



Prof. dr hab. n. farm. Ewa Chabielska
Zakład Biofarmacji
ul. Mickiewicza 2C
15-222 Białystok
Tel.85 7485607
e-mail: ewa.chabielska@umb.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Eweliny Józefczuk
„Rola kinazy sfingozyny 1 w patofizjologii nadciśnienia tętniczego
indukowanego angiotensyną II u myszy”

Promotor: Dr hab. n. med. Mateusz Siedliński

Ostatnie dwie dekady przyniosły przełom w dziedzinie badań nad rolą sfingolipidów w biologii komórki. Szczególnie dotyczy to znaczenia sfingozyno 1 fosforanu (S1P), jego receptorów oraz enzymów metabolizujących S1P, w tym kinaz sfingozyny (Sphk1/2), przeprowadzających fosforylację sfingozyny do S1P. Ostre i chroniczne zmiany stężenia S1P obserwuje się w przebiegu chorób autoimmunologicznych, chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych, uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego czy dysfunkcji naczyń. Wprowadzenie do terapii stwardnienia rozsianego agonisty receptora typu 1 dla S1P zachęca do dalszych badań nad składowymi tego szlaku, jako potencjalnymi punktami uchwytu nowych strategii terapeutycznych.

Do chwili obecnej znaczenie zaburzeń metabolizmu sfingolipidów i zależnych od pobudzenia receptorów S1P szlaków sygnalizacyjnych w patologii serca i naczyń jest słabo poznane i dotyczy w ogromnej przewadze badań przedklinicznych. Biorąc pod uwagę utrzymujące się nadal wysokie wskaźniki zachorowalności i śmiertelności w wyniku chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym niewydolność serca, która w swojej zaawansowanej postaci jest przyczyną śmierci około 50% chorych w ciągu roku, poszerzenie wiedzy o patologii tego schorzenia i poszukiwanie nowych terapii, znajduje się obecnie wśród najbardziej palących zadań stojących przed badaczami nauk podstawowych i klinicystami.

Wobec powyższego aktualność i znaczenie tematu badawczego w pełni uzasadnia podjęcie badań stanowiących zakres rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Józefczuk. Badania opierały się na wyjściowej hipotezie zakładającej, że ingerencja w szlak Sphk1/S1P, polegająca na wyłączeniu farmakologicznym bądź genetycznym aktywność Sphk1, reguluje procesy molekularne związane z naczynio- i kardioprotekcją w warunkach patologii układu krążenia. Wyniki, które Doktorantka uzyskała w pierwszym etapie pracy doprowadziły do dalszych nowatorskich odkryć dotyczących roli Sphk1 w procesie dojrzewania noworodkowych kardiomiocytów.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Józefczuk składa się z trzech spójnych tematycznie publikacji.

Pierwsza z cyklu - publikacja przeglądowa pt: *Significance of sphingosine-1-phosphate in cardiovascular physiology and pathology*. Józefczuk E, Guzik TJ, Siedliński M. *Pharmacological Research*. 2020 Jun;156:104793. Doi: 10.1016/j.phrs.2020.104793, jest wyczerpującą analizą 232 pozycji literatury z okresu od 1985 do 2020 r. Pisząc ją, Doktorantka wykorzystwała głównie prace źródłowe, co dowodzi rzetelnej analizy tematyki badawczej. Praca jest potrzebnym i bardzo wartościowym rozszerzeniem opublikowanej rok wcześniej pracy autorów z Harvard Medical School o fizjologicznej i patologicznej roli S1P w organizmie oraz potencjalnych możliwościach terapeutycznych związanych z wielokierunkową i wielokomórkową modulacją jego funkcji. (*Sphingosine*

1-phosphate: *Lipid signaling in pathology and therapy. Cartier A, Hla T: Science 2019 366(6463):eaar5551. doi: 10.1126/science.aar5551.*)

W swojej pracy Doktorantka opisuje rolę S1P, który działając jako cząsteczka sygnałowa lub jako ligand receptorów bierze udział w utrzymywaniu homeostazy układu sercowo-naczyniowego. W okresie prenatalnym S1P jest niezbędny do wytworzenia funkcjonalnej sieci naczyniowej oraz prawidłowego rozwoju serca, a brak równowagi szlaku S1P prowadzi do letalnych wad rozwojowych serca i naczyń wieńcowych. W dojrzałym organizmie S1P reguluje napięcie naczyń, utrzymuje integralność śródbłonna, procesy przebudowy tkanki sercowej, reguluje kurczliwość serca. Brak równowagi w syntezie oraz przekaźnictwie S1P jest przyczyną między innymi: zmian przepuszczalności naczyń, promowania procesów zapalnych, nadciśnienia tętniczego, miażdżycy, zaburzeń kurczliwości serca i jego przerostu, a w konsekwencji poważnych zdarzeń sercowo-naczyniowych. Złożoność mechanizmów działania, szeroka lokalizacja oraz współistniejące patologie są przyczyną niejednoznacznej roli S1P w układzie sercowo-naczyniowym. Doktorantka wskazuje na konieczność szczegółowej analizy mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zmiany fenotypowe serca i naczyń oraz na wymogi metodologiczne, które należy uwzględnić w celu uzyskania wiarygodnych wyników.

W artykule zwracają uwagę złożone, autorskie ryciny przedstawiające rolę S1P w rozwoju embrionalnym serca, w naczyniach z wyróżnieniem mięśniówki gładkiej i śródbłonna oraz w fibroblastach i miocytach serca. Praca przeglądowa jest dowodem bardzo dobrego przygotowania Doktorantki do badań nad tezami rozprawy doktorskiej oraz umiejętności krytycznej oceny tekstu naukowego i formułowania wniosków. Lektura tej pracy pozostawiła mnie z silnym przekonaniem o konieczności badań nad plejotropowymi efektami S1P w układzie krążenia.

W pracy drugiej pt: *Cardiovascular effects of pharmacological targeting of sphingosine kinase 1. Hypertension. 2020 Feb;75(2):383-392. Doi.10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13450. Józefczuk E, Nosalski R, Saju B, Crespo E, Szczepaniak P, Guzik TJ, Siedliński M.* Doktorantka badała naczynio- i kardioprotekcyjne działanie selektywnego inhibitora Sphk1 - PF543 w układzie *in vivo*. U samców myszy indukowała nadciśnienie tętnicze oraz przerost serca podaniem angiotensyny II (Ang II). PF543 stosowała w dwóch dawkach dobierając je tak, aby selektywnie hamowały Sphk1 w sercu myszy i surowicy (1 mg/kg) lub w naczyniach płucnych (10 mg/kg). Inhibitor podawano chronicznie (2 tygodnie) równoległe z wlewem Ang II lub jednorazowo, po ustaleniu nadciśnienia.

Wykazała, że hamowanie enzymu w trakcie rozwoju nadciśnienia istotnie zapobiegało zwiększeniu masy serc myszy bez zmian ciśnienia skurczowego krwi, co jak Doktorantka sugeruje, ma związek z brakiem wpływu inhibitora na kurczliwość naczyń. Dowiodła natomiast, w eksperymencie *ex vivo*, że PF543 poprawia funkcję śródbłonna naczyniowego, poprzez zmniejszenie fosforylacji eNOS na treoninie 495. W zastosowanym układzie badawczym poprawa funkcji śródbłonna nie kompensowała zatem zależnych od Ang II mechanizmów prowadzących do rozwoju nadciśnienia. Opisanie przez Doktorantkę podobnych, korzystnych efektów działania PF543 w komórkach ludzkiego śródbłonna naczyniowego wydaje się ważne z punktu widzenia klinicznego.

W celu wyjaśnienia mechanizmów związanych z hamowaniem przebudowy lewej komory serca myszy Doktorantka wykonała szereg logicznie zaplanowanych eksperymentów. Wykazała, że PF543 zwiększa poziom wybranych prekursorów S1P oraz obniża ekspresję receptora S1pr1 na poziomie białka w sercach chorych myszy. Zauważyła spadek ekspresji genów będących markerami patologicznego przerostu serca. Stwierdziła, że PF543 wpływa przede wszystkim na przebudowę tkanki, organizację cytoszkieletu aktynowego i produkcję cytokin. Należy podkreślić, że nie wykazała zmian szlaków związanych z apoptozą, nekrozą i autofagią. Zauważyła, że PF543 zmniejszył rozmiar kardiomiocytów, lecz nie zmienił stopnia zwłóknienia mięśnia sercowego, mimo hamującego wpływu na ekspresję genów kolagenu typu I i III. Obserwowała też istotnie zmniejszoną ekspresję markerów białkowych przerostu serca, takich jak *fibronektyna 1* oraz *α-aktyny komórek mięśni gładkich*. Wykazała, że podawanie PF543 częściowo hamuje zwiększoną, w lewej komorze serca u chorych myszy, sygnalizację szlaków związanych z patologiczną przebudową serca, takich jak ekspresja/stopień fosforylacji takich kinaz jak *Erk1/2*, *kinazy białkowej C*, *kinazy białkowej związanej*

z *Rho1* i czynnika transkrypcyjnego *Stat3*. Reasumując, Doktorantka dowiodła, że farmakologiczne hamowanie aktywności *Sphk1* moduluje funkcję naczyń na poziomie śródbłonna i redukuje przebudowę mięśnia serca u myszy z nadciśnieniem indukowanym Ang II. W mojej ocenie wyniki, które otrzymała, mają także istotne wartości metodologiczne, bowiem poszerzają charakterystykę eksperymentalnego modelu nadciśnienia indukowanego Ang II u myszy w aspekcie udziału szlaku *Sphk1/S1P*.

Doktorantka bardzo szczegółowo i krytycznie dyskutuje w publikacji uzyskane wyniki, wskazując między innymi na możliwość wpływu płci na wyniki badań. Moje zainteresowanie wzbudzają też inne zagadnienia: Czy efekty działania PF543 w układzie sercowo-naczyniowym mogą zależeć od modelu nadciśnienia? Ponadto, zważywszy na wielorakie związki *S1P* z układem hemostazy i zapaleniem – czy Doktorantka badała, bądź zauważyła w trakcie procedur na zwierzętach, zmiany krzepnięcia krwi?

W kolejnej pracy pt: *Silencing of sphingosine kinase 1 affects maturation pathways in mouse neonatal cardiomyocytes. International Journal of Molecular Science. 2021. 22(7):3616. Doi: 10.3390/ijms22073616. Józefczuk E, Szczepaniak P, Guzik TJ, Siedliński M.* Doktorantka opisała badania dotyczące molekularnych mechanizmów zaangażowanych w regulowany *Sphk1* przerost kardiomiocytów noworodkowych w modelu *in vitro*. Transferowane siRNA przeciwko *Sphk1* (*siSphk1*) kardiomiocyty noworodkowe i komórki kontrolne poddawano 24-godzinnej stymulacji Ang II w stężeniu farmakologicznym 1 μ M. Doktorantka uzyskała nowatorskie wyniki (dotychczas znaczenie szlaku *Sphk1/S1P* w rozwoju serca badano w okresie prenatalnym) dowodząc roli *Sphk1* w dojrzewaniu kardiomiocytów w okresie pourodzeniowym. Do kluczowych wyników należy zaliczyć zmianę profilu transkryptomycznego kardiomiocytów serca myszy polegającą na aktywacji szlaków fizjologicznego wzrostu kardiomiocytów i hamowaniu ich proliferacji, a więc charakterystycznych dla ostatniego etapu różnicowania tych komórek w okresie noworodkowym. Wyciszenie *Sphk1* nie ma natomiast istotnego wpływu na aktywność szlaków związanych z patologicznym wzrostem komórek. Niedobór *Sphk1* aktywował w szczególności szlak z udziałem kinazy *Akt* oraz hamował zależny od niego szlak z udziałem kinazy glikogenowej *3 β* . Doktorantka nie obserwowała zmian ekspresji kinaz charakterystycznych dla patologicznego przerostu serca tj. fosforyzowanych form kinaz *Erk1/2*, kinaz domeny N-końcowej białka *c-Jun* i kinazy *p38*. Interesującym wynikiem jest również wykazanie znaczenia szlaku *Map2k4/Mkk4* w regulacji dojrzewania kardiomiocytów noworodkowych. Ważne jest spostrzeżenie, iż wyciszenie *Sphk1* aktywuje dojrzewanie kardiomiocytów niezależnie od obecności Ang II. Reasumując, Doktorantka wykazała, że wyciszenie ekspresji *Sphk 1* w mysich kardiomiocytach noworodkowych aktywuje ścieżki sygnalizacyjne charakterystyczne dla ostatecznego różnicowania kardiomiocytów.

Konkludując dyskusję publikacji Doktorantka podkreśla konieczność długoterminowych badań procesu dojrzewania kardiomiocytów w sercu noworodkowym w aspekcie prawidłowego funkcjonowania dorosłego miokardium, po drugie - ocenę szlaku *Sphk1/S1P* w dojrzewaniu kardiomiocytów z uwagi na potencjalne znaczenie tych badań w medycynie regeneracyjnej serca. Uważam też, iż rozszerzenie badań z zastosowaniem *targeting strategies*, potwierdzą aplikacyjną wartość sformułowanej przez Autorkę koncepcji, która finalnie zmierza w kierunku opracowania nowych terapii nadciśnienia i niewydolności serca w oparciu o ingerencję w szlak *Sphk 1/S1P*.

Ocena formalna rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Józefczuk jest napisana w postaci 46-stronicowego komentarza do zbioru 3 spójnych tematycznie prac, w tym jednej przeglądowej, opublikowanych w latach 2020-2021. Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich publikacji. Parametry bibliometryczne prac są bardzo wysokie (IF = 21,503; pkt. MNiSW = 380), co mocno wyróżnia recenzowaną pracę doktorską na tle innych rozpraw z dziedziny nauk medycznych. Swój twórczy wkład, rosnący wraz z kolejnymi publikacjami, Doktorantka definiuje jako: opracowanie koncepcji pracy przeglądowej i jej napisanie, opracowanie koncepcji badań w pracach oryginalnych i wykonanie znacznej części eksperymentów, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptów

oraz pozyskanie finansowania badań. Powyższe aktywności są dowodem samodzielności Doktorantki i umiejętności pracy naukowej na każdym jej etapie.

Komentarz do prac został napisany w układzie zbliżonym do klasycznej rozprawy doktorskiej. Rozprawę podzielono na rozdziały, rozpoczynając od jednostronicowego „Wprowadzenia”, w którym Doktorantka w ogólnym zarysie pisze o roli szlaku S1P w biologii komórki, translacyjnych odkryciach dotyczących roli S1P w układzie immunologicznym, podkreślając jednocześnie brak jednoznacznych danych o roli szlaku Sphk1/S1P w układzie sercowo-naczyniowym. Wskazuje też na konieczność badań nad ingerencjami farmakologicznymi w obrębie szlaku Sphk1/S1P w odniesieniu do schorzeń układu sercowo-naczyniowego. Kolejny rozdział to „Spis publikacji stanowiących rozprawę doktorską”. W rozdziale „Cele rozprawy doktorskiej”, Autorka przedstawia precyzyjnie, w postaci 3 punktów, plany badawcze. Trzy kolejne rozdziały pt. „Dyskusje publikacji nr 1, 2 i 3” są poświęcone omówieniu publikacji. Rozpoczynają się autorskim abstraktem graficznym sumującym uzyskane wyniki i są podzielone na podrozdziały: „Wstęp” – z trafnym uzasadnieniem podjęcia badań, „Metodologia” ze skrótowym opisem metod, dalej „Opis pracy” w przypadku pracy przeglądowej lub „Wyniki” w przypadku prac oryginalnych i w rozdziale „Wnioski” - wnioski oparte na uzyskanych w danej pracy wynikach. W kolejnym rozdziale „Wnioski z cyklu prac” znajdują się trzy trafne, nie wybiegające poza cele badań, wnioski końcowe. W rozdziale „Podsumowanie cyklu prac” Doktorantka skupia się nad znaczeniem otrzymanych wyników w badaniach nad poszukiwaniem skutecznej terapii serca i naczyń. Wskazuje na trudności związane ze złożonością efektów powstających w trakcie modulacji szlaku Sphk1/S1P. Po kolejnych rozdziałach: „Streszczenie w języku polskim”, „Streszczenie w języku angielskim”, „Wykaz skrótów” jest rozdział „Piśmiennictwo”, który zawiera 67 pozycji w większości najnowszych i starannie dobranych merytorycznie. Kolejne rozdziały to „Teksty publikacji” oraz „Oświadczenia współautorów”.

Rozprawa jest napisana i edytowana bardzo starannie.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Eweliny Józefczuk pt: *„Rola kinazy sfingozyny 1 w patofizjologii nadciśnienia tętniczego indukowanego angiotensyną II u myszy”*. Do mocnych stron rozprawy doktorskiej zaliczam: postawienie interesujących hipotez, dobrze zaprojektowane plany badawcze, imponującą metodologię badań, zarówno z racji na jej zakres jak i nowoczesność, wyniki badań w dużej mierze nowatorskie oraz potencjał translacyjny badań. Wyniki zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach i stanowią cenny wkład do światowego piśmiennictwa z zakresu wiedzy o znaczeniu szlaku Sphk1/S1P w regulacji funkcji fizjologicznych i w zmianach patologicznych w układzie sercowo-naczyniowym.

Wobec powyższego, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego *Collegium Medicum* w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Józefczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie - nauki medyczne i nauki o zdrowiu, dyscyplinie - nauki medyczne.

Podkreślając wysoki poziom naukowy rozprawy i duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. n. farm. Ewa Chabielska

Białystok, 6.10.2021r.