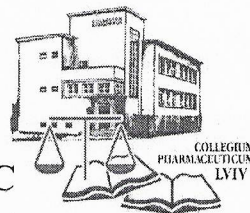




DANYLO HALATSKY LVIV NATIONAL
MEDICAL UNIVERSITY

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL, ORGANIC
AND BIOORGANIC CHEMISTRY



Pekarska str. 69
79010 Lviv UKRAINE

tel. +38(0322)755966
E-mail: dr_r_lesyk@org.lviv.net

Lwów, 28.12.2021

OPINIA

dotycząca rozprawy doktorskiej mgr farm. Wojciecha Szymanowskiego pt. „Mucyna 1 jako cel molekularny nowej pochodnej diizochinoliny w skojarzeniu z przeciwciałem anti-MUC1 w komórkach raka piersi MCF-7 i raka żołądka AGS”.

Rozprawa mg. Wojciecha Szymanowskiego „Mucyna 1 jako cel molekularny nowej pochodnej diizochinoliny w skojarzeniu z przeciwciałem anti-MUC1 w komórkach raka piersi MCF-7 i raka żołądka AGS” poświęcona jest aktualnemu problemowi współczesnej nauki farmaceutycznej – systematycznym badaniom skojarzonego działania przeciwciała monoklonalnego i wysoce aktywnej cząsteczki przeciwnowotworowej. Dobór obiektów badań jest udany i zasadny, gdyż diizochinoliny i ich funkcjonalne pochodne charakteryzują się zróżnicowaną aktywnością farmakologiczną, niską toksycznością w stosunku do komórek prawidłowych i syntetyczną dostępnością. Zastosowanie przeciwciała monoklonalnego w połączeniu z chemioterapeutykiem w terapii przeciwnowotworowej to nowoczesny trend w poszukiwaniu oryginalnych leków. Biorąc pod uwagę powyższe, recenzowana rozprawa wpisuje się w aktualny i nowoczesny kierunek badań jakim jest terapia spersonalizowana ukierunkowana na wybrany cel molekularny.

Mgr Wojciech Szymanowski w swojej pracy doktorskiej ocenił aktywność biologiczną nowej pochodnej oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny (OM-86II) w monoterapii oraz w skojarzeniu z przeciwciałem anti-MUC1 w komórkach raka piersi MCF-7 i raka żołądka AGS. Jedną ze strategii wykorzystywanych w terapii ukierunkowanej na konkretne cele molekularne jest zastosowanie przeciwciał monoklonalnych z chemioterapeutykami, co prowadzi do zwiększenia ich właściwości przeciwnowotworowych. Obiecującym i atrakcyjnym celem molekularnym jest mucyna 1, której zwiększoną ekspresję wykazano w wielu typach nowotworów. Ponadto, MUC1 może także przyczyniać się do aktywacji ścieżek sygnałowych odpowiedzialnych za progresję nowotworu, jak również wchodzić w interakcje z wieloma czynnikami transkrypcyjnymi.

W pierwszym etapie badań Doktorant ocenił cytotoksyczność oraz właściwości antyproliferacyjne nowej pochodnej diizochinoliny (zw. OM-86II), jak i leku referencyjnego -etopozynu w monoterapii, jak i

w skojarzeniu z przeciwciałem anti-MUC1. Inkubacja komórek raka piersi MCF-7 oraz raka żołądka AGS z etopozydem, związkiem OM-86II oraz przeciwciałem anti-MUC1 prowadzi do zahamowania biosyntezy DNA w obu liniach komórek nowotworowych. Najsilniejsze właściwości cytotoksyczne oraz antyproliferacyjne wykazywał związek OM-86II zastosowany wraz z przeciwciałem anti-MUC1.

Wysoki potencjał cytotoksyczny i silne właściwości antyproliferacyjne nowej pochodnej diizochinoliny (OM-86II) stosowanej w skojarzeniu z przeciwciałem anti-MUC1 w badanych liniach komórkowych mogą być wynikiem aktywacji programowanej śmierci komórek. Ważną strategią walki z nowotworami stało się wykorzystanie fizjologicznego mechanizmu śmierci komórkowej - apoptozy, jako celu molekularnego w nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej. Na podstawie analizy cytometrycznej Doktorant wykazał, że związek OM-86II, jak również etopozyd, w skojarzeniu z przeciwciałem anti-MUC1 prowadzą do większego nasilenia apoptozy w komórkach nowotworowych w porównaniu do monoterapii tymi związkami.

Kluczową rolę w procesie indukcji apoptozy na drodze szlaku wewnętrznego odgrywają mitochondria, stanowiące główny punkt kontrolny tego procesu. Parametrem, który wskazuje na zmiany w ich funkcjonowaniu jest obniżenie błonowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$). Prowadzi to do uwolnienia cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy i aktywacji kaskady kaspaz. Związek OM-86II w skojarzeniu z przeciwciałem anti-MUC1 obniża potencjał mitochondrialny, jednakże efekt ten był znacznie silniejszy w komórkach raka żołądka AGS niż w przypadku komórek raka piersi MCF-7.

Ważną rolę w regulacji wewnętrznego szlaku apoptozy odgrywa rodzina białek BCL-2, w której wyróżnia się białka pro- i antyapoptotyczne. Związek OM-86II zarówno w monoterapii, jak i w skojarzeniu z przeciwciałem anti-MUC1 powoduje wzrost stężenia proapoptotycznego białka Bax w komórkach raka piersi MCF-7 oraz raka żołądka AGS. Proapoptotyczne białko Bax aktywowane jest przez białko p53, które zwane jest „strażnikiem genomu”. Białko p53 funkcjonuje jako czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za regulację genów zaangażowanych w naprawę DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego oraz apoptozę. Komórki prawidłowe charakteryzują się niską ekspresją białka p53 ze względu na jego krótki okres półtrwania (6-20 min.), za który odpowiada E3 ligaza ubikwityny – MDM2. W komórkach nowotworowych dochodzi z kolei do częstej inaktywacji białka p53 na drodze dwóch głównych mechanizmów: punktowych mutacji w genie *TP53*, co prowadzi do powstania nieaktywnego białka p53 lub też w wyniku zaburzenia regulacji p53 przez MDM2. W wyniku utraty funkcjonalności p53, uszkodzone komórki mogą się namnażać i w ten sposób przenosić mutacje na kolejne pokolenia. Doktorant zbadał wpływ związku OM-86II w monoterapii, jak również w skojarzeniu z przeciwciałem anti-MUC1 na ekspresję białka p53 w badanych liniach komórkowych. W toku przeprowadzonych badań Doktorant wykazał, zwiększenie ekspresji białka p53 zarówno w monoterapii, jak i w skojarzeniu OM 86 II z przeciwciałem anti-MUC1.

Kluczową rolę w transformacji nowotworowej guzów i ich późniejszym wzroście, proliferacji i przerzutowaniu odgrywa szlak kinazy 3-fosfatydylinozytolu – PI3K/AKT/mTOR. Reguluje on

metabolizm, wzrost i przeżycie komórek nowotworowych. Mgr Wojciech Szymanowski zbadał wpływ nowej pochodnej diizochinoliny (OM-86II) wraz z przeciwciałem anti-MUC1 na stężenie kinazy mTOR w komórkach raka piersi MCF-7 oraz raka żołądka AGS. Doktorant wykazał, że inkubacja komórek MCF-7 oraz AGS ze związkiem OM-86II zastosowanym wraz z przeciwciałem anti-MUC1 prowadzi do spadku stężenia mTOR. Mucyna 1 może aktywować szlak sygnałowy Src-CrkL-Rac1/Cdc42 po przyłączeniu się do międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej sICAM-1. Aktywowany w ten sposób szlak prowadzi do zwiększonej migracji komórek nowotworowych. W swojej rozprawie doktorskiej mgr Wojciech Szymanowski wykazał, że 24-godzinna inkubacja komórek raka piersi MCF-7 oraz komórek raka żołądka AGS z badanymi związkami spowodowała obniżenie stężenia sICAM-1.

Liczne badania potwierdzają, że inwazja i tworzenie przerzutów koreluje ze zwiększoną ekspresją określonych metaloproteinaz w komórkach nowotworowych. Zdolność rozkładania kolagenowych składników błon podstawnych komórek posiadają w szczególności metaloproteinaza 2 (MMP-2) oraz metaloproteinaza 9 (MMP-9). Zastosowanie związku OM-86II w skojarzeniu z przeciwciałem prowadzi w komórkach raka piersi MCF-7 do obniżenia stężenia obu badanych metaloproteinaz. Z kolei w przypadku komórek raka żołądka AGS przeciwciało anti-MUC1 w skojarzeniu ze związkiem OM-86II prowadzi do znacznego zwiększenia stężenia MMP-2 oraz spadku stężenia MMP-9 w badanych mediach hodowlanych.

Na podstawie otrzymanych wyników badań Doktorant stwierdził, że nowa pochodna oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny (OM-86II) zastosowana wraz z przeciwciałem anti-MUC1 wykazuje silniejsze właściwości cytotoksyczne i antyproliferacyjne w porównaniu do terapii etopozydem zastosowanym wraz z przeciwciałem anti-MUC1, jak i monoterapii badanymi związkami w komórkach raka piersi MCF-7 oraz raka żołądka AGS. Ponadto, posiada ona silniejsze działanie proapoptotyczne, a zainicjowana przez nią apoptoza przebiega szlakiem wewnętrznym i związana jest ze wzrostem ekspresji białka p53 oraz wzrostem stężenia białka Bax. Przeciwciało anti-MUC1 w skojarzeniu z nową pochodną diizochinoliny (OM-86II) przyczynia się do obniżenia stężenia białek odpowiedzialnych za zwiększoną proliferację i inwazję komórek nowotworowych, takich jak: mTOR, sICAM-1 oraz MMP-9. Mgr Wojciech Szymanowski stwierdził, że mucyna 1 stanowi obiecujący cel molekularny w nowotworach wykazujących nadekspresję tej glikoproteiny.

Część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej została opublikowana w dwóch artykułach:

1. Gornowicz A., **Szymanowski W.**, Bielawska A., Szymanowska A., Czarnomysy R., Kałuża Z., Bielawski K.: *Monoclonal anti-MUC1 antibody with novel octahydropyrazino[2,1-a:5,4-a']diisoquinoline derivative as a potential multi-targeted strategy in MCF-7 breast cancer cells*. Oncol Rep, 2019; 42(4): 1391–1403.

2. Gornowicz A., **Szymanowski W.**, Bielawski K., Kałuża Z., Michalak O., Bielawska A.: *Mucin 1 as a molecular target of a novel diisoquinoline derivative combined with anti-MUC1 antibody in AGS gastric cancer cells*. *Molecules*, 2021; 26(21): 6504.

Czasopisma te cieszą się dużym uznaniem wśród specjalistów z dziedziny farmacji i medycyny. Biorąc powyższe pod uwagę, opublikowane artykuły naukowe Wojciecha Szymanowskiego świadczą o jego profesjonalizmie i niewątpliwie przyzwoitym poziomie badań naukowych. Fragmenty rozprawy były wielokrotnie prezentowane na konferencjach naukowych, w tym międzynarodowych.

W recenzowanej rozprawie mgr Wojciech Szymanowski wyraźnie podkreślił wyniki badań eksperymentalnych i rozwiązywania problemów naukowych, ale są pewne kwestie do dyskusji.

1. Jakie było uzasadnienie syntezy związku OM-86II na bazie pochodnej 15A (s. 50 rozprawy) ? Czy wprowadzenie grupy okso w pozycji 5(6H) jest ważne dla realizacji pożądanego efektu farmakologicznego?
2. Czy są jakieś dane lub hipotezy dotyczące molekularnego mechanizmu wiązania cząsteczki związku OM-86II i przeciwciała anti-MUC1?
3. Jaki jest główny mechanizm działania przeciwnowotworowego związku OM-86II? Jaka jest molekularna rola przeciwciała w zwiększaniu poziomu aktywności kompleksu przeciwciało-cząsteczka w porównaniu z indywidualnym związkiem?

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Wojciecha Szymanowskiego pt. „Mucyna 1 jako cel molekularny nowej pochodnej diizochinoliny w skojarzeniu z przeciwciałem anti-MUC1 w komórkach raka piersi MCF-7 i raka żołądka AGS” cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Doktoranta i zasługuje zdaniem recenzenta na wyróżnienie.

Praca doktorska mgr. Wojciecha Szymanowskiego w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Art. 13 ust. 1 z dn. 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym z późniejszymi poprawkami z 2014r. (Dz.U. Poz. 1852). Z wielką przyjemnością mam zaszczyt przedstawić wniosek Wysockiej Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UMB o dopuszczenie mgr Wojciecha Szymanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik Katedry Chemii Farmaceutycznej,
Organicznej i Bioorganicznej Lwowskiego Narodowego
Uniwersytet Medycznego im. Danyła Halickiego,
Doktor hab. nauk farmaceutycznych, Profesor

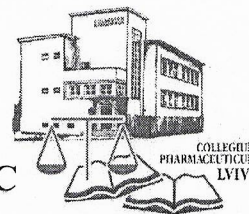


Roman Lesyk



DANYLO HALYTSKY LVIV NATIONAL
MEDICAL UNIVERSITY

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL, ORGANIC
AND BIOORGANIC CHEMISTRY



Pekarska str. 69
79010 Lviv UKRAINE

tel. +38(0322)755966
E-mail: dr_r_lesyk@org.lviv.net

Lwów, 28.12.2021

Wniosek

w sprawie wyróżnienia pracy doktorskiej mgr. Wojciecha Szymanowskiego
pt. „Mucyna 1 jako cel molekularny nowej pochodnej diizochinoliny w skojarzeniu z przeciwciałem
anty-MUC1 w komórkach raka piersi MCF-7 i raka żołądka AGS”

Pragnę rekomendować do wyróżnienia rozprawę doktorską mgr Wojciecha Szymanowskiego
przez Radę Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UMB.

Nowoczesną strategią w terapii przeciwnowotworowej jest łączenie klasycznych
chemioterapeutyków z przeciwciałami monoklonalnymi. Transbłonowa glikoproteina typu I – mucyna 1
(MUC1) została uznana przez National Cancer Institute jako jeden z najbardziej obiecujących i
atrakcyjnych celów molekularnych ostatnich lat. Jej nadmierną ekspresję wykazano w wielu typach
nowotworów pochodzenia nabłonkowego. MUC1 wpływa w znaczący sposób na zahamowanie procesów
apoptozy i przekazywania sygnałowego w komórkach nowotworowych. Zablockowanie funkcji MUC1
poprzez przeciwciała monoklonalne może wspomagać działanie terapeutyczne i zwiększać wrażliwość
komórek nowotworowych na działanie chemioterapeutyku.

Celem realizacji niniejszej pracy doktorskiej była ocena aktywności biologicznej nowej pochodnej
oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny (OM-86II) w skojarzeniu z przeciwciałem anti-MUC1 oraz
poznanie molekularnego mechanizmu ich działania. Oceniono wpływ związku OM-86II oraz przeciwciała
anti-MUC1 zastosowanych w monoterapii, jak i w skojarzeniu na cytotoksyczność oraz proces biosyntezy
DNA w komórkach raka piersi MCF-7 oraz raka żołądka AGS. Kluczowe dla przedstawionej pracy
okazały się badania wpływu tych związków na molekularne mechanizmy prowadzące do indukcji procesu
apoptozy.

Praca doktorska mgr Wojciecha Szymanowskiego prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy i
zaowocowała dwiema publikacjami naukowymi w prestiżowych czasopismach o wysokim współczynniku
IF. W obu publikacjach mgr Wojciech Szymanowski jest drugim autorem. Z pełnym przekonaniem
rekomenduję rozprawę doktorską mgr Wojciecha Szymanowskiego do wyróżnienia.

Kierownik Katedry Chemii Farmaceutycznej,
Organicznej i Bioorganicznej Lwowskiego Narodowego
Uniwersytetu Medycznego im. Danyła Halickiego,
Doktor hab. nauk farmaceutycznych, Profesor


 Roman Lesyk