



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz
Katedra Biofizyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Macieja Mikulskiego pt.
„Terapeutyczne aspekty modulacji aktywności oksygenazy hemowej-1 w
nowotworach: rozwój metod badawczych do testów przesiewowych oraz
kompleksowa charakterystyka farmakologiczna nowych inhibitorów
małocząsteczkowych pod kątem możliwego zastosowania klinicznego”**

Oksygenaza hemowa-1 (OH-1), kluczowy enzym katabolizmu hemu, jest białkiem o wielu obliczach, pełniącym szereg różnych funkcji fizjologicznych. Poziom tego łatwo indukowalnego enzymu wzrasta w wielu typach nowotworów, wydaje się więc, że jakkolwiek OH-1 potrzebna jest także prawidłowym komórkom organizmu, zahamowanie jej aktywności winno być skuteczne w terapii nowotworów. Niskocząsteczkowe inhibitory wydają się być optymalnymi narzędziami obniżenia aktywności ze względów praktycznych. Winny one cechować się dużą specyficnością, by nie interferować z aktywnościami innych enzymów hemowych, w optymalnym przypadku także z aktywnością konstytutywnej oksygenazy hemowej-2.

W tym bardzo aktualnym i cennym nurcie badań ulokował swe zainteresowania i wysiłek badawczy mgr Maciej Mikulski. Celem Jego pracy podsumowanej w rozprawie doktorskiej była „kompleksowa analiza nowych małocząsteczkowych inhibitorów oksygenazy hemowej-1, mająca w założeniu doprowadzić do odkrycia związku o cechach kandydata przedklinicznego”.

Rozprawa doktorska mgr Macieja Mikulskiego ma klasyczny układ. Rozpoczyna ją zwięzły (26-stronicowy), kompetentnie napisany *Wstęp*, w którym Autor pracy przedstawia wprowadzenie do wczesnego etapu odkrywania leków, identyfikację i walidację celu molekularnego leku na przykładzie oksygenazy hemowej, terapeutyczne aspekty modulacji aktywności HO-1 oraz kaskadę doświadczalną dla walidacji związków aktywnych w badaniach przesiewowych.

Materiały i metody opisane są w mojej opinii prawidłowo i w należyтым stopniu szczegółowo. Schemat postępowania jest logiczny, a zakres przeprowadzonych badań – od badań *in silico* do doświadczeń *in vivo* – budzi moje uznanie. W pierwszym etapie badań, realizowanych w ramach projektu Hemoks, zastosowany został wirtualny wysokoprzepustowy test przesiewowy (vHTS) jako alternatywa dla doświadczalnych wysokoprzepustowych badań przesiewowych, co w moim przekonaniu jest optymalnym podejściem. Doktorant sprawdził następnie wpływ badanych związków na aktywność rekombinowanej ludzkiej HO-1 za pomocą opracowanego przez siebie testu, doświadczalnie stwierdził aktywność 197 związków wytypowanych drogą vHTS i potwierdził ją w teście ortogonalnym, ocenił selektywność najbardziej obiecujących spośród zbadanych związków badając ich działanie na HO-2 oraz badał ich wiązanie z ligandem za pomocą dwu metod biofizycznych – mikrotermoforezy kapilarnej i powierzchniowego rezonansu plazmonowego. Wybrane związki badał także pod kątem hamowania produkcji bilirubiny i cytotoksyczności wobec wybranej linii komórek nowotworu trzustki (PANC-1) w połączeniu z testem kombinacji dla najlepszego wybranego związku i standardowych chemoterapeutyków. Przeprowadził też badania podawania-dystrybucji-metabolizmu-wydalania (ADME) oraz wstępne badania farmakokinetyczne i toksykologiczne *in vivo* na modelu mysim.

Badania przesiewowe *in silico* wykonane zostały przez zespół chemii obliczeniowej firmy Selvita S.A. Doktorant nie podaje, czy brał udział w tym etapie pracy, czy też jedynie oparł się w pracy doświadczalnej na wynikach badań przesiewowych. Zakładając tę drugą ewentualność nie odnoszę się do tego aspektu rozprawy, chcę jednak wspomnieć, że w obliczeniach uwzględniono 4,87 mln dostępnych struktur związków niskocząsteczkowych; liczba ta jest w moim przekonaniu dobrym uzasadnieniem celowości zastosowania tego właśnie podejścia przed rozpoczęciem badań doświadczalnych.

Doktorant dysponował oczyszczonymi skróconymi formami HO-1 i HO-2, pozbawionymi domen C-końcowych i białkiem HO-1 oczyszczonym w kompleksie z heminą, otrzymanymi w ramach projektu Hemoks. Stabilność termiczną HO-1 w różnych buforach badał wykorzystując test wiązania SYPRO®sOrange. Hamowanie aktywności enzymu oznaczał na podstawie kolorymetrycznej reakcji uwalniania Fe^{2+} z heminy w układzie zawierającym HO-1, heminę, kwas askorbinowy i Ferrene-S, chelator Fe^{2+} używany do spektrofotometrycznych oznaczeń Fe^{2+} którego kompleks z Fe^{2+} cechuje się szczególnie wysoką wartością molowego współczynnika

absorpcji. Jak pokazuje następna część pracy (*Wyniki*), stosowany test jest wynikiem reoptymalizacji opisanego wcześniej testu wykorzystującego ferrozynę jako chelator Fe^{2+} . Kompleks Ferrene S z Fe^{2+} cechuje się wyższą wartością molowego współczynnika absorpcji niż kompleks ferrozyna- Fe^{2+} , jakkolwiek różnica nie jest zbyt duża (34 500 i 28 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Warunki oznaczenia zostały wyznaczone, jak podaje Doktorant, na podstawie danych literaturowych. Dziwne wydawać by się mogło wysokie stężenie enzymu w środowisku reakcji (2,5 μM), jednak wynika ono z małej aktywności molekularnej enzymu, czego przejawem było zachowanie liniowości reakcji przez 80 minut (do czasu pomiaru). Zastosowanie kwasu askorbinowego jako zastępczego donora elektronów służyło uproszczeniu układu doświadczalnego. Można zastanawiać się, czy nie mogło ono stanowić potencjalnego zagrożenia dla wiarygodności systemu, gdyż kwas askorbinowy plus jony żelaza tworzą układ Fentona generujący rodnik $\bullet\text{OH}$, który może uszkadzać i inaktywować enzym. Zagrożenie to wydaje się jednak być znikomo małe, ze względu na efektywne wiązanie uwolnionego Fe^{2+} przez chelator, małe stężenie Fe^{2+} i wysokie stężenie enzymu. Zaletą uproszczonego testu, nie zawierającego innych enzymów w układzie reakcyjnym, jest wykluczenie potencjalnych artefaktów związanych z hamowaniem przez testowane związki tych enzymów. Pozornie trywialne, lecz z praktycznego punktu widzenia bardzo istotne było użycie wysokiego stężenia DMSO w środowisku reakcji (2,5%), które zwiększając rozpuszczalność badanych związków zmniejszało niebezpieczeństwo artefaktów związanych z ich precypitacją, upraszczało przygotowanie próbek, a – jak wykazał Doktorant – nie hamowało aktywności HO-1.

Test potwierdzający prowadzony był „w bardzo zbliżonym układzie warunków eksperymentalnych”, jednak z zastosowaniem innego sprzętu dozującego. Nie wiem, czy zastosowanie mniej zbliżonych warunków doświadczalnych nie byłoby lepszym rozwiązaniem.

Test ortogonalny polegał na pomiarze absorbancji innego produktu reakcji – biliwerdyny i uważam wybór tego parametru za jak najbardziej trafny. Nie jest dla mnie jasne sformułowanie (s. 48): „kiedy reakcja enzymatyczna HO-1 osiąga stabilne plateau”. Czy jest to plateau szybkości reakcji czy też plateau stężenia produktów? Posłużenie się punktem czasowym odpowiadającym postlinearnemu przebiegowi reakcji jest jak najbardziej możliwe, stwarza ono nawet warunki dla bardziej wybiórczego wskazania silnych inhibitorów reakcji enzymatycznej, jednak prowadzi do niedokładnego wyznaczenia wartości stałych inhibicji.

Do badania powinowactwa białko-ligand Doktorant posłużył się dwoma biofizycznymi metodami: powierzchniowego rezonansu plazmonowego i mikrotermoforezy kapilarnej na białku znakowanym i nieznakowanym. Wybór tych metod uważam za trafny, jakkolwiek ich zastosowanie nastąpiło sporo trudności.

Ocena wybranych związków obejmowała także badania na poziomie komórkowym i na poziomie modelu zwierzęcego: detekcję wytwarzania bilirubiny w komórkach PANC-1, określenie wpływu inhibitorów HO-1 na żywotność i zdolność klonogenną tych komórek, badania hamowania ośmiu izoenzymów cytochromu P-450, ocenę stabilności metabolicznej wybranych związków w obecności mikrosomów z wątroby myszy, test przepuszczalności przez błony oraz badania farmakokinetyki i toksyczności *in vivo*.

Szeroko zakrojone badania zaowocowały wartościowymi wynikami. Zastosowanie pierwszorzędnego testu przesiewowego wyłoniło 29 związków cechujących się wartościami IC_{50} wobec HO-1 niższymi niż 10 μM spośród 197 kandydatów wyselekcjonowanych *in silico*. Najsilniejszym inhibitorem okazał się związek o symbolu SLV-8289, którego strukturę Doktorant podaje na Ryc. 4-2 (s. 69). Na bazie tego związku zaprojektowano dwa jeszcze lepsze inhibitory, których struktura nie została podana w pracy ze względu na ograniczenia wynikające z wymagań patentowych. Jest to zrozumiałe, mniej zrozumiałe jest jednak brak przedstawienia struktur związków wymienionych w Tab. 4-1, wskutek czego Czytelnik pracy może porównać podane parametry jedynie z numerami związków, co mogłoby satysfakcjonować numerologa, ale nie biochemika czy chemika zainteresowanego zależnością między strukturą a efektywnością inhibitorów enzymu (chyba że te struktury tych związków podlegają również ograniczeniom patentowym).

Ważnym z praktycznego punktu widzenia osiągnięciem metodycznym była częściowa automatyzacja testu hamowania aktywności HO-1 wykorzystująca stację pipetującą i dozownik MultiFlo FX, zachowująca zadowalające wartości kryteriów Z' i S/B. Doktorant wykazał także możliwość wdrożenia testu ortogonalnego opartego na pomiarze absorbancji biliwerdyny przy długości fali 670 do kaskady przesiewowej; zaletą tego podejścia był identyczny skład mieszaniny reakcyjnej umożliwiający dwa niezależne pomiary na tych samych płytkach wielodołkowych. Szkoda, że znaczące pochłanianie kompleksu Ferric S-Fe²⁺ przy długości fali 375 nm uniemożliwiło pomiar absorbancji bilirubiny przy tej długości fali, przy której pochłanianie ona silniej

niż w 670 nm, ale tak czy inaczej pochłanianie w zakresie mniejszych długości fal jest bardziej podatne na artefakty spowodowane pochłanianiem przez wiele związków, mogłoby więc być mniej bezpiecznym kryterium.

Interesujące były wyniki porównania specyficzności izoenzymowej inhibitorów HO-1. Nie do końca mogę zgodzić się z konkluzją Doktoranta, że „wszystkie rozwijane związki hamują w porównywalnym stopniu aktywność obu izoform ludzkiej oksygenazy hemowej”. Być może miał na myśli nowo syntetyzowane inhibitory, bo spośród związków pokazanych w Tab. 4-3 np. związek SLV-12813 wykazywał selektywność wyższą niż 40 względem HO-2. Znaczenie terapeutyczne specyficzności izoenzymowej inhibitorów wydaje się jednak wątpliwe, bowiem jak słusznie zauważa Doktorant, trudno jest jednoznacznie stwierdzić czy należy traktować HO-2 jako „równorzędny cel terapeutyczny” czy też przeciwnie. Biorąc pod uwagę tożsamość reakcji katalizowanej przez oba izoenzymy, pierwsza ewentualność wydaje się bardziej prawdopodobna, choć można wysuwać przeciwstawne argumenty.

Doktorant optymalizował też bardziej odpowiadający warunkom fizjologicznym test oparty na sprzężeniu wszystkich trzech enzymów zaangażowanych bezpośrednio w reakcję przekształcenia hemu do bilirubiny (reduktazy cytochromu P-450, HO-1 i reduktazy biliwerdyny), jednak ostatecznie zrezygnował z tego bardziej kosztownego i skomplikowanego testu, co z praktycznego punktu widzenia było, jak sądzę, słuszną decyzją.

Zastosowane metody biofizyczne określania powinowactwa badanych związków do HO-1 w zasadzie nie spełniły (z wyjątkiem metody MST ze znakowaniem) pokładanych w nich nadziei, zdaniem Autora rozprawy najprawdopodobniej wskutek niespecyficznych oddziaływań i agregacji białka. Mam wysokie uznanie dla Doktoranta za Jego krytycyzm wobec uzyskanych tymi metodami wyników.

Wybór linii PANC-1 do badań uważam za właściwy; z uznaniem odnoszę się do przeprowadzenia przez Doktoranta kontroli jakości tych komórek (co powinno być standardem w badaniach wykorzystujących linie komórkowe, ale nie zawsze jest). Analiza toksyczności związku SLV-11199 wykazała, że jest on dla tych komórek bardziej toksyczny niż tradycyjnie stosowany inhibitor aktywności HO, Sn-protoporfiryna IX. Doktorant nie obserwował znaczących różnic toksyczności związku SLV-11199 między warunkami normoksji i hipoksji, „pomimo iż dane literaturowe wskazują na ponad 4-krotny wzrost ekspresji HO-1 w linii PANC-1 w warunkach

stresu tlenowego”. Szkoda nieco, że Doktorant nie oznaczył poziomu HO-1 w użytych komórkach PANC-1 w obu warunkach.

Analiza farmakokinetyczna wykazała, że dwa badane nowo zsyntetyzowane związki wykazują akceptowalną biodostępność (7,2% w przypadku związku SLV-11199), a analiza toksyczności dowiodła, że w przypadku związku jest bezpieczny dla myszy w dawkach 50 i 100 mg/kg.

Interesujące są też dane dowodzące synergistycznego cytotoksycznego działania gemcytabiny i inhibitorów HO-1 w warunkach hipoksji (a więc odpowiadających warunkom *in vivo*).

Dojrzała, zwięzła (11-stronicowa Dyskusja), oprócz krytycznej analizy własnych wyników, przynosi również informacje o równolegle prowadzonych w Zakładzie Biotechnologii Medycznej UJ badaniach dotyczących związku inhibitorów SLV, zwłaszcza SLV-11199, ukazując badania Doktoranta w szerszym kontekście. Jest ona dobrym świadectwem kompetencji Doktoranta.

Mam niewiele uwag krytycznych dotyczących edycji rozprawy.

Moim zdaniem, *Lista skrótów anglojęzycznych* mogłaby być uzupełniona o kilka stosowanych w tekście, a nie ujętych w *Liście skrótów*, np. SnPP, FTS czy HTS.

Nieporozumienie może budzić zwrot (s. 38): „*Pojedyncze cząsteczki poddano następnie badaniom efektywności...*” Autor rozprawy ma oczywiście na myśli niektóre z badanych związków, ale w dobie rozwoju nowoczesnych metod umożliwiających dosłownie badania pojedynczych cząsteczek ten zwrot, wyrwany z kontekstu, może być mylnie zrozumiany.

Nie jestem zwolennikiem terminu „fluorescencja wewnętrzna” białka; sądzę, że termin „fluorescencja własna” jest bardziej odpowiedni.

Rycina 4-25B nie podaje wielkości pokazanej na osi rzędnych, podaje jedynie, że jest ona wyrażona w jednostkach względnych. Pozycji piśmiennictwa „Zihlif et al. 2017” cytowanej na s. 105 nie można znaleźć na liście odnośników literaturowych.

Na s. 113 została mylnie podana jednostka dawki „mg/ml”, winno być „mg/kg”. Z punktu widzenia fizyka właściwym terminem byłaby „masa ciała”, a nie „waga ciała”.

Ogólnie jednak - poza wspomnianymi i jeszcze kilkoma innymi drobnymi usterkami, jakie zauważyłem – edycja pracy jest bardzo dobra i zasługuje na uznanie.

Doktorant nie podaje informacji o publikacjach będących wynikiem realizacji przy doktorskiej, rozumiem jednak, że ograniczenia wynikające z wymogów patentowych mogą odsunąć w czasie opublikowanie przedstawianych wyników.

W podsumowaniu uważam, że rozprawa doktorska mgr Macieja Mikulskiego spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Macieja Mikulskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Sądzę też, że ze względu na wysoki poziom metodyczny i merytoryczny oraz nakład pracy Doktoranta, rozprawa zasługuje na wyróżnienie.



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz

Łódź, dnia 11 października 2018

