CeNT CENTRUM NOWYCH TECHNOLOGII

UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Banacha 2c, 02-092 Warszawa
TEL.: + 48 22 55 43 720, FAX: +48 22 55 40 801, E-MAIL: d.nowis@cent.uw.edu.pl
www.cent.uw.edu.pl

Oxford, 20 września 2018 r.

Szanowny Pan
prof. dr hab. Zbigniew Madeja
Dziekan Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
MGR. MACIEJA MIKULSKIEGO
ZATYTUŁOWANEJ: "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"

Prawie trzydziestoletnia już historia badań nad oksygenazą hemową-1 (HO-1), enzymem uczestniczącym w katabolizmie hemu, zaowocowała publikacją ponad 10 tysięcy artykułów naukowych i pozwoliła opisać rolę tego enzymu w rozwoju wielu chorób człowieka, w tym chorób nowotworowych, układu krążenia, płuc, układu krwiotwórczego, nerek i wielu innych narządów. Stąd też w pracach wielu autorów pojawia się postulat opracowania związków modulujących działanie oksygenazy hemowej-1, które w przyszłości mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób człowieka. Niestety, oksygenaza hemowa-1 nie jest łatwym celem nie tylko dla zaprojektowania, ale także dla weryfikacji działania jej skutecznych i selektywnych inhibitorów. W swoich badaniach Pan mgr Maciej Mikulski podjął się zatem trudnego zadania opracowania i zweryfikowania poprawności zaproponowanej przez Niego metodyki walidacji związków

Banacha 2c, 02-092 Warszawa
TEL.: + 48 22 55 43 720, FAX: +48 22 55 40 801, E-MAIL: d.nowis@cent.uw.edu.pl
www.cent.uw.edu.pl

zsyntetyzowanych przez firmę Selvita, jako potencjalnych inhibitorów oksygenazy hemowej-1.

Rozprawa ma klasyczny układ i została dość starannie przygotowana pod względem edytorskim. Wstęp jest złożony z kilku niezależnych podrozdziałów. W pierwszym z nich syntetycznie omówiono etapy opracowywania nowych związków o potencjale terapeutycznym (tutaj, polemizując z Doktorantem, nie odważyłabym się na używanie w tym kontekście terminu „leki"). Dalej Doktorant przedstawia podstawowe dane dotyczące oksygenazy hemowej-1 w dość ciekawym ujęciu – w oparciu o prace prowadzące do walidacji tego enzymu jako celu terapeutycznego w chorobach nowotworowych. Następnie uzasadnia wybór modelu biologicznego (ustalona linia komórkowa ludzkiego gruczolakoraka trzustki) podając podstawowe informacje na temat roli oksygenazy hemowej-1 w rozwoju nowotworów tego narządu, a także przybliża koncepcję wykorzystania zahamowania aktywności enzymatycznej oksygenazy hemowej-1 w jakże popularnej w ostatnich latach strategii terapeutycznej bazującej na zależności komórki od dostępności jednego enzymu przy występowaniu mutacji prowadzącej do utraty funkcji drugiego (z języka angielskiego „synthetic lethality", którego to terminu nie należy dosłownie tłumaczyć, jak czyni to Doktorant, jako niefortunną w języku polskim „syntetyczną letalność"). W ostatniej części wstępu opisano istniejące strategie hamowania działania oksygenazy hemowej-1, w tym wyciszenie ekspresji kodującego ją genu z wykorzystaniem techniki małego interferującego RNA oraz działanie dostępnych komercyjne inhibitorów, a także strategie umożliwiające udoskonalenie i walidację istniejących i projektowanych inhibitorów. Na podkreślenie zasługuje ze wszech miar uzasadnione krytyczne podejście Doktoranta do skuteczności, selektywności i możliwości klinicznego zastosowania tych metod. Cel pracy został określony jasno, a wykonane doświadczenia i uzyskane wyniki umożliwiły jego realizację. Metodyka została opisana kompetentnie i bardzo dokładanie, a poświęcona jej cześć stanowi znaczący objętościowo fragment ocenianej rozprawy. Przygotowane na potrzeby tego rozdziału ryciny i schematy ułatwiają dokładne zrozumienie zastosowanych metod. Wyniki

Banacha 2c, 02-092 Warszawa
TEL.: + 48 22 55 43 720, FAX: +48 22 55 40 801, E-MAIL: d.nowis@cent.uw.edu.pl
www.cent.uw.edu.pl

przedstawione zostały klarownie, w etapach uzasadnionych logiczną kolejnością wykonywanych badań, a ilustrujące je ryciny przygotowano starannie i poprawnie zacytowano w tekście. Dodatkowo, każdy z wyników został opatrzony podsumowaniem oraz wstępną interpretacją. Uwagi do tej części rozprawy pozwoliłam sobie wypunktować poniżej. Dyskusja wyników jest wyczerpująca i merytoryczna, co potwierdza dobre przygotowanie merytoryczne Doktoranta. W podsumowaniu wymieniono wykorzystane w pracy metody oceny zahamowania aktywności oksygenazy hemowej oraz zbadania biologicznego znaczenia tej inihibicji, a także wypunktowano etapy weryfikacji działania związku SLV-11199 jako inhibitora HO-1 z zaznaczeniem, która z metod została wykorzystana do tego celu po raz pierwszy lub w tym celu zoptymalizowana. Ciekawym uzupełnieniem pracy jest lista programów komputerowych oraz źródeł internetowych wykorzystanych do przygotowania rozprawy. Piśmiennictwo obejmuje 197 pozycji, zdecydowana większość przytaczanych artykułów została opublikowana w ciągu ostatnich 10 lat w recenzowanych, anglojęzycznych czasopismach. Odniesienia do światowej literatury zostały przygotowane prawidłowo i wspierają treść rozprawy. Cieszą odwołania do jakże bogatej bibliografii na temat oksygenazy hemowej-1 zespołu, do którego należy Promotor rozprawy.

Część doświadczalna ocenianej rozprawy obejmuje głównie serię badań walidujących związek o kryptonimie SLV-11199 jako inhibitor oksygenazy hemowej-1 i -2 o potencjale klinicznym. Uzasadnienie weryfikacji badanego związku jako inhibitora obu izoform oksygenazy hemowej (niewielką liczbę danych dotyczących HO-2, nakładające się funkcje obu izoform, a także brak dowodów na to, że związek o potencjale klinicznym powinien być selektywnych inhibitorem HO-1) uznaję za poprawne, choć uważam je za nieco zbyt lakoniczne dla podjęcia tak ważkiej decyzji. Na wstępie Doktorant przedstawia założenia, które pozwoliły na wybranie z biblioteki ok. 5 milionów związków chemicznych związku SLV-8289 i jego dalszą modyfikację w celu uzyskania struktur o bardziej pożądanych parametrach farmakodynamicznych, które można objąć ochroną patentową. Następnie, z użyciem znanych inhibitorów HO-1 (QC-308 i klemizolu) zoptymalizował

Banacha 2c, 02-092 Warszawa
TEL.: + 48 22 55 43 720, FAX: +48 22 55 40 801, E-MAIL: d.nowis@cent.uw.edu.pl
www.cent.uw.edu.pl

warunki, dla których stabilność rekombinowanej oksygenazy hemowej-1 oraz oksygenazy hemowej-2 jest największa, a środowisko i stężenia składowych najbardziej sprzyjające późniejszym zautomatyzowanym testom enzymatycznym z wykorzystaniem jako substratu heminy w obecności kwasu askorbinowego i Ferrene-S. Jest to bardzo dobrze przygotowana część rozprawy, drobiazgowo opisana i zinterpretowana, wskazująca na doskonałe przygotowanie merytoryczne Doktoranta. Jako bardzo wartościową oceniam część pracy dotyczącą nieudanej, niestety, optymalizacji testu biochemicznego, w którym w naczyniu reakcyjnym znajdują się wszystkie trzy enzymy uczestniczące w katabolizmie hemu (oksygenaza hemowa, reduktaza biliwerdyny oraz reduktaza cytochromu P450). Uważam, że takie kompleksowe podejście do walidacji potencjalnych inhibitorów enzymu nie działającego w próżni, lecz w niezwykle skomplikowanej sieci wielu białek, jest ciekawym przełamaniem utartych schematów. W kolejnych podrozdziałach Doktorant przedstawia wyniki testów biofizycznych (jak powierzchniowy rezonans plazmonowy, mikrotermoforeza kapilarna bez znakowania i ze znakowaniem) oceniających powinowactwo badanych związków do oksygenazy hemowej-1. Nie mam do tej części rozprawy większych uwag. Nie ukrywam, że moje największe zainteresowanie wzbudziła najbliższa mi merytorycznie część pracy dotycząca oceny działania związku SLV-11199 w testach komórkowych. Doktorant wybrał jako podstawowy model ustaloną linię komórkową ludzkiego gruczolakoraka trzustki (PANC-1) oraz dwie linie referencyjne (linię raka gruczołu krokowego DU-145 wyprowadzoną z ogniska przerzutowego tego nowotworu do mózgu oraz linię raka płuc – A549). Dla porządku muszę podkreślić, że termin „rak prostaty" nie jest prawidłowy. Prostata to w języku łacińskim rzeczownik w liczbie pojedynczej i osobie żeńskiej oznaczający gruczoł krokowy, a więc poprawnym wyrażeniem jest rak prostatae lub, preferowany, rak gruczołu krokowego. Doktorant w tej części pracy nie ustrzegł się licznych błędów językowych (pozwalam sobie wymienić tylko przykładowe: „poziom HO-1 jest podniesiony w wielu typach nowotworów" s. 100, „terapia onkologiczna" s. 100, „(linia komórkowa) posiada" s. 100 czy „nie powodować niespecyficznych efektów na białkach

Banacha 2c, 02-092 Warszawa
TEL.: + 48 22 55 43 720, FAX: +48 22 55 40 801, E-MAIL: d.nowis@cent.uw.edu.pl
www.cent.uw.edu.pl

rekombinowanych" s.117). Na podkreślenie zasługuje to, że Doktorant przed rozpoczęciem badań biologicznych dokonał weryfikacji genetycznej linii komórkowej PANC-1oraz wykluczył jej zakażenie mykoplazmą. Jest to praktyka ze wszech miar wskazana, a nawet niezbędna, choć rzadko, niestety, w badaniach biomedycznych egzekwowana. Przedstawione w tej części wyniki obejmują ocenę ilości mRNA dla HO-1 oraz HO-2 w reakcji PCR w czasie rzeczywistym, testy klonogenne oraz ocenę przeżywalności komórek PANC-1 inkubowanych w warunkach normoksji lub hipoksji z badanymi związkami, chemioterapeutykami stosowanymi w leczeniu chorych na raka trzustki (docetaksel i gemcytabina), lub ich kombinacją z analizą rodzaju obserwowanych interakcji (antagonizm, addycja czy synergizm). Szkoda, że ta część badań nie została poszerzona o ocenę działania badanego związku (SLV-11199) w komórkach PANC-1 pozbawionych ekspresji albo HO-1 albo HO-2 lub obu tych enzymów jednocześnie. Wyniki takich doświadczeń dostarczyłyby nowych, ważnych danych na temat tego, czy dla uzyskania działania cytostatyczno-cytotoksycznego *in vitro* konieczne jest zahamowanie obu izoform oksygenazy hemowej czy tylko jednej z nich. Ponadto, zabrakło mi w pracy wyjaśnienia czy związek SLV-11199 wywiera na komórki linii PANC-1 działanie cytostatyczne czy cytotoksyczne? Czy ten mechanizm ulega zmianie w sytuacji, gdy komórki PANC-1 są inkubowane ze związkiem SLV-11199 w połączeniu z chemioterapeutykami przeciwnowotworowymi?

Dalej Doktorant przedstawia wyniki analizy ADME (z ang. ocena wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania badanego związku) dla SLV-11199 oraz testów farmakokinetycznych i toksykologicznych. Obserwowane zwiększenie odsetka granulocytów we krwi myszy otrzymujących związek SLV-11199 w najwyższej badanej dawce (150 mg/kg podskórnie) nie wydaje się być istotna biologicznie. Pojawia się pytanie, czy zmianie ulegała też bezwzględna liczba poszczególnych populacji leukocytów? Takie dane miałyby większe znaczenie biologiczne. Zdecydowanie w pracy zabrakło mi najważniejszego wyniku dla dalszych losów związku SLV-11199 jako potencjalnego kandydata klinicznego, a mianowicie oceny jego działania

CeNT CENTRUM NOWYCH TECHNOLOGII

UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Banacha 2c, 02-092 Warszawa
TEL.: + 48 22 55 43 720, FAX: +48 22 55 40 801, E-MAIL: d.nowis@cent.uw.edu.pl
www.cent.uw.edu.pl

przeciwnowotworowego w modelu mysim (zarówno w syngenicznym, na przykład po inokulacji komórek linii Panc02 myszom szczepu C57BL/6, jak i w ksenogenicznym – po inokulacji myszom z ciężkim złożonym niedoborem odporności komórek linii PANC-1).

Ze względu na specyfikę badań nad nowymi związkami o potencjale terapeutycznym i istniejącą ochronę patentową wyniki przedstawione w przesłanej mi do recenzji rozprawy nie mogły zostać, i zapewne nie zostaną, opublikowane w formie oryginalnego artykułu.

W swojej pracy Doktorant kompleksowo i (prawie) kompletnie opracował i zweryfikował ciąg metod oceniających potencjał badanych związków chemicznych jako inhibitorów oksygenazy hemowej w modelach przedklinicznych. W podsumowaniu chciałabym podkreślić, że przedłożoną mi do recenzji rozprawę oceniam pozytywnie, a powyższe uwagi są jedynie przyczynkiem do dyskusji z Doktorantem.

Oceniana przeze mnie rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz. 595 z późn.zm.). W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady o dopuszczenie mgr. Macieja Mikulskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dominika Nowis

Prof. dr hab. n. med. Dominika Nowis
Kierownik Laboratorium Medycyny Doświadczalnej
CeNT UW