



Gdańsk, 17 października 2021

Prof. dr hab. med. Rafał Olszanecki
Przewodniczący Rady Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytet Jagielloński - Collegium Medicum

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Eweliny Józefczuk pt. „Rola sfingozyny 1 w patofizjologii nadciśnienia tętniczego indukowanego angiotensyną II u myszy”.

Praca doktorska mgr. Eweliny Józefczuk składa się z cyklu trzech prac w tym dwóch oryginalnych oraz jednej przeglądowej. We wszystkich pracach doktorantka jest pierwszym autorem. Jakość publikacji jest na najwyższym poziomie. Jedna z prac jest opublikowana w prestiżowym czasopiśmie - Hypertension.

Doktorat zawiera: Wprowadzenie, Spis publikacji stanowiących rozprawę doktorską, Cele rozprawy doktorskiej, Dyskusję publikacji 1, 2 i 3, Wnioski z cyklu prac, Podsumowanie cyklu prac, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim, Wykaz skrótów, Piśmiennictwo, Teksty publikacji oraz oświadczenia współautorów. Praca doktorska liczy łącznie 115 stron. Przyjęty przez doktorantkę układ pracy jest oczywiście jak najbardziej do zaakceptowania, jednak moim zdaniem lepiej by było gdyby omówienia wyników wchodzących w skład doktoratu były przedstawione całościowo, a nie dla każdej pracy osobno. W obecnym układzie doktorat wygląda bardziej jako omówienie trzech odrębnych prac, a nie jako jedna całość.

Głównym zagadnieniem którego dotyczy praca doktorska jest analiza znaczenia enzymu odpowiedzialnego za syntezę fosforanu sfingozyny - kinazy sfingozyny 1 w rozwoju patologii sercowo-naczyniowych. Kinaza sfingozyny 1 jest enzymem odpowiedzialnym za syntezę fosforanu sfingozyny (SIP) związku działającego regulacyjnie poprzez receptory błonowe lub wewnątrzkomórkowo poprzez interakcję z białkami kaskad sygnałowych. Brak równowagi tego systemu w szczególności wiązany był z rozwojem nadciśnienia tętniczego. Wybór tematu uważam za właściwy biorąc po uwagę znaczenie problemu nadciśnienia i brak pełnego zrozumienia mechanizmów. Szczególnym argumentem za podjęciem takich badań są kontrowersje co do roli kinazy sfingozyny 1 w tej patologii. Wcześniejsze prace wskazywały na zarówno naczynioskurcowe działanie zwiększonej aktywności tego szlaku sprzyjające rozwojowi nadciśnienia jak i naczyniorozszerzające - hamujące rozwój nadciśnienia.



Cele rozprawy doktorskiej zdefiniowano jako:

- 1) Przegląd literatury dotyczącej roli szlaku kinazy sfingozyny 1 oraz fosforanu sfingozyny w kontekście chorób sercowo-naczyniowych.
- 2) Zbadanie efektów farmakologicznego hamowania kinazy sfingozyny 1 na rozwój nadciśnienia tętniczego oraz towarzyszącego mu przerostu serca zależnego od angiotensyny II u myszy.
- 3) Zbadanie wpływu wyciszenia ekspresji kinazy sfingozyny 1 na przerost mysich noworodkowych kardiomiocytów in vitro

Moim zdaniem cele rozprawy doktorskiej powinny być nieco inaczej sformułowane. Cele powinny odnosić się do przeprowadzonych badań i nie powinno się wśród nich wymieniać przeglądu literatury. Dobrze było by podać ogólny cel prowadzonych badań stanowiący rozwinięcie tytułu po którym powinny być przedstawione cele szczegółowe odnoszące się do poszczególnych prac eksperymentalnych i publikacji. W obecnym układzie jest to bardziej lista publikacji włączonych do doktoratu.

Metodologia prowadzonych w ramach doktoratu prac eksperymentalnych obejmowała badania in vivo u myszy którym wszczepiane były podskórnie pompy osmotyczne podające Angiotensynę II, analizy skurczu i rozkurczu naczyń krwionośnych z zastosowaniem miografu naczyniowego, hodowle ludzkich komórek śródbłonna naczyniowego, ocena ekspresji genów metodą real-time qPCR, ocena zawartości białek metodą Western Blot, analizy histologiczne, analizy transkryptomu metodą RNA-seq a także izolacja oraz hodowla mysich kardiomiocytów noworodkowych. Procedury przeprowadzone bezpośrednio przez doktorantkę zgodnie z informacją podaną w załączonych listach od współautorów obejmowały izolację oraz hodowlę mysich kardiomiocytów, ocenę ekspresji genów metodą real-time PCR, ocenę zawartości białek metodą Western Blot, niektóre procedury in vivo takie jak pomiary ciśnienia krwi u myszy oraz pomiary funkcji naczyń krwionośnych ex vivo. Doktorantka osobiście wykonywała również kluczowe elementy badań takie jak przeglądy piśmiennictwa, opracowanie planów badań, opracowanie wyników oraz ich interpretacja a także przygotowanie manuskryptów prac.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wykazały, że zahamowanie kinazy sfingozyny 1 w modelu eksperymentalnym in vivo może przyczynić się do zmniejszenia patologicznego przerostu mięśnia sercowego oraz do poprawy funkcji śródbłonna naczyniowego. W badaniach tych wykazano, że długotrwałe podawanie inhibitora kinazy sfingozyny 1 (PF543) u myszy u których jednocześnie indukowane jest nadciśnienie,



poprawia zdolność rozkurczową naczyń kręgowych. Wykazano również, że podawanie PF543 myszom nadciśnieniowym częściowo zapobiega patologicznemu przerostowi lewej komory serca w odpowiedzi na AngII. Analizy transkryptomiczne ujawniły spadek ekspresji charakterystycznych dla przerostu serca markerów, natomiast analizy histologiczne dowiodły, że PF543 zapobiega zwiększeniu rozmiaru kardiomiocytów w sercach myszy nadciśnieniowych nie wpływając przy tym na stopień zwłóknienia tkanki. Mechanizm działania PF543 może wynikać z obniżenia ekspresji receptora S1PR1 oraz zwiększonego poziomu prekursorów syntezy fosforanu sfingozyny co w konsekwencji powoduje zmiany zależnych kaskad sygnalizacyjnych.

Badania z zastosowaniem kardiomiocytów noworodkowych w których wyciszono ekspresję kinazy sfingozyny 1 przed stymulacją angiotensyną II nie wykazały zmian profilu ekspresji mRNA powiązanych z patologicznym przerostem. Pojawiły się jednak zmiany ekspresji sugerujące udział kinazy sfingozyny 1 w fizjologicznym wzroście kardiomiocytów. Zwiększona aktywność szlaków charakterystycznych dla dojrzewania kardiomiocytów przy niedoborze kinazy sfingozyny 1 związana było z aktywacją i zwiększeniem ekspresji kinaz Akt oraz Mkk4.

W podsumowaniu, badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wykazały pewien potencjał terapeutyczny inhibitorów kinazy sfingozyny 1 w zapobieganiu przerostowi serca oraz poprawie funkcji śródbłonna w nadciśnieniu. Dodatkowo, po raz pierwszy wykazano rolę kinazy sfingozyny 1 w regulacji molekularnych szlaków charakterystycznych dla procesu dojrzewania kardiomiocytów.

Wynik tych badań uważam za znaczące i unikalne, a ich rzetelność poddana została skrupulatnej analizie przez recenzentów czasopism. Poza wspomnianymi wcześniej uwagami co do konstrukcji, praca przygotowana jest starannie.

Przedstawione badania są bardzo inspirujące, jednak w kontekście przyszłych terapii najważniejszym pytaniem jest w jakim stopniu te wyniki mają odniesienie do patologii człowieka. Wszystkie badania przeprowadzono z zastosowaniem mysich modeli in vivo lub z zastosowaniem mysich komórek. Czy są dane wykazujące jak procesy te funkcjonują w komórkach ludzkich? Czy są przesłanki, że szlak sygnalizacyjny związany z kinazą sfingozyny 1 zmienia się w patologicznym przerostu serca i uszkodzeniu śródbłonna u człowieka? Bardzo cenne było by również zebranie informacji na temat efektów sercowo-naczyniowych towarzyszących klinicznemu zastosowaniu substancji interferujących z badanym systemem takich jak wspomniany w doktoracie Fingolimod. Pewnym problemem który można zauważyć zarówno w konstrukcji stanowiącej część doktoratu pracy przeglądowej jak i zaplanowanych badań jest założenie, wszystko funkcjonuje tak samo, co nie musi być



prawdziwe. W moich własnych badaniach związanych z innym system - sygnalizacją purynergiczną różnice dotyczące enzymów tworzących substancje sygnalizujące czy receptorów często były fundamentalne. Dlatego zwłaszcza w opracowaniach translacyjnych powinno być omówienie dotyczące adekwatności wyciąganych wniosków do człowieka i patologii ludzkich.

Wymienione uwagi do ocenianej przeze mnie pracy w żadnej mierze nie umniejszają jej bardzo wysokiej wartości. Praca doktorska mgr Eweliny Józefczuk stanowi znaczący wkład w zrozumienie mechanizmów patologicznych w układzie sercowo-naczyniowym. Badania te mogą pomóc w opracowaniu nowych terapii hamujących progresję związanego z nadciśnieniem przerostu serca i dysfunkcji śródbłonka. Ponadto badania te ujawniły nowe funkcje kinazy sfingozyny 1 w różnicowaniu komórek mięśnia sercowego. Oceniana praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawie doktorskiej określone w aktualnie obowiązujących regulacjach prawnych. Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum w Krakowie o dopuszczenie mgr Eweliny Józefczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem
KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
prof. dr hab. Ryszard Tomasz Smoleński