



Univerzita Komenského v Bratislave

LEKÁRSKA FAKULTA

Fyziologický ústav

Sasinkova 2, 813 72 Bratislava

Tel./fax: +421 2 /59357 348, +2/59357 515

E-MAIL:fyziologia.sekretariat@fmed.uniba.sk



Oponentský posudok na dizertačnú prácu: **Vliv stresu na periférii a v CNS s ohľadom na úlohu muskarínových receptorů, MUDr. Eva Vařejková**

Získavanie nových poznatkov o aktivite autonómneho nervového systému pri stresovej reakcii a pochopenie regulácie signálnych dráh v hypotalame v súvislosti s expozíciou akútnemu alebo chronickému stresu predstavujú dôležitú súčasť fundamentálnej aj klinickej kardiovaskulárnej fyziológie a neurovied s presahom do neurofarmakológie. Z tohto pohľadu je predložená dizertačná práca so svojim teoretickým prehľadom a experimentálnym usporiadaním zameraným na účinky parasimpatikovej aktivity závislej od muskarínových receptorov v srdci v stresových podmienkach veľmi zaujímavá a komplexná. Monitorovanie srdcovej frekvencie, teploty a správania v závislosti od modulácie muskarínových receptorov v srdci predstavuje významnú tému kardiovaskulárneho fyziologického výskumu. Práca má v tomto kontexte širší dopad aj na poznanie integračnej úlohy hypotalamu počas stresu a zároveň úlohy cirkadiánnych rytmov pri interpretácii zmien srdcovej frekvencie.

Z pohľadu hodnotenia **aktuálnosti** zvolenej témy, možno jednoznačne potvrdiť, že zameranie predloženej dizertačnej práce patrí k súčasným odborným trendom, ktorých cieľom je pochopiť podstatu interakcie medzi sympatikovým a parasimpatikovým nervovým systémom a zároveň objasniť pôsobenie podtypov muskarínových receptorov v srdci. Dizertačná práca tematicky zapadá do najnovších vedeckých snáh opísať a porozumieť disrupcii cirkadiánnych rytmov a ich vplyvu na sympatovagálnu rovnováhu. Hoci sú aferentné aj eferentné dráhy autonómneho nervového systému relatívne dobre preskúmané, v ich funkčnosti je mnoho neznámych fenoménov týkajúcich sa úloh cholinergných - muskarínových aj niktotínových receptorov a ich signálnych kaskád. Zároveň, nie sú dostatočne objasnené účinky anticholinergik (antimuskarínových látok) používaných najmä vo farmakoterapii porúch vylučovania a inkontinencie. V súvislosti s úlohami cholinergných receptorov v srdci, nie je dostatočne známa dynamika ich odpovedí na ligandy v závislosti od genetických aspektov, počas starnutia aj v priebehu záťažových stavov. Hoci autorka priamo neskúma genetickú variabilitu cholinergných receptorov alebo ich úlohy v staršom veku, rozbor dôsledkov vyradenia (knockoutu) alebo aktivácie muskarínových receptorov typu M_2 na kardiovaskulárny systém počas akútnych, alebo chronických stresových reakcií má možný kardioprotektívny potenciál, pričom autorka kardioprotektívne efekty aktivácie M_2 receptorov na strane 70 priamo konštatuje. Vzhľadom na to, že sympatovagálna rovnováha je zložitý fenomén, oceňujem v teoretickom prehľade opis niektorých spätiväzobných a kontraregulačných mechanizmov. Autorka detailne opisuje princípy homeostázy a alostázy s historickým kontextom, hoci uchopenie konkrétnych úloh aktivácie sympatikového a parasimpatikového nervového systému na obnovení a udržaní homeostázy by si

vyžadovalo dôkladnejší prístup. Napríklad schéma na Obrázku 5 na strane 14 aj nasledujúci Obrázok 6 týkajúci sa ovplyvnenia orgánových sústav autonómnym nervovým systémom sú veľmi zjednodušené. Naopak regulácia krvného tlaku na stranách 15 a 16 je podaná komplikovane, bez dostatočného vysvetlenia príslušných schém, ktorých časť je v angličtine s použitím skratiek, ktoré sa bežne nevyskytujú. Tento jav je v práci opakovane (napríklad strana 28). Opis etáží autonómneho nervového systému striedajú učebnicové fakty s vybranými informáciami o úlohe adrenergických a muskarínových receptorov. Na strane 17, autorka konštatuje vylučovanie „mediátorov“, na „tzv. postjunktívnej membráne“ bez ďalšieho kontextu. Hoci je evidentné že na danom rozsahu práce nie je možné rozoberať klasifikáciu a farmakologické vlastnosti všetkých tried cholinergných receptorov, vzhľadom na tému práce je zmienka o nikotínových receptoroch veľmi úsporná, keďže sú spomenuté len dvakrát a okrajovo. Naopak, výstižne a vo vhodnom rozsahu rozoberá autorka aktuálne poznatky o muskarínových receptoroch včítane ich funkcie pri regulácii srdcovej frekvencie. Náčrt funkcií hypotalamu prostredníctvom schémy na strane 24 je podaný účelne, hoci trochu zjednodušené. Dostatočne sú spracované údaje o biologických rytmoch, hoci niektoré schémy nie sú úplne jasne zasadené do kontextu (Obrázok 15). Na stranách 31-34 autorka relatívne zložito opisuje procesy stresovej odpovede včítane neurohumorálnych odpovedí. Vysvetlenie úloh ventrolaterálnej časti predĺženej miechy na strane 34 nie je podané dostatočne zrozumiteľne, pričom chýba aspoň zmienka o skupinách noradrenergických neurónov, ktorých úloha v stresovej odpovedi je nezastupiteľná. V teoretickom prehľade trochu chýba detailnejší opis signálnych kaskád receptorov a možnosti ich ovplyvnenia zvlášť s ohľadom na rozdiely v humánnej fyziológii a v experimentálnych modeloch. Na niektorých miestach by bolo možné doplniť aj niektoré najnovšie referencie, naopak inde by v rámci aktuálnosti riešenej problematiky bolo možné niektoré citácie vypustiť (strana 26, Aschoff 1965) bez toho aby utrpela kvalita potrebných faktov. Okrem častých anglikanizmov a neúplne preložených grafov a výsledkov je formálna kvalita práca na primeranej úrovni s množstvom precízne spracovaných výsledkov.

Zvolené **metódy** spracovania dizertačnej práce sú pestré a zahŕňajú najmä použitie transgénnych myšiacich modelov (M_2 knockoutované myši (M_2 KO), CRH knockoutované myši), komplexnú analýzu srdcovej frekvencie a telesnej teploty v odpovedi na príslušné podnety a tiež hodnotenie správania (najmä krátkodobej pamäti a priestorovej orientácie). Práca je vhodne doplnená o stanovenie katecholamínov a analýzu biorytmov. Vyzdvihnúť a oceniť je potrebné implantáciu telemetrického systému a tiež štatistické spracovanie získaných dát, pričom ťažisko dát pochádza zo vzoriek M_2 KO jedincov. Vo výsledkoch je spomenuté aj hodnotenie väzobných miest pre M_2 , β_1 - a β_2 -adrenoceptory, ktoré však v metodikách chýbajú. Podobne nie dostatočne detailne je opísané spracovanie tkaniva srdca. Na strane 52 je uvedené, že aktivita adenylátcyklázy a genová expresia enzýmov syntézy katecholamínov sa nezmenila, nie je však jasné v akom tkanive a v akom designe bola daná analýza vykonaná. Tieto metodické aspekty spolu s následne prezentovanými výsledkami by bolo vhodné zdôvodniť. V práci chýba vysvetlenie prevedenia rozdielov behaviorálnych experimentov u jednotlivých modelov, najmä motorickej aktivity. Navyše až na strane 60 sa čitateľ dozvedá, že celková doba nehybnosti CRH KO zvierat sa líšila oproti kontrolným jedincom, nie je však jasné ako takéto porovnanie nadväzuje na analýzu pohybovej aktivity u M_2 KO jedincov. Aká úvaha viedla k sledovaniu reakcií zvierat na averzívne podnety u CRH KO zvierat? Existuje cholinergická modulácia u CRH KO podmienok? Je možné predpokladať pohlavné rozdiely? Hoci je evidentné, že intraperitoneálna aplikácia látok ovplyvňujúcich autonómny nervový systém bol v dizertačnej práci štandardný postup na sledovanie krátkodobých periférnych účinkov sympatomimetík a parasympatomimetík, za úvahu stojí aj centrálné podanie použitých látok.

Dosiahnuté **výsledky** predstavujú rozsiahly elaborát získaný z viacerých experimentov vykonaných najmä použitím M_2 KO jedincov. Vo viacerých prípadoch nútia výsledky sa zamyslieť nad experimentálnym designom a zložitou získaných vzorcov bazálnej srdcovej frekvencie a jej odpovede na akútne a opakovaný stresový podnet. Ide najmä o vyšší nárast srdcovej frekvencie M_2 KO jedincov v odpovedi na opakovaný stresový podnet oproti kontrolným zvieratám. V tejto súvislosti by čitateľ určite ocenil rozsiahlejšiu diskusiu a zdôvodnenie použitých stresorov. Hoci autorka vhodne uvádza, že "restraint stress" je miernejšia forma imobilizačného stresu, bolo by vhodné diskutovať, alebo porovnať získané výsledky s inými úzkosť, prípadne depresiu vyvolávajúcimi podnetmi a ich vplyvom na srdcovú frekvenciu. Zaujímavé sú aj nálezy týkajúce sa nižších hodnôt telesnej teploty u M_2 KO jedincov oproti kontrolným zvieratám a ich rozdiely medzi dennou a nočnou fázou, hoci v analýze biorytmov nebol preukázaný rozdiel medzi experimentálnymi skupinami. Objasnenie priebehu týchto hodnôt má určite veľký význam hlavne pri štúdiu chronobiologických ukazovateľov v odpovedi na stresový podnet. Za pozoruhodné možno považovať závery, že vplyv chronického stresu na biorytmy je marginálny. V tejto súvislosti by však za úvahu stáli korelácie telesných teplôt so srdcovou frekvenciou prípadne hladinami katecholamínov. Nie úplne jednoznačné a zrozumiteľné sú niektoré údaje získané po podaní carbacholom stimulovanej aktivity. Interpretácia týchto výsledkov srdcovej frekvencie na strane 72 je u kontrolných jedincov dávaná do súvislosti s poklesom cAMP a zmenou izoforiem PKC, k čomu podľa autorky nedochádza u M_2 KO jedincov. Tieto výsledky však v práci absentujú. Napriek tomu, významným záverom týchto štúdií je, že počas stresovej reakcie sa uplatňuje sympatikus aj parasympatikus, a to znížením srdcovej frekvencie, obmedzením trvania tachykardie v priebehu stresovej reakcie aj v zotavovacej fáze. V osobitnej časti venovanej úlohám CRH, stojí za zamyslenie fakt, že deficit v CRH u nestresovaných jedincov zlepšuje schopnosť zvierat uniknúť z potenciálne nebezpečnej oblasti. Tento nález sa autorka pokúša následne interpretovať prostredníctvom účinku na krátkodobú pamäť, čo by si určite vyžadovalo ešte ďalšie štúdie. V diskusii na strane 86, autorka v tejto súvislosti konštatuje viacero adaptačných mechanizmov od epigenetickej modifikácie histónov, cez zmeny cytoskeletu až po remodeláciu dendritických trŕňov. Autorka rozsiahlo diskutuje vplyvy CRH na synaptickú plasticitu, čo by bolo vhodné zasadiť do kontextu hlavnej témy dizertačnej práce ktorou sú nepochybne vplyvy autonómneho nervového systému a jeho vzťah k stresovej odpovedi. Celkovo možno vysoko hodnotiť náročnosť získaných výsledkov, pričom je nepochybné, že autorka spracovala dáta adekvátne. Dosiahnuté výsledky do istej miery potvrdzujú predchádzajúce nálezy o špecifikách stresových reakcií a periférnej odpovedi autonómneho nervového systému. Nové a originálne údaje o kardiovaskulárnych dôsledkoch akútneho aj opakovaného stresu v závislosti od deficitu muskarínových receptorov sú cenné a podnetné.


Prínos dizertačnej práce spočíva v prepracovanom a detailnom hodnotení srdcovej frekvencie, ktorý je možné využiť v rôznych behaviorálnych alebo fyziologických kontextoch v budúcnosti. Metodologicky práca predstavuje progres, pričom je nepochybné, že dizertantka získala mnohé odborné znalosti a zručnosti v oblasti analýzy telemetrických dát, správania ako aj neurohumorálnych parametrov, ktoré môže uplatniť v ďalšej odbornej praxi v obdobných alebo zmenených podmienkach. Práca poskytla dizertantke primeranú príležitosť zdokonaľiť sa v aplikácii transgénnych myšacích modelov najst' vhodnú interpretáciu výsledkov meraných parametrov. Z možností aplikácie výsledkov sa ako zaujímavá javí selektívna farmakologická stimulácia M_2 receptorov vo vzťahu k modulácii srdcovej frekvencie. Ďalším, hoci už známym faktom je docielenie vyššej stimulácie parasympatika a s tým súvisiacich kardioprotektívnych účinkov pomocou fyzickej aktivity,

sporný ostáva dlhodobý vplyv jednotlivých stresových podnetov. Pozornosť je potrebné venovať aj vplyvom cirkadiánnych rytmov na sympatovagálnu rovnováhu. Dizertačná práca jasne preukazuje predpoklady autorky k tvorivej vedeckej práci a preto po úspešnej obhajobe dizertačnej práce navrhujem udeliť akademický titul „**philosophiae doctor**“ – **PhD**.

Špecifické otázky:

1. Aké alternatívne modely psychomotorického stresu k “restraintu“ prichádzajú do úvahy v experimentálnych prístupoch a aké majú konotácie v klinickej praxi (napr. pacient pripútaný na lôžko)?
2. Ako dlho pretrvávajú dôsledky stresového podnetu na reguláciu srdcovej frekvencie?
3. Je známe, že dlhodobé obmedzenie pacienta na lôžku má škodlivé účinky na kostrové svalstvo, cievny systém aj reguláciu srdcovej frekvencie. Existujú v tejto súvislosti genetické štúdie o variabilite muskarínových receptoroch, ktoré by naznačovali väčšiu alebo menšiu náchylnosť na dôsledky dlhodobej vynútenej nehybnosti?

Bratislava, 5.3. 2022


doc. RNDr. Ján Bakoš, PhD