

Katowice 19.01.2024

Recenzja pracy doktorskiej

Lek. Paulina Działalek-Macioszczyk

BIĄŁKA USP18 I DKK3 W CHOROBAH NEREK I UKŁADU SERCOWO-NACZYNIOWEGO

Wyniki badań ostatnich dekad wskazują na zwiększone ryzyko chorób układu krążenia u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (PChN). Mechanizmy patogenetyczne zwiększonego ryzyka chorób układu krążenia u tych chorych są złożone. Wciąż poszukuje się nowych szlaków patogenetycznych mając nadzieję, że ich poznanie poprawi leczenie i rokowanie u chorych z PChN.

W ostatnich latach poznano nowe grupy białek uczestniczących w procesach przewlekłego uszkodzenia nerek i serca. Należą do nich peptydazy swoiste dla ubikwityny (*ubiquitin-specific peptidases - USPs*) oraz glikoproteiny sekrecyjne Dickkopf (Dkk).

Peptydazy specyficzne dla ubikwityny wpływają m.in.: na reakcję na czynniki stresowe, dokomórkowe przekazywanie sygnałów oraz procesy immunologiczne. Jedną z peptydaz specyficznych dla ubikwityny jest peptydaza swoista dla ubikwityny 18 (*ubiquitin-specific peptidase 18 - USP 18*). USP18 jest białkiem zlokalizowanym wewnątrz komórek licznych narządów (m.in wątroby). Białko to jest enzymem pobudzającym usuwanie cząstki ubikwityno-podobnej ISG15 (*interferon-stimulated gene 15*) z zawierających tę cząstkę białek oraz samej ubikwityny. Ponadto pełni role nieenzymatyczne, polegające na hamowaniu aktywności interferonów i zmniejszaniu pobudzenia szlaku sygnałowego JAK-STAT.

Wyniki doświadczeń na zwierzętach wskazują, że USP18 może uczestniczyć m.in. w patogenezie niewydolności serca, będąc potencjalnym czynnikiem ochronnym kardiomiocytów.

Glikoproteiny sekrecyjne Dickkopf (Dkk) są regulatorami szlaku sygnałowego Wnt. Jednym z nich jest Dickkopf-3 (Dkk3). Wyniki doświadczeń na zwierzętach wskazują, że

Dkk3 może uczestniczyć m.in. w patogenezie chorób układu krążenia (w tym miażdżycy) i w patogenezie PChN. Dkk3 jest wytwarzana m.in. przez komórki cewek nerek. W śródmiąszcu nerek białko to pobudza procesy włóknienia tego narządu. Wyniki wstępnych badań klinicznych wskazują, że stężenie Dkk3 w moczu wykazuje dodatnie korelacje z nasileniem zaniku cewek i włóknieniem śródmiąszcu. Dlatego oznaczanie wydalania Dkk3 z moczem może być wykorzystywane jako wskaźnik oceny zwłóknienia nerek w PChN.

Należy mieć nadzieję, że przeprowadzenie badań dotyczących znaczenia USP18 i Dkk3 w procesach uszkadzających nerki oraz układ krążenia umożliwi lepsze poznanie patogenyzy PChN i chorób układu krążenia towarzyszących PChN.

Tematyka ocenianej dysertacji obejmuje badania nad USP18 i Dkk3 u chorych na nadciśnienie tętnicze oraz na PChN.

Przedstawiona mi do oceny praca ma typowy układ. Liczy 31 strony. Do pracy dołączono odbitki 3 publikacji, których zbiorcze podsumowanie jest treścią dysertacji. Forma edytorska pracy z wyraźnym podziałem na rozdziały niewątpliwie ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z treścią dysertacji.

Dysertacja rozpoczyna się *Wykazem publikacji stanowiących rozprawę doktorską*. Dwie prace oryginalne i jedna przeglądowa stanowią rdzeń rozprawy doktorskiej. Ich łączny współczynnik oddziaływania (*impact factor*) wynosi 7,969 a liczba punktów MNiSW 350. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich trzech powyższych publikacjach. Ponadto w pracy zamieszczono oświadczenia współautorów publikacji określający zakres wkładu pracy Doktorantki w powstanie powyższych publikacji. Tak więc, wiodący udział Autorki dysertacji w powstaniu ocenianego cyklu prac nie budzi wątpliwości.

W rozdziale *Wprowadzenie* Doktorantka wprowadziła czytelnika w tematykę pracy zamieszczając informacje dotyczące peptydazy swoistej dla ubikwityny 18 (USP18) oraz glikoproteiny sekrecyjnej Dickkopf-3 (Dkk3). Na początku tego rozdziału Autorka przedstawiła znaczenie peptydaz specyficznych dla ubikwityny (w tym USP18) w warunkach fizjologii. Następnie Doktorantka omówiła wynikające głównie z wyników badań na zwierzętach potencjalne znaczenie tego białka w patogenezie chorób układu krążenia. Kolejną część *Wprowadzenia* dotyczy Dkk3. Autorka omówiła znaczenie tego białka w procesach fizjologicznych. Następnie Lek. Paulina Działalek-Macioszczyk przedstawiła dane dotyczące potencjalnego udziału Dkk3 w patogenezie PChN. Wstęp rozprawy doktorskiej jest zwięźle napisany a informacje podane w nim są odpowiednio usystematyzowane.

Po rozdziale rozprawy doktorskiej *Wprowadzenie*, Doktorantka zamieściła rozdział *Cel pracy*. W tym krótkim rozdziale Autorka uzasadniła w sposób zwięzły celowość przeprowadzonych badań. Wymienionymi przez Doktorantkę celami pracy doktorskiej były: analiza zależności między stężeniem USP18 w surowicy a występowaniem nadciśnienia tętniczego u nieleczonych chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz ocena związku USP18 z czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego, ocena zależności między stężeniem Dkk3 w surowicy i moczu pacjentów w różnych stadiach PChN a klinicznymi, laboratoryjnymi i histopatologicznymi wskaźnikami aktywności chorób nerek oraz ocena białek USP18 i Dkk3 jako potencjalnych biomarkerów uszkodzenia nerek i serca.

Podjęty przez Lek. Paulinę Działalek-Macioszczyk temat porusza istotne i jak dotąd w nieznacznym stopniu zbadane zagadnienia dotyczące patogenezy nadciśnienia tętniczego i PChN, i jest trafny, z punktu widzenia poznawczego, jak i mogący mieć w przyszłości pewne implikacje kliniczne.

Pierwsza z trzech prac, będących treścią dysertacji pt: *“Relationship Between Ubiquitin-Specific Peptidase 18 and Hypertension in Polish Adult Male Subjects: A Cross-Sectional Pilot Study*, została opublikowana a roku 2020 w renomowanym czasopiśmie *Medical Science Monitor* i jest pracą oryginalną. W pracy przedstawiono analizę stężeń USP18 w surowicy u mężczyzn podzielonych na trzy grupy na podstawie ciśnienia tętniczego tj. osoby bez nadciśnienia tętniczego, chorych z izolowanym nadciśnieniem rozkurczowym oraz nadciśnieniem tętniczym skurczowo-rozkurczowym. Kryteria kwalifikacji do badania jak i kryteria wykluczające z udziału w badaniu oraz losowy sposób rekrutacji chorych do badania, został ustalony w sposób bardzo staranny. Stężenie USP 18 w surowicy było mierzone przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu ELISA. Pozostałe oznaczenia wykonywane w surowicy i moczu przeprowadzono przy pomocy rutynowych metod. Metody zastosowane w badaniu, w tym metody analiz statystycznych wyników badania nie budzą zastrzeżeń. W pracy stwierdzono istotne różnice w stężeniu USP18 w surowicy między badanymi grupami chorych. Stężenie USP18 w surowicy u chorych z nadciśnieniem tętniczym skurczowo-rozkurczowym było ok. 6 razy większe niż u osób bez nadciśnienia oraz ponad 4 razy większe niż u chorych z izolowanym nadciśnieniem rozkurczowym. Wykazano dodatnie korelacje między stężeniem USP18 w surowicy a skurczowym ciśnieniem tętniczym, ciśnieniem tętna oraz częstością rytmu serca. Nie stwierdzono korelacji między stężeniem USP18 w surowicy a wskaźnikiem albumina/kreatynina w moczu (UACR), czyli wskaźnikiem stosowanym w ocenie stopnia uszkodzenia nerek oraz zaburzeń czynności

śródbłonka. Na wynik ten niewątpliwie miał wpływ fakt, że we wszystkich analizowanych grupach UACR było prawidłowe. Na podstawie powyższych wyników postawiono hipotezę, że do zwiększenia stężenia USP18 w surowicy dochodzi w przypadku zwiększenia obciążenia lewej komory serca oraz subklinicznego uszkodzenia kardiomiocytów. Hipoteza ta niewątpliwie wymaga potwierdzenia w przyszłych badaniach analizujących m.in. stężenia USP18 w surowicy w kontekście parametrów czynności serca u chorych ze zróżnicowaną wydolnością serca.

Druga z trzech prac, będących treścią dysertacji pt. *"Patterns of Dickkopf-3 Serum and Urine Levels at Different Stages of Chronic Kidney Disease"* została opublikowana a roku 2023 w renomowanym czasopiśmie *Journal of Clinical Medicine* i jest pracą oryginalną. W pracy oceniono stężenie białka Dkk3 w surowicy i moczu u osób zdrowych i chorych z PChN ze zróżnicowaną czynnością nerek tj: z prawidłową funkcją nerek (u chorych z potwierdzonym biopsyjnie kłębuszkowym zapaleniem nerek z białkomoczem lub aktywnym osadem moczu z zachowaną filtracją kłębuszkową), ze stabilną PChN ze zmniejszona filtracją kłębuszkową, pacjentów dializowanych oraz chorych po przeszczepieniu nerki). U tych chorych oraz u osób zdrowych wykonano podstawowe badania biochemiczne surowicy i moczu i oznaczenia stężeń Dkk3 w surowicy i moczu oraz oceniono prędkości fali tętna. Kryteria kwalifikacji do badania jak i kryteria wykluczające z udziału w badaniu zostały ustalone w sposób precyzyjny. Stężenie Dkk3 w surowicy i moczu było mierzone przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu ELISA. Pozostałe oznaczenie wykonywane w surowicy i moczu przeprowadzono przy pomocy rutynowych metod. Metody zastosowane w badaniu, w tym metody analiz statystycznych wyników nie budzą zastrzeżeń. W tej pracy stwierdzono najwyższe wydalanie Dkk3 z moczu u pacjentów z upośledzoną ale stabilną czynnością nerek, które znacznie przewyższało wartości w innych grupach. Ponadto, wydalanie Dkk3 w moczu u chorych po przeszczepieniu nerki było dwukrotnie większe niż u osób bez chorób nerek oraz grupie z PChN i z prawidłową funkcją nerek. Ponadto wykazano występowanie dodatniej korelacji między wydalaniem Dkk3 w moczu a stężeniem kreatyniny w surowicy u pacjentów z PChN i z upośledzoną czynnością nerek oraz u chorych po przeszczepieniu nerki.

Na dojrzałość badawczą Doktorantki wskazują zawarte w powyżej omówionych pracach oryginalnych trafne uwagi dotyczące ograniczeń badań będących treścią pracy doktorskiej.

Ostatnia z trzech prac, będących treścią ocenianej dysertacji pt. "*Versatility of USP18 in physiology and pathophysiology*" jest pracą poglądową i została opublikowana w roku 2019 w czasopiśmie *Acta Biochemica Polonica*. W pracy omówiono strukturę białka USP18 jego znaczenia fizjologii i patofizjologii z uwzględnieniem jego znaczenia w patogenezie m.in. chorób układu krążenia.

Rozprawę kończy 6 wniosków, których treść jest zgodna z celami pracy i logicznie wynika z analiz wyników uzyskanych w badaniu będącym treścią rozprawy doktorskiej. Krytyczna uwaga dotyczy wniosku czwartego w którym nie podano czy stężenie Dkk3 odnosi się do surowicy czy moczu.

Wykaz cytowanego piśmiennictwa obejmuje prace cytowane we *Wprowadzeniu*. Prace te są aktualne, są prawidłowo dobrane i w większości przypadków odpowiednio cytowane w tekście. W wykazie brakuje pracy nr 17 która została zacytowana we *Wprowadzeniu*.

W tekście rozprawy Doktorantka nie ustrzegła się nielicznych drobnych błędów typograficznych.

Oceniając prace będące treścią rozprawy, należy podkreślić umiejętność Doktorantki skonfrontowania własnych wyników z danymi literaturowymi. Prace te są dobrym opracowaniem odpowiednio dobranego materiału klinicznego z zastosowaniem adekwatnych narzędzi badawczych. Rozprawa została poprawnie opracowana pod względem edytorskim.

Autorka dowiodła zdolności prowadzenia oryginalnych badań klinicznych oraz wykazała się dobrym przygotowaniem merytorycznym i umiejętnością samodzielnego formułowania i rozwiązywania problemów naukowych.

Kończąc pragnę jeszcze raz podkreślić istotne walory poznawcze wykonanych badań.

W podsumowaniu recenzji, stwierdzam, że rozprawa doktorska Lek. Pauliny Działalek-Macioszczyk spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) wymagane na stopień doktora nauk medycznych. Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

9364431
Prof. dr hab. n. med. Marcin Adamczak
Specjalista w dziedzinie nefrologii wewnętrznych
Specjalista nefrolog
Specjalista hipertensjolog

Prof. dr hab. n. med. Marcin Adamczak