Dr hab. Edyta Reszka, prof. IMP
Zakład Genetyki Molekularnej i Epigenetyki
Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. J. Nofera
Łódź

Łódź, 15 lutego 2017r.

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Agaty Kowalczyk pt.
„Wpływ antagonistów receptorów endotelinowych i inhibitora szlaku NF-κB na ekspresję genu białka NRF2 w mięśniu szkieletowym w czasie stresu oksydacyjnego",**

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Anny Gorącej w Zakładzie Fizjologii Układu Krążenia Międzywydziałowej Katedry Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej.

Badania nad endoteliną (ET), 21-aminokwasowym peptydem, który swoją nazwę zawdzięcza pochodzeniu z komórek śródbłonka, rozpoczęły się około 30 lat temu. Wtedy to, Masashi Yanagisawa przedstawił w tezach swojej pracy doktorskiej sekwencję genową endoteliny i regulację jej ekspresji. Intensywne badania na przestrzeni wielu lat wykazały, że rola endoteliny polega nie tylko na regulacji skurczu naczyń krwionośnych, ale wykazano również, że ten wielofunkcyjny peptyd może wpływać niemal na wszystkie aspekty funkcjonowania komórek zarówno na drodze endokrynnej, jak i parakrynnej.

Wiadomo, że system endotelin oraz ich receptorów, które zlokalizowane są na powierzchni wielu tkanek, zaangażowany jest w regulację wielu procesów fizjologicznych i patofizjologicznych. Należy wskazać tutaj istotną rolę endotelin w rozwoju embrionalnym; w układzie naczyniowym, gdzie mogą przyczyniać się do rozwoju nadciśnienia i miażdżycy tętnic; a wpływając na kurczliwość mięśnia sercowego, odgrywają kluczową rolę w arytmii, jak i przebudowie mięśnia sercowego po zawale. W płucach endotelina wpływa na funkcję oskrzeli i proliferację dróg oddechowych płuc, naczyń krwionośnych i sprzyja rozwojowi nadciśnienia płucnego. Endotelina może również kontrolować równowagę kwasowo-zasadową w nerkach; a w mózgu, regulować ośrodek sercowo-oddechowy, uwalnianie hormonów i przyczyniać się do rozwoju neuronów współczulnych. Ponadto endotelina wpływa na działanie układu odpornościowego, rozrodczego oraz zaangażowana jest w homeostazę glukozy.

Od wielu lat system endotelina/receptor endotelinowy stanowi cel terapeutyczny w poszukiwaniu leków u chorych na nadciśnienie płucne, lekooporne nadciśnienie tętnicze, stwardnienie kłębuszków nerkowych, nowotwory oraz choroby autoimmunologiczne, takie jak choroby tkanki łącznej, odrzucenie przeszczepu, czy nawet choroby metaboliczne, takie jak otyłość i cukrzyca. Wyniki pierwszych badań klinicznych z wykorzystaniem selektywnego antagonisty receptora endotelinowego ETA (ERA, endothelin receptor antagonist), zostały opublikowane w 1995 roku, a w 2001 roku, lek Bosentan (Tracleer™) został zatwierdzony przez US Federal Food and Drug Administration (FDA) do leczenia pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem płucnym (PAH, pulmonary arterial hypetension). Obecnie w terapii PAH stosuje się dwa inne leki stanowiące ERA i zatwierdzone przez FDA, tj. Macitentan (Opsumit™) i Ambrisentan (Letairis™ w USA, Volibris™ w Unii Europejskiej).

Wciąż weryfikuje się potencjał terapeutyczny kilkunastu innych związków zaliczanych do ERA, do stosowania w medycynie układu krążenia, nefrologii, onkologii i pokrewnych dziedzin medycyny. Z tego powodu podjęcie badań podstawowych, mające na celu analizę systemu ET/receptor ET i jego antagonistów z wykorzystaniem różnych modeli badawczych, wydaje się niezwykle istotne, jako

podstawa badań aplikacyjnych w w/w dziedzinach medycyny. Dobrze poznano już mechanizm działania prozapalnego ET-1 oraz jej działania wywołującego stres oksydacyjny, a większość badań dotyczy głównie komórek śródbłonka i mięśni gładkich. W nielicznych badaniach wskazuje się na rolę ET-1 w endotoksemii oraz związek ET-1 ze szlakiem sygnalizacyjnym regulowanym przez czynnik transkrypcyjny NF-κB. Natomiast wciąż brakuje badań na temat współdziałania systemu ET/receptor endotelinowy ET ze szlakiem sygnalizacyjnym Nrf2-ARE.

Brak wiedzy na temat roli antagonistów receptorów endotelinowych ETA i ETB oraz roli inhibitora czynnika tranksrypcyjnego NF-κB na aktywację szlaku NRF2-ARE w mięśniu szkieletowym szczura w czasie stresu oksydacyjnego, skłonił Doktorantkę do przeprowadzenie opisanych w dysertacji badań.

Praca, łącznie ze spisem piśmiennictwa, liczy 131 stron starannie przygotowanego maszynopisu, zawierającego 18 tabel, 18 wykresów i 12 rysunków. Układ pracy jest typowy dla tego rodzaju opracowań, składa się bowiem ze wstępu (36 stron), założeń i celu pracy, rozdziału Materiał i Metody (27 stron), wyników (18 stron), dyskusji (9 stron), 4 wniosków, wykazu skrótów i symboli oraz spisu rycin i tabel, a także wykazu odczynników i sprzętu laboratoryjnego użytych w badaniach. Dysertację zamyka streszczenie (po polsku i angielsku) i spis cytowanego piśmiennictwa w liczbie 193 pozycje.

We wstępie Autorka opisuje, na czym polega stres oksydacyjny i ochrona antyoksydacyjna komórki oraz opisuje, jak przebiegają te procesy w mięśniu szkieletowym. Następnie Doktorantka bardzo obszernie charakteryzuje ET-1 i jej receptory ETA i ETB, mechanizm działania systemu ET-1/ receptory endotelinowe ETA i ETB, związki stanowiące blokery receptorów ETA (BQ123) i ETB (BQ788), a także opisuję rolę ET-1 w indukcji stresu oksydacyjnego i jej działanie prozapalne, także w procesie endotoksemii. W następnym podrozdziale Autorka szczegółowo charakteryzuje szlak sygnalizacyjny regulowany przez NF-κB, opisując również prozapalne działanie tego czynnika transkrypcyjnego w mięśniu szkieletowym; dalej charakteryzuje inhibitor aktywacji NF-κB (JSH-23) oraz opisuje dwa kluczowe mediatory stanu zapalnego: interleukinę 6 (IL-6) oraz czynnik martwicy nowotworu α (TNF-α) w mięśniu szkieletowym. W ostatniej części Wstępu Autorka równie szczegółowo opisuje rolę czynnika transkrypcyjnego Nrf2, aktywację szlaku Nrf2-ARE (antioxidant response element), jego funkcję w cytoprotekcji oraz charakteryzuje dwa enzymy: oksygenzę hemową 1 (HO-1) oraz dysmutazę ponadtlenkową 1 (SOD1), które w sekwencji promotorowej swoich genów posiadają sekwencję ARE, rozpoznawalną przez czynnik transkrypcyjny Nrf2. W ostatnim podrozdziale Wstępu, Doktorantka zwięźle opisuje oddziaływanie pomiędzy dwoma szlakami sygnalizacyjnymi regulowanymi przez NF-κB oraz Nrf2.

Należy podkreślić dużą wiedzę Doktorantki przy pisaniu tego obszernego fragmentu dysertacji i przedstawienie najbardziej istotnych obserwacji łączących współdziałanie kilku procesów: 1) systemu ET-1/ receptory endotelinowe ETA/ETB, szlaków sygnalizacyjnych regulowanych przez czynnik transkrypcyjny 2) NF-κB i 3) Nrf2 oraz 4) endotoksemii. Ta część rozprawy łatwo wprowadza czytelnika w sprecyzowane cztery cele pracy. Pragnę podkreślić, że w przypadku tak rozbudowanego eksperymentu przeprowadzonego na wielu grupach zwierząt, określenie celów badania z pewnością nie było łatwe.

Badania przeprowadzone w pracy doktorskiej miały zatem na celu uzyskanie odpowiedzi na cztery szczegółowe pytania, czy w mięśniu szkieletowym szczura:

1. indukowana lipopolisacharydem (LPS) produkcja cytokin prozapalnych TNF-α i IL-6, będzie hamowana przez ERA (receptory ETA i ETB)?
2. blokery receptorów endotelinowych ETA i ETB wpływają na ekspresję czynnika *Nrf2* i stężenie enzymów antyoksydacyjnych HO-1 i SOD1 podczas endotoksemii?
3. inhibitor aktywacji NF-κB zmniejsza prozapalne działanie ET-1?

Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. Jerzego Nofera, ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8, 91-348 Łódź
tel.: (42) 631 45 02, (42) 631 45 04, faks: (42) 656 83 31, impx@imp.lodz.pl, www.imp.lodz.pl

4. inhibitor aktywacji NF-κB wpływa na aktywację szlaku Nrf2 i stężenie enzymów antyoksydacyjnych HO-1 i SOD1?

Z obowiązku recenzenta, chciałabym wskazać kilka drobnych uchybień zawartych w tej części pracy doktorskiej:

1. We wprowadzeniu do rozdziału Wstęp brakuje odnośników piśmiennictwa (str. 12).
2. Jestem pod dużym wrażeniem braku błędów literowych w obszernym Wstępie, ale też i w całej dysertacji; niestety Autorka nie zastosowała się do zasady posługiwanie się skrótami w tekście naukowym.
3. Nazwa czynnik transkrypcyjny NF-κB wydaje się być bardziej prawidłowa niż czynnik transkrypcji jądrowej NF-κB (str. 26 i wszędzie w tekście).
4. W rozdziale 4.3. Mechanizm aktywacji czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (str. 39), Autorka opisuje, że obecność regionu ARE stwierdzono w ponad 200 genach. Ta informacja rozmija się z informacją podaną dalej, w rozdziale 4.4. Funkcje biologiczne czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (str. 42), gdzie można przeczytać, że czynnik Nrf2 indukuje ekspresję ok. 100 genów.
5. Zdanie „*Dotychczas nie wykazano w jakim stopniu ET-1 odpowiada za prozapalne działanie LPS...*", które można znaleźć w rozdziale Założenia i cel pracy (str. 48), we wprowadzeniu do Wstępu (str. 12) i w streszczeniu w języku polskim (str. 105) oraz angielskim (str. 109) jest niejasne. Na podstawie informacji zawartych we Wstępie, Autorka wskazuje, że to raczej LPS indukuje działanie ET-1 (2.6. Udział endoteliny-1 w endotoksemii, str. 24), podobnie jak w zdaniu, które można znaleźć zarówno we Wstępie, jak i Założeniach i celu pracy oraz w obu streszczeniach pracy: "*w czasie wstrząsu endotoksycznego wywołanego lipopolisacharydem dochodzi również do zwiększonego wydzielania ET-1*".
6. Oddziaływanie dwóch ważnych szlaków sygnalizacyjnych NF-κB i Nrf2-ARE (4.6. Interakcja NF-κB - Nrf2, str. 46) stwierdzono w wielu badaniach i związek ten opisywano szerzej w kilku pracach przeglądowych. Wiadomo, że zahamowanie działania szlaku Nrf2-ARE, wywołuje wzrost produkcji cytokin poprzez aktywację drugiego szlaku, a sam czynnik transkrypcyjny NF-κB prezentuje zarówno negatywną, jak i pozytywną regulację szlaku Nrf2-ARE. Moim zdaniem opis tych istotnych obserwacji opisany jest w dysertacji zbyt ogólnie.

Autorka dysertacji zaplanowała szczegółowo szeroki zakres prac eksperymentalnych z wykorzystaniem samców szczurów szczepu Wistar Kyoto (12 grup zwierząt po 7 osobników), a następnie wykonała żmudne i trudne technicznie badania laboratoryjne, wymagające dużego doświadczenia i wiedzy badawczej. Doktorantka zastosowała w swojej pracy szereg metod i technik, począwszy od narażenia i postępowania ze zwierzętami, preparatyki mięśnia szkieletowego, metod z zakresu biochemii i biologii molekularnej. Doktorantka przeprowadziła aż 12 eksperymentów (wyniki pochodzące z grupy zwierząt otrzymujących DMSO zostały odrzucone przy prezentacji wyników), wymagających dużego namysłu przy stosowaniu tak cennego modelu badawczego.

Zarówno sposób postępowania ze zwierzętami, jak i metody preparatywne i analityczne zostały przedstawione w bardzo szczegółowym opisie. Zastosowane testy immunoenzymatyczne ELISA do oznaczeń stężenia cytokin i enzymów antyoksydacyjnych oraz metoda qRT-PCR do ilościowych oznaczeń ekspresji mRNA, są powszechnie stosowane w wielu ośrodkach naukowych. Dokładny opis postępowania analitycznego, z dużą dbałością o najdrobniejsze szczegóły warsztatowe, świadczy z jednej strony o dokładności i wiarygodności uzyskanych wyników, a z drugiej o dużych umiejętnościach warsztatowych Doktorantki i jej dążeniach do otrzymania możliwie najbardziej rzetelnych wyników.

Moje uwagi po lekturze tej części dysertacji dotyczą następujących zagadnień:

1. Dawki poszczególnych związków oraz czas narażania zwierząt zostały dobrze udokumentowane. Doktorantka nie podaje jednak, w jakim rozpuszczalniku/ach

Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. Jerzego Nofera, ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8, 91-348 Łódź
tel.: (42) 631 45 02, (42) 631 45 04, faks: (42) 656 83 31, impx@imp.lodz.pl, www.imp.lodz.pl

przygotowano roztwory stosowanych blokerów receptorów endotelinowych ETA i ETB, LPS, inhibitora NF-κB oraz ET-1.

2. Wiadomo, że zarówno ET-1, jak i LPS indukuje odpowiedź zapalną. Jaki był powód, że Autorka przeprowadziła eksperyment, w którym po podaniu inhibitora JSH-23, podano zwierzętom ET-1 (grupa zwierząt 11 i 12)?
3. W jaki sposób zabezpieczano próbki tkanek mięśnia szkieletowego udowego do badań genetycznych i jakie kroki zostały podjęte do zabezpieczenia RNA przed działaniem endonukleaz w próbach materiału biologicznego (str. 51)? Ile prób od każdego zwierzęcia zabezpieczano do dalszych oznaczeń biochemicznych i genetycznych?
4. Oznaczenia białka metodą Bradforda w homogenatach tkankowych również wymagają komentarza. Autorka umieściła w tekście opis oznaczeń białka przy każdym z czterech oznaczanych parametrów, tj. TNF-α, IL-6, HO-1 i SOD1. Przy czym dla pierwszego parametru wykonano krzywą kalibracyjną surowiczej albuminy płodowej (BSA) w zakresie od 125 μg/ml do 500 μg/ml (3 stężenia), natomiast dla pozostałych parametrów, krzywa kalibracyjna BSA mieściła się w zakresie od 12,5 μg/ml do 800 μg/ml (7 stężeń). Dlaczego nie wykonano jednorazowego oznaczenia białka w szerokim zakresie stężenia krzywej wzorcowej dla wszystkich prób?

Autorka zaprezentowała wyniki 11 eksperymentów badawczych przeprowadzonych na zwierzętach w sposób szczegółowy i wyczerpujący, dedykując podrozdziały poszczególnym parametrom prozapalnym: ekspresja *NF-κB* oraz stężenie cytokin TNF-α, IL-6, a następnie parametrom antyoksydacyjnym: ekspresja *Nrf2* oraz stężenie enzymów antyoksydacyjnych SOD1 i HO-1, pod kątem efektu działania: antagonistów receptorów endotelinowych 1) ETA i 2) ETB oraz 3) inhibitora szlaku NF-κB; przy braku i w obecności LPS (pkt. 1 i 2) oraz ET-1 (pkt. 3). W ten sposób wyniki zostały umieszczone w 18 podrozdziałach w postaci wykresu i tabeli oraz opisu dedykowanym każdemu z tych podrozdziałów. Otrzymane wyniki Doktorantka poddała analizie statystycznej, z zastosowaniem odpowiednich testów statystycznych dla prób niezależnych.

<u>Komentarz do tej części dysertacji dotyczy jedynie możliwości porównania wyników eksperymentów przeprowadzonych na określonych grupach zwierząt:</u>

1. W trakcie czytania rozprawy doktorskiej nasuwa się pytanie dotyczące braku porównania wpływu LPS (grupa 2) i ET-1 (grupa 3) na badane parametry, takie jak ekspresja genów, stężenie cytokin czy enzymów antyoksydacyjnych. Takie porównanie byłoby niezmiernie ciekawe, skoro są to pierwsze doświadczenia badające wpływ ET-1 na markery prozapalne w mięśniu szkieletowym szczura.
2. Następna kwestia dotyczy braku analizy wyników efektu działania selektywnych blokerów receptorów endotelinowych ETA i ETB (grupa 4, 5, 6 i 7) na ekspresję *NF-κB* i *Nrf2* oraz stężenie cytokin i enzymów antyoksydacyjnych. Dysponując tak cennymi wynikami badań, myślę, że można pokusić się o zbadanie czy i który z receptorów endotelinowych może w większym stopniu brać udział w podpowiedzi prozapalnej czy odpowiedzi antyoksydacyjnej w tkance mięśnia szkieletowego szczura.

Uzyskane w dysertacji wyniki zostały przez Doktorantkę przedyskutowane w sposób niezwykle wnikliwy i krytyczny oraz skonfrontowane z istniejącymi danymi literaturowymi. Rozdział Dyskusja został podzielony na podrozdziały odnoszące się do wpływu 1) LPS na ekspresję *NF-κB* i stężenie cytokin oraz ekspresję *Nrf2* i stężenie enzymów antyoksydacyjnych, 2) wpływu ET-1 na ekspresję *NF-κB* i stężenie cytokin oraz ekspresję *Nrf2* i stężenie enzymów antyoksydacyjnych, 3) wpływu antagonistów receptorów endotelinowych ETA i ETB na ekspresję *NF-κB* i stężenie cytokin oraz ekspresję *Nrf2* i stężenie enzymów antyoksydacyjnych w warunkach endotoksemii, 4) wpływu inhibitora aktywacji NF-κB na na ekspresję *NF-κB* i stężenie cytokin oraz ekspresję *Nrf2* i stężenie enzymów antyoksydacyjnych po podaniu ET-1.

Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. Jerzego Nofera, ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8, 91-348 Łódź
tel.: (42) 631 45 02, (42) 631 45 04, faks: (42) 656 83 31, impx@imp.lodz.pl, www.imp.lodz.pl

W tej części rozprawy doktorskiej, którą Autorka przedstawiła w sposób bardzo zrozumiały dla czytelnika i wykorzystując dużą znajomość tematu, pojawiła się pewna niejasność:

1. Stwierdzenia Autorki: „*W moich badaniach ekspresja Nrf2 częściowo pokrywa się ze stężeniami HO-1. To może wskazywać, że w mięśniu szkieletowym udowym szczura indukcja HO-1 odbywa się za pośrednictwem szlaku Nrf2*"(str. 100) oraz „*Uzyskane przeze mnie wyniki ekspresji Nrf2 oraz stężenia SOD-1 sugerują, że w mięśniu szkieletowym szczura biosynteza tego enzymu może odbywać się za pośrednictwem szlaku Nrf2*" (str. 101) wymagają wyjaśnienia i wskazania, na podstawie jakich wyników można wysnuć takie konkluzje.

Interpretacja wyników nie jest sprawą prostą, szczególnie w przypadku zastosowania tak wielu poszczególnych eksperymentów na zwierzętach. Doktorantka ostrożnie przedstawiła wnioski z tak obszernej pracy eksperymentalnej, które odniosła bezpośrednio do postawionych sobie założeń pracy.

Najważniejsze konkluzje wynikające z analizy wyników Jej pracy, w mojej opinii, są zatem następujące:

1. Zaobserwowano związek pomiędzy systemem ET-1/receptory endotelinowe ETA i ETB a szlakiem sygnalizacyjnym regulowanym przez NF-κB w mięśniu szkieletowym szczura.
2. Zaobserwowano związek pomiędzy systemem ET-1/receptor endotelinowy ETA a szlakiem sygnalizacyjnym Nrf2-ARE w mięśniu szkieletowym szczura.
3. Nie stwierdzono związku pomiędzy dwoma szlakami sygnalizacyjnymi regulowanymi przez NF-κB i Nrf2 w mięśniu szkieletowym szczura.

Oceniając pracę doktorską należy podkreślić, że Doktorantka wykonała żmudne i ciekawe badania, wymagające dużego zaangażowania zarówno w pracę laboratoryjną, jak i wymagające dużej wiedzy. Praca jest niewątpliwie oryginalna, wnosi nowe informacje dotyczące regulacji systemu ET-1/receptory enotelinowe ETA i ETB oraz regulacji szlaków sygnalizacyjnych NF-κB i Nrf2-ARE w mięśniu szkieletowym szczura oraz stanowi dobrą podstawę do kontynuowania pogłębionych badań farmakologicznych antagonistów receptorów endotelinowych ETA i ETB w modelach in vitro oraz modelach zwierzęcych.

Przytoczone z obowiązku recenzenta uwagi, w większości polemiczne, nie wpływają na pozytywną ocenę przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej. Pani mgr Agata Kowalczyk jest dojrzałym badaczem, realizującym cele naukowe we właściwy sposób, nie naruszając podstawowych zasad pracy naukowej. Wykazała cechy starannego i rzetelnego pracownika naukowego dbałego o wiarygodną dokumentację szeroko zakrojonych badań i spostrzeżeń. Perfekcyjnie opanowała warsztat naukowy, wykazała się umiejętnością planowania i realizacji trudnych eksperymentów na zwierzętach, stosowania różnorodnych technik badawczych, analizy wyników badań oraz prowadzenia dyskusji.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę naukową Doktorantki, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, tj. spełnia warunki stawiane rozprawom na stopień doktora określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

E. Reszka

dr hab. n. med. Edyta Reszka, prof. IMP

Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. Jerzego Nofera, ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8, 91-348 Łódź
tel.: (42) 631 45 02, (42) 631 45 04, faks: (42) 656 83 31, impx@imp.lodz.pl, www.imp.lodz.pl