

Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Winczyk
Kierownik Zakładu Neuroendokrynologii
Międzywydziałowej Katedry Diagnostyki
Laboratoryjnej i Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Małgorzaty Kalisz

na temat:

Ocena wydzielania adiponektyny całkowitej i frakcji adiponektyny wysokocząsteczkowej
w pozawałowej niewydolności serca u szczura”

Jak wiadomo adiponektyna jest jednym z hormonów wydzielanych przez komórki tkanki tłuszczowej regulującym metabolizm glukozy i lipidów oraz hamującym proces łaknienia. Oprócz korzystnego oddziaływania na procesy metaboliczne, wykazuje właściwości ochronne wobec śródbłonna naczyniowego i działa przeciwmiażdżycowo. Wiele badań eksperymentalnych i klinicznych wykazało, że w otyłości, cukrzycy, nadciśnieniu tętniczym czy chorobie niedokrwiennej serca dochodzi do znacznego obniżenia stężenia adiponektyny we krwi. Obecnie przeważa więc pogląd, że adiponektyna działa ochronnie na układ sercowo-naczyniowy, a jej niskie stężenie u osób z zaburzenia metabolicznymi predysponuje do ostrych epizodów naczyniowych - wieńcowych lub mózgowych. Jednakże w ostatnich latach ukazały się prace wskazujące, że wysokie stężenia tego hormonu we krwi mogą zwiększać śmiertelność u chorych z niewydolnością krążenia. Przyczyn tych pozornie rozbieżnych doniesień może być wiele. Wiadomo, że we krwi występują trzy frakcje adiponektyny – niskocząsteczkowy trimer, średnio- i wysokocząsteczkowa forma, a w chwili obecnej jedynie tej ostatniej frakcji przypisuje się działanie kardioprotekcyjne i przeciwmiażdżycowe. Ponadto adiponektyna może lokalnie oddziaływać na serce, gdyż jest syntezowana nie tylko w adipocytach znajdujących się przysercowo, ale także w kardiomiocytach. W świetle powyższych danych mgr Małgorzata Kalisz sformułowała cel swojej pracy doktorskiej, który polegał na ustaleniu czy pozawałowa niewydolność serca wpływa na stężenie całkowitej adiponektyny i jej frakcji wysokocząsteczkowej we krwi jak i w zmienionym chorobowo mięśniu sercowym oraz w tkance tłuszczowej.

Rozprawa liczy 98 stron, ma typowy układ dla prac doktorskich oraz zawiera klasyczne rozdziały - wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz wykaz piśmiennictwa. Tekst pracy został poprzedzony wykazem używanych skrótów i streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, a zakończony spisem zawartych w niej rycin i tabel. W mojej opinii taki układ znacznie ułatwia zapoznanie się z treścią

rozprawy. Wybór tematu dysertacji uważam za zasadny, zarówno pod względem oryginalności, jak i potencjalnych wartości praktycznych.

Wstęp rozprawy stanowi zwięzłe, ale całkowicie wystarczające, omówienie zagadnień związanych z tematem pracy. Mgr Małgorzata Kalisz w sposób bardzo przystępny przedstawiła charakterystykę tkanki tłuszczowej, z dokładnym opisem zarówno jej funkcji endokrynnej jak i wpływu adipocytokin na układ sercowo-naczyniowy. Następnie podała podstawowe informacje dotyczące genu i białka adiponektyny oraz jej różnych form cząsteczkowych, a także omówiła działanie adiponektyny w warunkach fizjologicznych i jej kardioprotekcyjne właściwości. Uważam, że wstęp pracy został opracowany prawidłowo i stanowi przejrzyste wprowadzenie w dość szeroką tematykę badań.

W rozdziale *Materiały i metody* Autorka zawarła charakterystykę badanych zwierząt – szczurów samców szczepu Wistar i bardzo szczegółowy opis metod badawczych. W dokładny sposób omówiła proces indukowania zawału mięśnia sercowego u zwierząt w grupie badanej i wykonanie tzw. operacji pozornej, u zwierząt stanowiących grupą kontrolną. Szczegółowo opisała także badanie echokardiograficzne za pomocą którego oceniono wielkość lewej komory serca, frakcję wyrzutową, a na podstawie wskaźnika kurczliwości odcinkowej lewej komory określono rozległość wywołanej eksperymentalnie martwicy mięśnia sercowego. Za pomocą cewnikowania serca ustalono parametry hemodynamiczne narządu takie jak ciśnienie skurczowe i końcoworozkurczowe lewej komory, które pozwoliły rozpoznać pozawałową niewydolność serca u zwierząt. Materiał badawczy obejmował zarówno krew żylną jak i różny materiał tkankowy – prawą i lewą komorę serca, a także tkankę tłuszczową podskórną, trzewną, okołogonadalną oraz okołosercową. Metodyka badań była także bardzo szeroka i obejmowała pomiar metodą immunoenzymatyczną ELISA stężenia adiponektyny całkowitej i jej fracji HMW w osoczu krwi oraz oznaczenie metodą Bratforda stężenia tej cytokiny w homogenatach tkankowych – osobno w lewej i prawej komorze serca oraz tkance tłuszczowej pobranej z różnych okolic ciała. Dla potwierdzenia pozawałowej niewydolności serca, stosując technikę ilościowej łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR), dokonano pomiaru poziomu mRNA przedsionkowego i mózgowego peptydu natriuretycznego w lewej komorze serca

Uzyskane wyniki badań zostały poddane szerokiej i wnikliwej analizie statystycznej z wykorzystaniem klasycznego testu t-Studenta i testu U Mann-Whitneya oraz w celu określenia zależności badanych parametrów wyliczono współczynnik korelacji rang Spearmana.

Doktorantka w swoich badaniach zgodnie z założeniem eksperymentu, wykazała pogorszenie parametrów hemodynamicznych lewej komory serca u zwierząt po przebytych zawałach – upośledzenie skurczowej i rozkurczowej czynności narządu, wzrost ciśnienia końcoworozkurczowego, obniżenie o 40% frakcji wyrzutowej lewej komory oraz wzrost jej objętości. Ponadto w homogenatach LK szczurów z pozawałową niewydolnością serca odnotowała znamiennej statystycznie ponad 30-krotny wzrost poziomu mRNA dla ANP i

prawie 3-krotny wzrost poziomu mRNA dla BNP w porównaniu z grupą kontrolną. Badając stężenie całkowitej adiponektyny w homogenatach tkankowych pochodzących od zwierząt z pozawałową niewydolnością serca, stwierdziła znamiennej statystycznie wzrost stężenia w lewej komorze serca a obniżenie w tkance tłuszczowej okołosercowej. Natomiast nie odnotowała znamiennych różnic pomiędzy grupą badaną a kontrolną w stężeniu frakcji wysokocząsteczkowej adiponektyny zlokalizowanej w sercu jak i w tkance tłuszczowej pobranej z różnych innych okolic. Ponadto wykazała, że w pozawałowej niewydolności serca dochodzi do obniżenia w osoczu stężenia całkowitej adiponektyny, natomiast nie ulega istotnej zmianie średnie stężenie jej frakcji wysokocząsteczkowej.

W rozdziale Dyskusja Autorka pracy poddała wnikliwej analizie uzyskane wyniki i porównała je z danymi prezentowanymi w literaturze. Na podkreślenie zasługuje fakt, że oparła swoją analizę na bardzo aktualnych pracach opublikowanych w większości po 2000 roku, a także prawidłowo i bardzo dobrze dobrała argumenty w dyskusji. Biorąc także pod uwagę poprawny językowo i stylistycznie sposób wypowiedzi uważam, że Doktorantka wykazała się dobrym poziomem w pisemnym prezentowaniu swoich tez naukowych. Jedynym moim zastrzeżeniem jest to, że w końcowej części dyskusji nie zamieściła szerszego podsumowania uzyskanych wyników w nawiązaniu do danych literaturowych.

W zakończeniu pracy zostało natomiast zamieszczone zestawienie najważniejszych wyników pracy oraz trzy wynikające z nich wnioski. Doktorantka stwierdza, że w pozawałowej niewydolności serca badanych zwierząt podwyższonemu stężeniu adiponektyny w lewej komorze serca towarzyszy wzrost markerów niewydolności serca oraz pogorszenie parametrów hemodynamicznych. Ponadto wnioskuje, że w zastosowanym przez Nią zwierzęcym modelu doświadczalnym niewydolność serca pobudza lokalną syntezę adiponektyny jedynie w tkance tłuszczowej znajdującej się wokół uszkodzonego niedokrwieniem mięśnia sercowego. Biorąc pod uwagę brak zmian stężenia wysokocząsteczkowej adiponektyny w osoczu, sercu i tkance tłuszczowej słusznie wnioskuje, iż inne frakcje adiponektyny – o mniejszej masie cząsteczkowej, mogą brać udział w pozawałowej dysfunkcji mięśnia sercowego.

Piśmiennictwo pracy zawiera 130 pozycji i w prawie 100% jest anglojęzyczne. Niewątpliwie na podkreślenie zasługuje fakt, że wszystkie publikacje, z wyjątkiem zaledwie kilku pozycji, są bardzo aktualne, bowiem ukazały się po 2000 roku.

Należy także podkreślić, że wyniki rozprawy doktorskiej zostały już opublikowane w *Journal of Physiology and Pharmacology* (2015;673-6680) - czasopiśmie anglojęzycznym o zasięgu międzynarodowym, posiadającym wskaźnik cytowań *Impact Factor* oraz punktację MNiSW, co niewątpliwie potwierdza wysoką wartość merytoryczną pracy.

Podsumowując moją recenzję stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska zawiera nowe elementy poznawcze, szczególnie dotyczące wzrostu w pozawałowej niewydolności serca, stężenia całkowitej adiponektyny jedynie w lewej

komorze serca z jednoczesnym obniżeniem jej stężenia we krwi i w okołosercowej tkance tłuszczowej. Natomiast brak zmian stężenia wysokocząsteczkowej adiponektyny, zarówno w osoczu jak i w badanych tkankach skłania do dalszych badań oceniających udział innych frakcji adiponektyny w pozawałowej niewydolności krążenia. W mojej opinii Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością przedmiotu badań, umiejętnością samodzielnego rozwiązywania problemu badawczego oraz prawidłową zdolnością korzystania z dostępnej literatury.

Uważam, że oceniana przeze praca spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego wniosek o dopuszczenie mgr Małgorzaty Kalisz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę oryginalność przeprowadzonych badań, ich szeroki zakres i ogromną pracowitość oraz wartość merytoryczną uzyskanych wyników, a także fakt opublikowania tej pracy w wysokopunktowym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, **przedstawiam Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie rozprawy.**

Prof. dr. hab. n. med. Katarzyna Winczyk

Łódź, 10.10.2016 r.