

## Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Pawła Mozolewskiego

### „Molekularne mechanizmy działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz flavonoidów w aspekcie ich potencjalnego zastosowania w leczeniu lizosomalnych chorób spichrzeniowych”

Praca doktorska mgr. Pawła Mozolewskiego ma formę zwartego opracowania, będącego zbiorem składającym się z czterech spójnych tematycznie artykułów opublikowanych w recenzowanych, renomowanych czasopismach. Opracowanie zawiera także obszernie, wielostronicowe i dostatecznie szczegółowe streszczenia w języku angielskim i polskim, kopie publikacji oraz, ze względu na to, że wszystkie prace są wieloautorskie, oświadczenia Doktoranta i współautorów o ich wkładzie w powstanie każdej publikacji. Dwie z załączonych publikacji, a mianowicie: [Moskot i wsp., (2014). *J Biol Chem.*, 289, 17054-17069; praca oznaczona w rozprawie jako Nr 1], oraz [Moskot i wsp., (2015), *Sci. Rep.*, 5:9378; praca oznaczona w rozprawie jako Nr 2] były przed kilku laty włączone do pracy doktorskiej mgr Marty Moskot. W wymienionych pracach udział mgr Pawła Mozolewskiego był, według Jego deklaracji, raczej niewielki i ograniczał się do wykonania części doświadczeń wymagających zastosowania ilościowej reakcji RT-PCR, oraz oznaczania kinetyki biosyntezy glikozaminoglikanów.

Włączanie publikacji wieloautorskich do kilku rozpraw doktorskich jest dopuszczalne, a w przypadku rozprawy doktorskiej mgr. Pawła Mozolewskiego celem tego zabiegu było, jak sądzę, podkreślenie wieloletniego uczestniczenia w pracach badawczych, których celem jest opracowanie strategii farmakologicznego łagodzenia objawów lizosomalnych chorób spichrzeniowych oraz podkreślenie umiejętności warsztatowych. Wymienione powyżej prace traktuję również jako wprowadzające czytelnika w problematykę badawczą zespołu, oraz ukazujące dotychczasowe osiągnięcia inspirujące do podjęcia badań opisanych w tych publikacjach włączonych do rozprawy doktorskiej, w których mgr Paweł Mozolewski był pierwszym autorem: [Praca oznaczona w rozprawie Nr 3: **Mozolewski P**, Moskot M, Jakóbkiewicz-Banecka J, Węgrzyn G, Bocheńska K, Banecki B, Gabig-Cimińska M, (2017). *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs modulate cellular glycosaminoglycan synthesis by affecting EGFR and PI3K signaling pathways. Sci. Rep.*, 7:43154. [IF = 4.259]], oraz [Praca oznaczona w rozprawie Nr 4: **Mozolewski P**, Jakóbkiewicz-Banecka J, Węgrzyn G, Banecki B, Gabig-Cimińska M (2018). *Non-steroidal anti-inflammatory drugs are safe with respect to the transcriptome of human dermal fibroblasts. Eur J Pharmacol.*, 818:206-210. [IF = 2.896]]. Na tak rozumianą przeze mnie koncepcję struktury rozprawy wskazuje to, że w części zatytułowanej „Streszczenie” Doktorant opisuje głównie wyniki zawarte w pracach Nr 3 i Nr 4, natomiast odniesienia do prac Nr 1 i Nr 2 umożliwiają porównanie wyników otrzymanych w ramach pracy doktorskiej z wynikami wcześniejszymi.

Jak wynika ze zgodnych oświadczeń współautorów udział Doktoranta w wykonaniu badań i przygotowaniu wymienionych powyżej publikacji Nr 3 i Nr 4 (Mozolewski i wsp.,



(2017) oraz Mozolewski i wsp. (2018)) był wiodący i polegał na współprojektowaniu badań, przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń, analizie statystycznej uzyskanych rezultatów, interpretacji wyników, współuczestnictwie w analizie ontologicznej, wykonaniu rycin i tabel, udział przy pisaniu manuskryptu, oraz udziale w poprawie prac po recenzjach. Należy podkreślić, że tematyka badań jest zgodna z tytułem rozprawy doktorskiej.

Ogólny cel badań mgr. Pawła Mozolewskiego, to uzyskanie jak najpełniejszej wiedzy o możliwości obniżania syntezy glikozaminoglikanów (ang. *substrat reduction therapy*) u chorych na mukopolisacharydozy. Wykrycie przez zespół kierowany przez prof. Grzegorza Węgrzyna, że związkiem wywołującym taki efekt jest genisteina stworzył nadzieję na opracowanie metody terapeutycznej niektórych lizosomalnych chorób spichrzeniowych. Szczególnie istotnym aspektem możliwych terapeutycznych zastosowań genisteiny jest jej właściwość hamowania ścieżki sygnałowej zależnej od naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), oraz zdolność przenikania bariery krew-mózg, co potencjalnie umożliwiłoby łagodzenie objawów neurologicznych występujących w wielu podtypach mukopolisacharydoz.

Na pewnym etapie badań okazało się celowe poszukiwanie innych niż genisteina związków, które mogłyby wykazywać silniejszy efekt obniżania poziomu glikozaminoglikanów samodzielnie, lub w połączeniu z genisteiną. Doskonale rozeznanie w dziedzinie badań skierowało uwagę Doktoranta i zespołu na niesteroidowe leki przeciwzapalne. Do dalszych badań wybrano indometacynę i nimesulid kierując się opublikowanymi wcześniej wynikami badań, które wskazywały, że te związki mogą, podobnie jak genisteina, hamować fosforylację receptora naskórkowego czynnika wzrostu. Jednocześnie zakładano, że przy dłuższym stosowaniu, a taką strategię terapeutyczną należy brać pod uwagę w przypadku mukopolisacharydoz, nie powinny również wywoływać nieakceptowalnych reakcji ubocznych.

Zatem pierwszym zadaniem Doktoranta było zbadanie jak dalece toksyczna dla komórek jest inkubacja z badanymi związkami stosowanymi w stężeniach określanych jako osiągalne w surowicy w czasie stosowania leków w celach terapeutycznych. Podstawowym modelem komórkowym były prawidłowe fibroblasty dermalne, jednak jeśli to było pożądane, badania prowadzono także na fibroblastach pochodzących od chorych na mukopolisacharydozę. Doktorant wykazał, że badane związki wykazują nieznaczną toksyczność i nieistotne hamowanie proliferacji, jeżeli użyto je samodzielnie, natomiast obserwowalny efekt antyproliferacyjny zauważono jedynie, jeśli leki stosowano w połączeniu z genisteiną. Badania wpływu poszczególnych związków i ich kombinacji w wybranych stężeniach na syntezę glikozyloaminoglikanów wykazały, że najsilniejszy efekt hamowania zachodził w przypadku stosowania mieszaniny genisteiny z nimesulidem i był silniej wyrażony, niż w przypadku zastosowania samej genisteiny. Istotne jest także to, że obniżanie syntezy GAG zachodziło zarówno w fibroblastach kontrolnych, jak i pobranych od chorych na mukopolisacharydozę. Dalszym etapem badań było wyjaśnianie czy i w jakim stopniu w badanych komórkach skojarzone działanie genisteiny z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi będzie zmniejszało fosforylację EGFR. Doktorant wykazał, że najsilniej fosforylację receptora EGF hamuje nimesulid i efekt ten jest silniejszy niż wywołany przez inne związki stosowane oddzielnie lub w połączeniu. Hamowanie fosforylacji EGFR prowadzi, jak wykazał Doktorant do hamowania ścieżki sygnałowej PI3K.

Analiza transkryptomyczna z zastosowaniem mikromacierzy DNA pozwalających ocenić poziom transkrypcji ponad 25000 genów wykazała, że zmiany globalnej ekspresji genów pod wpływem badanych niesteroidowych leków przeciwzapalnych raczej nie były zbyt znaczne. Użycie nimesulidu z genisteiną także nie wydaje się w sposób znaczący modulować poziom ekspresji genów związanych z metabolizmem glikozamimoglikanów. Ponieważ, jak wykazał Doktorant, traktowanie fibroblastów zarówno kontrolnych, jak i pochodzących od chorych na mukopolisacharydozę, nie wpływa również na przebieg cyklu komórkowego otrzymane wyniki wskazują łącznie, że stosowanie niektórych z tych związków w leczeniu mukopolisacharydoz nie powinno pociągać za sobą niepożądanych efektów ubocznych. Bardzo interesującym wynikiem jest wykazanie, że w przeciwieństwie do genisteiny badane leki przeciwzapalne nie zmieniały poziomu ekspresji genów kodujących EGFR, mTOR oraz TFEB (kluczowego czynnika transkrypcji kontrolującego aktywność genów związanych z biogenezą lizosomu). Tym samym, najprawdopodobniej wpływ na zmiany metabolizmu glikozyloaminoglikanów przez izoflawonoidy i niesteroidowe leki przeciwzapalne jest wielokierunkowy i obejmuje zarówno wspólne, jak i odmienne mechanizmy. Mimo to, że zmiany ekspresji genów związanych z rozwojem chorób lizosomalnych wykrywane metodą mikromacierzy DNA były stosunkowo subtelne, to zastosowanie ilościowej reakcji RT-PCR w odniesieniu do kilkunastu wybranych genów tej grupy pozwoliło Doktorantowi wykazać, że część z nich pod wpływem skojarzonego działania genisteiny i nimesulidu wykazuje zmiany ekspresji większe niż pod wpływem samej genisteiny.

Wyniki badań Doktoranta oceniam bardzo wysoko. Zostały one opublikowane w recenzowanych, uznanych czasopismach. Przeczytałem prace z zainteresowaniem i uważam, że cel badań, elementy metodyki i wyniki badań zostały przejrzyście przedstawione w rozdziale „Streszczenie” rozprawy doktorskiej. Można jednak zauważyć, że o ile w załączonych publikacjach wyniki badań są bardzo obszernie dyskutowane, to w streszczeniu rozprawy doktorskiej elementy dyskusji są raczej skąpe. Uważam także, że podsumowanie badań zawarte w rozdziale „Streszczenie” powinno kończyć się zamieszczeniem wyodrębnionych wniosków. Nie mając innych uwag chciałbym jedynie prosić Doktoranta o kilka wyjaśnień.

1. W lizosomalnych chorobach spichrzeniowych zmiany patologiczne dotyczą komórek wieku rodzajów. Czy można oszacować w jakim stopniu wnioski formułowane na podstawie badań prowadzonych na fibroblastach dermalnych mogą odnosić się do innych komórek?
2. Skoro globalne zmiany aktywności transkryptomu badanych komórek nie są zbyt znaczące, a jednocześnie efektywnie hamowane są niektóre ścieżki przekazu sygnału, to czy nie można sądzić, że część efektów spowodowanych jest jakimiś zmianami epigenetycznymi?
3. Czy dane mikromacierzowe będące przedmiotem analiz zamieszczonych w pracach [3] i [4] pochodzą z tego samego doświadczenia? Jeśli nie, to czy istniały jakieś istotne różnice pomiędzy odrębnymi doświadczeniami ?



## Podsumowanie oceny.

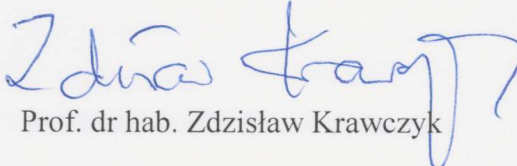
W podsumowaniu oceny chciałbym podkreślić, że wyniki badań mgr. Pawła Mozolewskiego przedstawione w rozprawie doktorskiej, będąc kontynuacją wieloletnich prac zespołu nad poszukiwaniem skutecznego leczenia lizosomalnych chorób spichrzeniowych przynoszą szereg istotnych i oryginalnych obserwacji kierujących dalsze badania na poszukiwania wielolekowej, skojarzonej terapii. Na obecnym etapie badań elementem wymienionej strategii byłoby użycie genisteiny (lub innego izoflawonoidu) razem z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (głównie nimesulidu). Za taką kombinacją związków przemawiają następujące, najważniejsze wyniki przedstawione przez Doktoranta:

1. Wykazanie, że stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych w niskich stężeniach ogranicza fosforylację EGFR, oraz hamuje przekaz sygnału ścieżką zależną od PI3K, przy jednoczesnym niewielkim wpływie na globalną aktywność transkryptomu.
2. Wykazanie pozytywnego z punktu widzenia możliwych zastosowań terapeutycznych wpływu nimesulidu, zwłaszcza w kombinacji z genisteiną na efektywne obniżanie poziomu glikozamioglikanów i modulowanie aktywności genów związanych z patogenezą lizosomalnych chorób spichrzeniowych.
3. Uzyskanie przesłanek pozwalających przewidywać, że użycie niesteroidowych leków przeciwzapalnych do łagodzenia objawów mukopolisacharydoz, w szczególności ich form neuropatycznych, nie powinno wywoływać niepożądanych objawów ubocznych.

Praca doktorska została wykonana z zastosowaniem nowoczesnych metod, a otrzymane wyniki mają nie tylko walor nowości naukowej, ale tworzą przesłanki do opracowywania dalszych projektów ukierunkowanych na zastosowania praktyczne. Doktorant zdaje sobie sprawę, co podkreśla w końcowej części streszczenia pracy doktorskiej, że jednym z najważniejszych przyszłych zadań będzie przełożenie wyników badań *in vitro* do zastosowań klinicznych i optymalizacja warunków stosowania skojarzonej terapii genisteiną w skojarzeniu z lekami przeciwzapalnymi. Wyniki pracy doktorskiej ukazują także konieczność prowadzenia poszerzonych badań podstawowych, bowiem jak wykazał Doktorant nimesulid moduluje w badanych komórkach aktywność znacznej puli genów o niepoznanej jeszcze funkcji.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr. Pawła Mozolewskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i całkowicie spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ustawy o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 (Dz.U. nr 65. Poz 595) wraz z późniejszymi zmianami. Wnioskuje zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr. Pawła Mozolewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gliwice, 17 kwietnia 2018

  
Prof. dr hab. Zdzisław Krawczyk