazopresyny jako neurohormonu i neurotransmitera, z uwzględnieniem receptorów dla wazopresyny oraz jej roli w regulacji czynności układu krążenia i oddechowego; (2) omówienie czynności chemoreceptorów tętniczych w warunkach fizjologicznych oraz w wybranych schorzeniach; (3) zarys epidemiologii i etiopatogenezy nadciśnienia tętniczego, ze szczególnym uwzględnieniem udziału układu wazopresynergicznego oraz odruchu z chemoreceptorów obwodowych, oraz (4) omówienie szczurów linii SHR jako doświadczalnego modelu zwierzęcego pierwotnego nadciśnienia tętniczego. W „Dyskusji” z kolei umieszczono szczegółowe dane naukowe,

pochodzące w przeważającej części ze zwierzęcych modeli nadciśnienia tętniczego, jako punkt odniesienia dla obserwacji własnych.

Daje się jednak zauważyć pewną redundantność prezentowanych we „Wstępie” faktów. Niektóre stwierdzenia są powtarzane po wielokroć, bez uchwytnej przyczyny. Godne pochwały jest natomiast przedstawienie potencjalnych ścieżek wpływu wazopresyny na regulację czynności układu oddechowego w formie ryciny (Rycina 1), z uwzględnieniem zaangażowanych ośrodków nerwowych w mózgowiu i relacji między nimi.

Konkluzja w podrozdziale 1.2.6. „Udział wazopresyny w regulacji układu oddechowego”, zawierająca stwierdzenie, że „(...) dostępna literatura naukowa wskazuje na hamujący wpływ AVP względem układu oddechowego i udział receptora V1a w tej odpowiedzi” wydaje się nieuprawniona; wszak sam Doktorant zauważa, że: (1) wazopresyna podana bezpośrednio w okolicę kłębka szyjnego stymuluje wentylację płuc; (2) wazopresyna podana do rVRG lub kompleksu pre-Bötzingera pobudza czynność przepony; (3) a elektrostymulacja okolic narządu podsklepieniowego (SFO, *subfornical organ*) – z niewiadomego powodu określanego w rozprawie kilkakrotnie mianem „narządu nadsklepieniowego” – nasila oddychanie.

W podrozdziale 1.6.4. „Udział chemoreceptorów tętniczych w patofizjologii nadciśnienia tętniczego”, przy opisie proponowanych metod modulacji czynności odruchu z chemoreceptorów obwodowych w terapii wybranych chorób układu krążenia zastanawia brak wzmianki o metodach farmakologicznych, głównie opartych o antagonizm receptorów P2X3 kłębków szyjnych.

Cele pracy, podane w formie ośmiu pytań badawczych, sformułowano poprawnie. Odpowiadają one projektowi badania i oddają jego wieloaspektowy, kompleksowy charakter. Praca koncentruje się wokół postulowanego wpływu wazopresyny, działającej przez receptory V1a, na czynność chemoreceptorów obwodowych w zwierzęcym modelu nadciśnienia tętniczego. Kompleksowe ujęcie problemu badawczego przejawia się m. in. w: (1) analizie obu aspektów czynności chemoreceptorów obwodowych, tj. aktywności fazowej (reaktywności, czułości, wrażliwości) oraz aktywności tonicznej (toniczności), (2) analizie komponenty oddechowej oraz krążeniowo-naczyniowej odruchu, (3) uzupełnieniu eksperymentów fizjologicznych, wykonywanych na zwierzętach w znieczuleniu ogólnym o badania ekspresji receptora V1a w okolicy kłębków szyjnych, z wykorzystaniem immunobarwień i mikroskopii konfokalnej.

Aspekty metodologiczne pracy przedstawiono starannie, szczegółowo i czytelnie. Ryciny, zawarte w rozdziale „Materiał i metody” stanowią świetne uzupełnienie opisu tekstowego i znacząco ułatwiają Czytelnikowi zrozumienie i zwizualizowanie poszczególnych, dosyć złożonych w wymiarze technicznym, doświadczeń. Jako, że ryciny 6-10 powielają ten sam schemat, można było rozważyć ich przedstawienie w formie kompilacji złożonej z 5 paneli, lub wręcz w postaci jednej ryciny z kilkoma etykietami odpowiadającymi danej strzałce (tj. CBX / pozorowane CBX / podanie antagonisty receptora

V1a przy pierwszej strzałce oraz podanie KCN / AVP przy drugiej strzałce). Narzędzia analizy statystycznej, jakimi posłużono się w pracy, zostały właściwie dobrane.

Rozdział "Wyniki" nie odbiega pod względem staranności przygotowania od pozostałych części rozprawy i stanowi rzetelne, przejrzyste i uporządkowane opracowanie uzyskanych rezultatów. Ponownie, na szczególną pochwałę zasługuje strona graficzna rozdziału. Liczne, kolorowe ryciny, na których zestawiono zmiany parametrów oddechowych i krążeniowych w poszczególnych seriach eksperymentów stanowią wartościowe uzupełnienie tekstu głównego, a wręcz umożliwiają Czytelnikowi zaznajomionemu z założeniami pracy, błyskawiczne uchwycenie kluczowych obserwacji jeszcze przed lekturą samego tekstu. Odnotować jednak należy brak wyjaśnienia symboli widniejących na rycinach (*, **, ***, ****, #, ##). Podobnie, dobrą praktyką jest objaśnienie znaczenia elementów wykresu pudełkowego, tj. punktu środkowego (średnia czy mediana?) oraz wąsa (odchylenie standardowe czy błąd standardowy?). Tutaj takiego objaśnienia nie umieszczono. Na rycinach pojawiają się ponadto wyrażenia w języku angielskim (jednostki częstości akcji serca i częstości oddechów, odpowiednio – beats/min oraz breaths/min). Jest to, jak przypuszczam, efekt wykorzystania rycin już przygotowanych na potrzeby publikacji.

Dla niektórych zmiennych, wartości przeciętne i rozrzut wartości wokół wartości przeciętnej są prezentowane w postaci średniej i odchylenia standardowego dla jednej grupy (linia SHR) oraz mediany z dolnym i górnym kwantylem dla drugiej grupy (linia WKY); co jest, rzecz oczywista, podyktowane zgodnością (lub niezgodnością) rozkładu wartości zmiennej z krzywą Gaussa. Zabieg taki, choć zgodny z treścią podręczników analizy statystycznej, w opinii Recenzenta jest mniej czytelny, a w praktyce rzadko spotykany w publikacjach naukowych. Najczęściej stosuje się konsekwentnie tą samą formę dla obu porównywanych grup.

Doktorant przywołuje w tekście nazwę testu statystycznego przy każdym porównaniu – niepotrzebnie. Wszak wszystkie wykorzystane w analizie testy statystyczne oraz zasady ich stosowania opisano w rozdziale "Materiał i metody". W pewnych fragmentach zastanawia również porządek prezentowania wyników, np. porównanie spoczynkowych wartości HR między szczurami SHR i WKY w znieczuleniu ogólnym umieszczono w dalszej części podrozdziału 4.2.2. "Odruch z chemoreceptorów tętniczych", już po porównaniu odpowiedzi HR na KCN między badanymi szczepami. Odwrotna kolejność byłaby w tym przypadku bardziej zasadna.

Na potrzeby publikacji naukowej poddaje ponadto pod rozwagę zmianę formy rycin na formę uwypuklającą różnice w odpowiedziach fizjologicznych między: (1) pozorowanym i rzeczywistym odnerwieniem kłębków szyjnych; (2) podaniem AVP w obecności oraz braku antagonisty V1a.

Zestawienie uzyskanych wyników z dostępną literaturą, zawarte w rozdziale 6. "Dyskusja", ujawnia znakomite przygotowanie merytoryczne Doktoranta. Rezultaty eksperymentu zostały omówione właściwie, szczegółowo, z uwzględnieniem niedawno opublikowanych doniesień

naukowych. Pomimo licznych odwołań do innych badań (przytaczanych ze szczegółami) tok dyskusji pozostaje logiczny i wartki, a sam przekaz czytelny i przyjemny w odbiorze. Pewne wyzwanie musiała stanowić próba wyjaśnienia, na gruncie fizjologii, obserwacji sprzecznych ze spodziewanym obrazem wyników, m. in. brak wpływu odnerwienia kłębków szyjnych na spoczynkowe parametry krążeniowe i oddechowe u szczurów hipertensyjnych, czy brak reakcji oddechowej na podanie AVP do tętnicy szyjnej wspólnej u szczurów normotensyjnych. Doktorant poradził sobie w tych wyzwaniach znakomicie.

Ograniczenia niniejszego eksperymentu, omówione w podrozdziale 5.4. „Dyskusji”, ale również w innych częściach tego rozdziału i najczęściej uzupełnione o wskazanie techniki, umożliwiającej pokonanie tych ograniczeń świadczą nie tylko o naukowej dojrzałości i zdolności Doktoranta do krytycznej analizy własnych dokonań, ale również o znakomitej znajomości „warsztatu naukowca”.

Wnioski płynące z badania, w liczbie 10, sformułowano poprawnie. Dobrą praktyką, podnoszoną w wielu recenzjach, jest natomiast zachowanie takiej samej liczby celów i wniosków.

Warstwa językowo-edytorska rozprawy nie budzi większych zastrzeżeń. Język rozprawy jest poprawny i precyzyjny, a formatowanie tekstu spójne i przejrzyste. Nieliczne błędy (literówki, powtórzenia, nadmiarowe słowa stanowiące najpewniej pozostałości po przeformułowaniu zdania) nie wpływają na całościowo dobre wrażenie płynące z obcowania z rozprawą.

Z recenzenckiego obowiązku należy odnotować następujące, niewymienione w powyższym tekście, niedoskonałości rozprawy:

- Brak cytowań w podrozdziale 1.1. „Wstępu”. O ile można wybaczyć pozostawienie bez podparcia literaturowego pewnych powszechnie akceptowanych, ogólnych „prawd”, o tyle wszystkim odwołaniom do specyficznych, konkretnych obserwacji naukowych powinna towarzyszyć wzmianka o ich źródle.
- Doktorant kilkakrotnie używa sformułowania „nieistotny wpływ” (np. „Co więcej, dożylnie podanie antagonisty receptora V1a ma nieistotny wpływ na indukowany niedotlenieniem wzrost wentylacji płuc u czuwających psów.” „(...) wzrost MABP u szczurów normotensyjnych WKY, który był jednak nieistotny w analizie statystycznej.”). Jeżeli zmiana wartości zmiennej przed vs. po interwencji nie przekracza progu istotności statystycznej, to uznajemy, że wartość zmiennej nie uległa zmianie.

Wymienione niedociągnięcia w żadnym stopniu nie umniejszają znaczącej wartości naukowej rozprawy.

Podsumowując, rozprawa doktorska autorstwa lek. Michała Proczki stanowi unikalny, wartościowy wkład w dotychczasowe pojmowanie mechanizmów kształtujących funkcjonowanie chemoreceptorów obwodowych w nadciśnieniu tętniczym.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Wpływ wazopresyny i receptora V1a na odpowiedź krążeniową i oddechową u szczurów normo- i hipertensyjnych” przygotowana przez lek. Michała Proczkę spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Przedstawiam wniosek do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Michała Proczkę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy, ze względu na kompleksowe, wieloaspektowe ujęcie problemu badawczego oraz potencjalne znaczenie kliniczne uzyskanych wyników (modulacja farmakologiczna odruchu z chemoreceptorów tętniczych na drodze blokowania receptorów V1a kłębków szyjnych).

dr hab. n. med. Bartłomiej Paleczny
Zakład Fizjologii, Katedra Fizjologii i Patofizjologii
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu