

Warszawa, dnia 18.05.2023

Dr hab. n. med. Ewa Jankowska-Steifer
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel.: 22 629 52 82
ewa.jankowska-steifer@wum.edu.pl



RPW/4200/2023
Data: 2023-05-30
UMB

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Magdaleny Smereczańskiej

pt „Wpływ CacyBP/Sip na szlak MAPK w nadnerczach w doświadczalnym nadciśnieniu pierwotnym i wtórnym”

Promotor: prof. dr hab. Irena Kasacka

Podstawę formalną opracowania niniejszej recenzji stanowi uchwała Rady Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 21 marca 2023 roku w sprawie powołania recenzentów rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Smereczańskiej.

Nadciśnienie tętnicze jest jedną z głównych przyczyn zachorowalności i śmiertelności w populacji ludzkiej. Stanowi ono istotny czynnik ryzyka rozwoju m.in., zawału serca, udaru mózgu, migotania przedsionków, niewydolności nerek, czy zwyrodnienia siatkówki. Nadciśnienie tętnicze jest chorobą o złożonej etiologii, na którą składają się czynniki środowiskowe i genetyczne. Przyczyna choroby jest identyfikowana w około 10% przypadków (nadciśnienie wtórne), zaś w 90% przypadków nie ustala się etiologii (nadciśnienie pierwotne). Z tego powodu poznanie i lepsze zrozumienie mechanizmów kontrolujących ciśnienie krwi u pacjentów zdrowych i z nadciśnieniem tętniczym jest celem bardzo aktywnych badań eksperymentalnych i klinicznych.

Istnieje ścisły związek pomiędzy prawidłową funkcją nadnerczy, a nadciśnieniem tętniczym. W utrzymaniu homeostazy ciśnienia krwi ważną rolę odgrywa aldosteron produkowany przez warstwę kłębkowatą nadnerczy a jedną z najczęstszych przyczyn wtórnego nadciśnienia tętniczego jest pierwotny hiperaldosteronizm. Powstawanie zaburzeń metabolicznych, w tym nadciśnienia tętniczego może wynikać także ze zwiększonego wydzielania kortyzolu przez komórki warstwy pasmowatej lub nieprawidłowego

metabolizmu tego hormonu. Katecholaminy uwalniane z rdzenia nadnerczy są elementem neurohormonalnej regulacji ciśnienia krwi i ich związek z nadciśnieniem jest dobrze udokumentowany. Wydzielanie katecholamin jest regulowane poprzez glikokortykoidy.

Zróżnicowana sygnalizacja komórkowa prowadzi do uruchomienia różnych mechanizmów do odbierania i realizowania odpowiedzi komórki. Istotnym elementem wewnątrzkomórkowych sieci sygnałowych są kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPKs). MAPKs biorą udział w przekazywaniu sygnałów z szerokiej gamy bodźców zewnątrzkomórkowych, w tym czynników wzrostu, hormonów, cytokin i neuroprzebieżników. Kinazy te są głównymi składnikami szlaków sygnałowych regulujących liczne zdarzenia wewnątrzkomórkowe, takie jak proliferacja, różnicowanie, rozwój, odpowiedź na stres, zaprogramowana śmierć komórki i ekspresja genów. Ponadto, kaskada sygnałowa ERK1/2 MAPK odgrywa ważną rolę w regulacji steroidogenezy, m. in., poprzez wpływ, choć nie do końca jednoznaczny, na ekspresję ostrego białka regulacyjnego steroidogenezy - StAR, które ułatwia szybkie przemieszczanie się cholesterolu z zewnętrznej do wewnętrznej błony mitochondrialnej, co umożliwia biosyntezę hormonów steroidowych *de novo* w odpowiedzi na wzrost ACTH lub angiotensynę II. Kaskada sygnałowa p38 MAPK jest także zaangażowana w regulację steroidogenezy. Angiotensyna II uruchamia zarówno kaskadę ERK1/2 jak i p38 prowadząc do wzrostu ekspresji StAR i hormonów steroidowych. Istnieją jednak dowody wskazujące, że w komórkach nadnerczy, wywołana przez stres oksydacyjny w trakcie starzenia się aktywacja kaskady p38 jest powiązana z hamowaniem steroidogenezy.

Dla sprawnego funkcjonowania sieci sygnałowych istotne są mechanizmy regulujące aktywność jej elementów. Kinazy MAPK są inaktywowane przez fosfatazy MAPKs, które jednocześnie usuwają grupy fosforanowe zarówno z reszt treoninowych, jak i tyrozynowych na aktywnych MAPK, co skutecznie zatrzymuje ich funkcję komórkową.

Aktywność fosfatazy została niedawno przypisana wielodomenowemu i wielofunkcyjnemu białku CacyBP/SIP, które jest zdolne do defosforylacji zarówno kinazy ERK1/2 jak i p38 w różnych typach komórek. Dotychczas nie sprawdzano aktywności fosfatazowej białka CacyBP/SIP w odniesieniu do kinaz ERK1/2 i p38 w komórkach nadnerczy i ewentualnego wpływu tego mechanizmu regulującego na szlaki sygnałowe związane z patogenezą nadciśnienia.

Doktorantka podjęła się wykazania działania białka CacyBP/SIP w roli fosfatazy dla kinazy ERK1/2 i p38 w różnym typie nadciśnienia.

Założony Cel pracy był realizowany poprzez:

- immunohistochemiczną identyfikację i lokalizację białek: CacyBP/SIP, ERK1/2 i p38 w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem pierwotnym (model SHR) i wtórnym (model DOCA-salt) oraz w nadnerczach szczurów odpowiadającym im grupom kontrolnym;

- ocenę porównawczą immunoreaktywności CacyBP/SIP, ERK1/2 i p38 w nadnerczach badanych grup;

- ocenę ekspresji genów *Cacybp*, *Mapk3*, *Mapk1* i *Mapk14* za pomocą metody RT-qPCR w nadnerczach szczurów normotensyjnych i z nadciśnieniem.

Zaprezentowana do oceny praca została przygotowana w postaci monografii liczącej 125 stron i układzie typowym dla rozpraw doktorskich. Obszerny wstęp poprzedzony jest spisem treści oraz wykazem używanych skrótów. W dalszej kolejności dysertacja zawiera założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i streszczenia w języku polskim oraz angielskim. Całość dopełnia piśmiennictwo, spis tabel, licznych rycin i fotografii.

Poszczególne części rozprawy doktorskiej napisane są proporcjonalnie do całości pracy.

Wstęp jest obszernym i spójnym opracowaniem, które zostało podzielone na podrozdziały zarówno stanowiące wprowadzenie w temat rozprawy jak i ściśle związane z przeprowadzanymi przez Doktorantkę badaniami. Ta część rozprawy rozpoczyna się informacjami dotyczącymi nadciśnienia, przedstawiona jest definicja nadciśnienia, krótki rys historyczny obserwacji i badań nad tym zjawiskiem oraz dokładne dane epidemiologiczne, zarówno światowe jak i krajowe. W dalszej części Doktorantka przedstawiła różnice pomiędzy nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym, podała klasyfikację ciśnienia tętniczego krwi i opisała modele zwierzęce do badań nadciśnienia tętniczego koncentrując się zwłaszcza na tych, które używała w swojej pracy, czyli modelu SHR do badania nadciśnienia pierwotnego oraz DOCA-salt - farmakologicznego modelu nadciśnienia wtórnego odzwierciedlającego rolę soli i stresu w patogenezie nadciśnienia tętniczego u ludzi. We wstępie zostały też przedstawione informacje na temat narządowych powikłań w nadciśnieniu. Ponieważ Doktorantka badała zależności pomiędzy białkiem CacyBP/Sip i szlakami MAPK w nadnerczach, we wstępie nie zabrakło opisu budowy histologicznej i czynnościowej nadnerczy, z uwzględnieniem zaburzeń w ich funkcji wydzielniczej w nadciśnieniu. W dalszej kolejności zostały przedstawione informacje na temat białka CacyBP/Sip; jego odkrycia, wielodomenowej budowy i wielofunkcyjności. Doktorantka opisała rolę tego białka jako fosfatazy, ze szczególnym uwzględnieniem jego substratów - kinaz białkowych MAP, czyli ERK1/2 oraz p38. Przedstawiając dokładną charakterystykę tych kinaz Doktorantka powiązała ich aktywność z reniną w przypadku ERK1/2 i korynkosteroidami w odniesieniu do p38.

W części **Materiały i Metody** zostały zawarte informacje dotyczące układu doświadczenia uwzględniające podział na grupy kontrolne i doświadczalne oraz sposób wywołania doświadczalnego nadciśnienia DOCA-salt. Badania uzyskały akceptację Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku. Doktorantka szczegółowo opisała stosowane barwienia immunohistochemiczne na skrawkach parafinowych załączając tabelę ze spisem stosowanych odczynników oraz przedstawiła sposób oceny stopnia intensywności barwienia. W omawianej części rozprawy znalazł się także opis metody izolacji RNA z nadnerczy i sposób przeprowadzenia reakcji qPCR. Do oceny wyników Doktorantka zastosowała prawidłowo dobrane testy statystyczne.

Wyniki dotyczące barwienia immunohistochemicznego zostały przedstawione oddzielnie dla każdego przeciwciała, grupy badanej z uwzględnieniem histologicznej budowy narządu. Wszystkie wyniki zostały przedstawione na 24 fotografiach, ze wskazaniem jądrowej lub cytoplazmatycznej lokalizacji przeciwciała. Zastosowanie pomiarów densytometrycznych i przedstawienie ich w formie tabeli pozwoliło prześledzić zmiany w nasileniu reakcji immunochemicznych. Istotny statystycznie spadek intensywności reakcji przeciw białku CacyBP/SIP został wykazany we wszystkich warstwach nadnerczy szczurów obu grup z nadciśnieniem w odniesieniu do grup kontrolnych, co dokładnie korelowało ze statystycznie istotnym wzrostem intensywności barwienia przeciwciałem anti-p38. Pewne zróżnicowanie intensywności reakcji p-ERK1/2 zostało wykazane w rdzeniu nadnerczy szczurów grupy SHR (istotnie statystycznie wyższe) i DOCA-salt (istotnie statystycznie niższe) w odniesieniu do ich kontroli.

Ocena ekspresji genów *Cacybp*, *Mapk3*, *Mapk1*, *Mapk14* metodą RT-qPCR została przedstawiona w postaci sumarycznej tabeli oraz histogramów porównujących ekspresję określonych genów w poszczególnych grupach kontrolnych i eksperymentalnych. Znamienny statystycznie spadek ekspresji genu *Cacybp* został wykazany w obu grupach z nadciśnieniem, zaś poziom ekspresji genów kodujących ERK1/2 i p38 w obu tych grupach był podwyższony w odniesieniu do kontroli.

Otrzymane wyniki zostały omówione w **Dyskusji**, która napisana jest merytorycznie i w której Doktoranta odnosi się do wyników własnych oraz uzyskanych przez innych badaczy, wykazując się biegłością w łączeniu wielu różnych informacji. Biorąc pod uwagę, że białko CacyBP/Sip zostało odkryte całkiem niedawno i dopiero poznawane są jego wielorakie funkcje nie dziwi brak literatury, do której bezpośrednio mogłaby odnieść się Doktoranta badając występowanie tego białka i ekspresję jego genu w nadnerczach. Tylko nieliczne prace opisują rolę fosfatazową białka CacyBP/Sip. Zatem Doktoranta nawiązuje do pozostałych funkcji tego białka nie wykluczając innej od fosfatazowej jego roli w komórkach nadnerczy.

Tym bardziej, że ocena ekspresji genów była przeprowadzana w materiale pochodzącym z całych nadnerczy i uzyskane wyniki mogą dotyczyć innych komórek niż endokrynowe, np. komórek śródbłonna, licznie obecnych w gruczołach endokrynowych. Wyniki innych badaczy uwzględniające zależności między badanymi białkami w komórkach śródbłonna w innych narządach są celnie dyskutowane w pracy doktorskiej.

We **Wnioskach** Doktorantka zawarła podsumowanie uzyskanych wyników oraz bardzo trafnie zależności między poziomem *CacyBP/Sip*, a p-ERK1/2 i p-p38 określiła mianem odwrotnej korelacji. Mimo iż białko *CacyBP/Sip* i kinazy szlaków MAP są ze sobą powiązane to nie można wskazać na ich zależność przyczynową, gdyż taka nie była badana. Z dużym prawdopodobieństwem można domniemywać, że taka zależność istnieje, ale powinna ona być wykazana w badaniach czynnościowych.

Krótkie streszczenia w języku polski i angielskim zamieszczone po dyskusji w sposób czytelny przedstawiają badane zagadnienia. Piśmiennictwo obejmujące 170 pozycji zostało przedstawione zgodnie z zasadami cytowania. Ostatnim punktem zamieszczonym w pracy jest dokładny opis zawartych w pracy tabel (6), rycin (9) oraz fotografii (24).

Przedstawiona mi do recenzji praca została wykonana z bardzo dużą starannością. Podczas jej czytania nasunęło mi się jedynie kilka drobnych uwag, które przedstawiam poniżej.

- W tekście znalazło się kilka skrótów, które nie zostały wyjaśnione po ich użyciu ani nie znalazły się w wykazie skrótów. Przytaczane są wyniki badań WOBASZ, bez rozwinięcia i podania czym one są, za to niepotrzebnie kilkakrotnie rozwinięty jest skrót RAA. Skrótom zostały przedstawione dodatkowe cząsteczki układu RAA zgrupowane w trzy odrębne osie: ACE-2/Ang(1-7)/receptor Mas; prorenina/PRR/kinaza ERK1/2 oraz Ang-4/AGTR-4/IRAP. Znaczenie ich zostało także pominięte.
- W nazwie zespołu Conna została zamieniona litera czyniąc go zespołem Cohna.
- Określenia sód i potas zamieniłabym na jony sodu i potasu.
- Słowo ischemia nie jest spotykane w języku polskim i powinno zastąpić się je określeniem niedokrwienie.
- Biorąc pod uwagę informacje zawarte we Wnioskach, obejmujące też podsumowanie wyników wydaje mi się celniejsze nazwanie tego rozdziału „Podsumowanie i Wnioski”.
- pozycja literaturowa 105 nie zawiera treści do których została zacytowana.

Nasuwa też się pytanie, jaką ścieżką myślową można podążać, aby interpretować uzyskany w badaniu immunohistochemicznym spadek intensywności barwienia p-ERK1/2 w rdzeniu nadnerczy szczurów DOCA-salt.

Mimo nielicznych uwag uważam pracę za bardzo ciekawą i inspirującą do dalszych badań. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki powinny stać się punktem wyjścia do badań czynnościowych, aby wyjaśnić czy rzeczywiście istnieje związek przyczynowo skutkowy między białkiem CacyBP/Sip i kinazami szlaków MAP, czy też istnieją inne mechanizmy regulujące w nadnerczach zwierząt z nadciśnieniem aktywność kinaz MAP i do jakiego efektu fizjologicznego w nadnerczach zwierząt z nadciśnieniem może prowadzić spadek ekspresji genu i zmniejszona ilość białka CacyBP/Sip.

Ciekawe, czy takie same korelacje uzyskałoby się w badaniach na samicach szczurów, wiadomo bowiem, że aktywność hormonalna nadnerczy jest różna u obu płci.

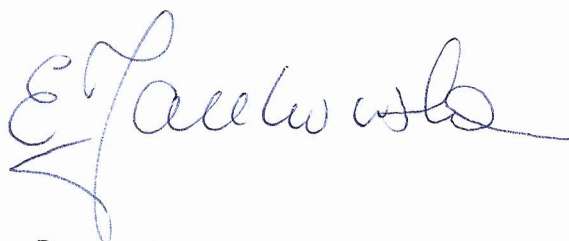
Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska jest oryginalna, dotyczy pionierskich badań białka CacyBP/Sip i próby powiązania jego aktywności z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym. w niezwykle ważnym temacie patogenezy nadciśnienia tętniczego

Chciałabym podkreślić, że powyższe uwagi nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej. Jak słusznie zauważyła Doktorantka wyniki przeprowadzonych badań dostarczają nowych, wcześniej niepublikowanych informacji na temat poziomu ekspresji genu i obecności białka CacyBP/Sip w nadnerczach zwierząt zdrowych i z nadciśnieniem i ewentualnego związku tej cząsteczki z kinazami szlaków MAP, co powinno skłaniać do przeprowadzenia dalszych badań w celu dokładnego wyjaśnienia patomechanizmu obserwowanych zmian.

W związku z powyższym, przedstawiam wniosek Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Smereczańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

Dr hab. n. med. Ewa Jankowska-Steifer



Recenzent rozprawy doktorskiej