

Znak: KHC-2

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Smereczańskiej
pt. " Wpływ CacyBP/SIP na szlak MAPK w nadnerczach w doświadczalnym nadciśnieniu
pierwotnym i wtórnym"**

Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Nauk Medycznych
w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach

40-752 Katowice,
ul. Medyków 18

KIEROWNIK KATEDRY
Prof. dr hab. Piotr Czekał

pcz@sum.edu.pl

tel.: (+48 32) 2088374

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 2088644

fax: (+48 32) 2088656

katedrahistologii@sum.edu.pl

Nadciśnienie tętnicze jest w znacznej mierze schorzeniem cywilizacyjnym, którego negatywne skutki dotyczą prawie jedną trzecią dorosłej populacji Polaków. Aktualnym problemem medycznym pozostaje wciąż poznanie patomechanizmów warunkujących rozwój nadciśnienia oraz skuteczność jego leczenia. Wynika z tego ciągła konieczność poszukiwań nowych metod terapeutycznych, co w początkowym etapie opiera się na badaniach przedklinicznych obejmujących eksperymentalne modele zwierzęce. Interesującym kierunkiem tych poszukiwań wydaje się określenie znaczenia regulacji aktywności i wewnątrzkomórkowej lokalizacji kinaz ERK1/2 i p38 przez niedawno odkryte wielofunkcyjne białko CacyBP/SIP wykazujące aktywność fosfatazową.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Smereczańskiej pt. „Wpływ CacyBP/SIP na szlak MAPK w nadnerczach w doświadczalnym nadciśnieniu pierwotnym i wtórnym” dotyczy ważnego zagadnienia naukowego, zawiera elementy nowości naukowej, wykonana została w oparciu o uznane metody doświadczalne i modele eksperymentalne.

Praca liczy 125 stron, ma typowy układ dla podobnych opracowań naukowych, na który składa się spis treści, wykaz skrótów, wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki badań, dyskusja, wnioski, streszczenie polsko- i anglojęzyczne, wykaz piśmiennictwa obejmujący 170 publikacji oraz spis tabel (6), rycin (9) i fotografii (24). Została napisana starannie pod względem edytorskim, poprawnym językiem.

Tytuł rozprawy odzwierciedla jej treść, jednak niewielkie jego rozbudowanie przez dodanie określenia „białka wielofunkcyjnego” przed „CacyBP/SIP” oraz określenie charakteru „MAPK” jako szlaku sygnałowego przyczyniłoby się do poprawy zrozumienia zawartości pracy przez czytelników zamierzających się z nią zapoznać, a nie związanych bezpośrednio z biologią molekularną.

Podział na rozdziały wyrażony w spisie treści jest przejrzysty i logiczny. Tym niemniej Rozdział III.4 powinien być zatytułowany w sposób określający przedmiot badania (jako ocena ekspresji genów) lub metodę badawczą do oceny tej ekspresji (qPCR), której etapami poprzedzającymi są

izolacja RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji, a nie odwrotnie, jak wynika układu podrozdziałów III.4, III.4.1 i III.4.2, wskazującego, że kolejne etapy są częścią procesu izolacji RNA.

Wstęp rozprawy dobrze, ale może nazbyt obszernie wprowadza czytelnika w zakres zainteresowań Doktoranki, podejmując różne aspekty, których powiązanie było niezbędne dla logicznego skonstruowania zastosowanego modelu doświadczalnego. Wg Recenzenta, Wstęp mógłby być krótszy i pomijać rys historyczny (rozdział 1.2) sięgający roku 2600 p.n.e., czy rozbudowaną informację co to są białka (rozdział 3, str. 32), czy wreszcie odniesienia do danych z lat 1948-80 dotyczące zaburzeń wydzielania hormonów nadnerczy w nadciśnieniu tętniczym (rozdz. 2.3). Sugerowałbym przy okazji publikowania wyników doktoratu pokusić się o pogłębiony przegląd i dyskusję danych przede wszystkim z najnowszych źródeł, z ostatnich 5-10 lat. Ograniczyłoby to też liczbę cytowanych publikacji do najważniejszych.

Zdaniem Recenzenta, publikując wyniki ocenianej rozprawy należy zachować pewną ostrożność w formułowaniu celu głównego pracy jako bezpośrednie „wykazanie działania białka CacyBP/SIP w roli fosfatazy dla kinazy ERK1/2 i p38”. Biorąc pod uwagę przedstawione cele szczegółowe, zastosowaną metodykę i uzyskane wyniki, cel ten rysuje się bardziej jako ocena ekspresji i lokalizacji wewnątrzkomórkowej badanych białek, co może wskazywać na pewną zależność funkcjonalną, jednak nie jest wprost badaniem roli białka CacyBP/SIP jako fosfatazy, tym bardziej, że nie przeprowadzono statystycznej oceny korelacji uzyskanych wyników. W tym kontekście wątek ten nie powinien być nadmiernie dyskutowany jako interakcja CacyBP/SIP z kinazami ERK1/2 i p38, bo ta nie była badana (np. Dyskusja, str. 86: „skupiliśmy się na ocenie białka CacyBP/SIP i jego interakcji z kinazami ERK1/2 oraz p38”).

W rozdziale Materiał i Metody, Doktorantka zamieściła wszystkie podstawowe informacje charakteryzujące metodykę badań, którą się posługiwała. Dla jeszcze większej przejrzystości kolejności i charakterystyki przeprowadzonych eksperymentów można było zastosować dwie dodatkowe ilustracje, tzn. poprzedzić ten rozdział schematem doświadczenia, który pokazywałby sekwencję wykonanych procedur, podział na grupy doświadczalne i kontrolne, i temu podobne informacje kluczowe dla zrozumienia i oceny zakresu wykonanych działań, a także zamieścić tabelkę zawierającą wykaz badanych genów wraz ze skrótami i pełnymi ich nazwami oraz nazwami odpowiednich białek i ich funkcją.

W odniesieniu do metod immunohistochemicznych w rozdziale Materiał i Metody, a następnie w Wynikach sugerowałbym zdecydowanie dokładniejsze określenie, co było celem identyfikacyjnym zastosowania IHC, czyli jaka była spodziewana lokalizacja komórkowa i subkomórkowa odczynu odzwierciedlająca lokalizację badanych białek, jaki był charakter odczynu i rozmieszczenie komórek wykazujących ten odczyn w poszczególnych warstwach oraz udział komórek pozytywnych względem

wszystkich komórek w danej warstwie nadnercza. Przy okazji, w opisie wyników reakcji immunohistochemicznych Autorka powinna doprecyzować określenia typu „mierzone średnią gęstość optyczną badanych obiektów” czy „rozmieszczenie struktur zawierających CacyBP/SIP było różne w poszczególnych grupach zwierząt. O pozytywnym wyniku reakcji świadczyło zabarwienie struktur na kolor brązowy, o różnym nasileniu barwy”, którymi posługuje się, nie podając jednak jakie obiekty/struktury ma na myśli. Ponadto, Autorka osiągnęłaby lepszy efekt wizualizacji i porównania uzyskanych wyników oznaczeń IHC pomiędzy grupami doświadczalnymi tworząc panele zdjęć reprezentatywnych dla grup kontrolnych i badanych zawierające obrazy z poszczególnych warstw kory i z rdzenia nadnerczy wraz z kontrolą izotypową. Przeprowadzona ocena tak opisanych rezultatów powiększyłaby materiał własny do dyskusji i wzbogaciła ją samą w kontekście przeprowadzonego przez Doktorantkę badania.

Drobne uwagi Recenzenta dotyczą zamieszczonych rycin, a mianowicie, niezależnie od podania powiększenia mikroskopowego w podpisie zdjęć sugerowałbym zamieszczenie również skali pomiarowej na każdym zdjęciu. W przypadku słabego odczynu występującego w pojedynczych komórkach dobrze jest wskazać takie komórki za pomocą np. strzałek. Wskazane byłoby zastosowanie i pokazanie na zdjęciach kontroli izotypowej. Nasuwa się tu pytanie czy zastosowano kontrolę izotypową i co nią było? Poza tym, jak Doktorantka interpretuje intensywność reakcji IHC w skali 0-256, w której 0 oznacza biały piksel a 256 – czarny, jako podstawę do oceny ilości produktu reakcji immunohistochemicznej z użyciem programu Nikon Niss-Elements Advanced Research? Należy też uzupełnić opisy wykresów obrazujących ekspresję genów (ryciny 6-8), określając na osi Y jednostki, w jakich wyrażono ekspresję oraz podając znaczenia zastosowanych skrótów i symbolu „*“.

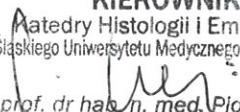
W Dyskusji, Doktorantka przedstawiła wyniki własne na tle danych literaturowych pochodzących z licznych publikacji z piśmiennictwa światowego. Dodatkowo, sugerowałbym zamieszczenie rozdziału lub chociażby akapitu analizującego ograniczenia wykonanego doświadczenia. Takie samokrytyczne podejście wskazuje na naukową dojrzałość doktorantów i świadomość realnej wartości uzyskanych wyników oraz jej znaczenia dla przyszłych badań. Niewątpliwie jednym z takich ograniczeń wartych omówienia jest interpretacja ekspresji specyficznych białek w poszczególnych warstwach kory i w rdzeniu nadnerczy w zestawieniu z ekspresją odpowiednich mRNA w całych nadnerczach, bez uwzględnienia podziału warstwowego, lub tylko podziału na korę i rdzeń, co niewątpliwie utrudnia dyskusję (np. str. 86) oraz wnioskowanie.

Zdaniem Recenzenta w rozdziale Wnioski (który powinien korespondować z postawionym celem głównym) należałoby publikując wyniki wyeksponować wniosek 4 (jako wniosek 1), jednak dla poprawności występującego w nim odwołania się do odwrotnej korelacji powinien zostać poparty odpowiednim testem

statystycznym. Pozostałe wnioski w pewnym stopniu powtarzają uzyskane wyniki, czego należy unikać w opracowaniach naukowych.

Przedstawione powyżej uwagi i komentarze do recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Smereczańskiej są częścią pozytywnej opinii Recenzenta i mam nadzieję, mogą po ich uwzględnieniu okazać się przydatne przy opracowaniu publikacji wyników. Sądzę również, że Doktorantka bez trudu odpowie w czasie obrony na zadane w recenzji pytania.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z roku 2017, poz. 1789), tj. stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego będącego przedmiotem badań, a Autorka pracy wykazała się ogólną wiedzą teoretyczną z zakresu nauk medycznych oraz umiejętnością samodzielnego planowania i prowadzenia pracy naukowej. Dlatego też, wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Smereczańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry Histologii i Embriologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Piotr Czekał