



UNIwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką
ul. Chodźki 4A (Collegium Pharmaceuticum), 20-093 Lublin



Lublin, 17.01.2023

Ocena pracy doktorskiej

p.t. „Opracowanie drobnocząsteczkowego inhibitora chitotriozydazy
(CHIT1) oraz weryfikacja CHIT1 jako nowego celu
terapeutycznego w leczeniu śródmiąższowych chorób płuc

wykonanej przez mgr Barbarę Dymek

w Laboratoriach Molecule S.A w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy
realizowanego w Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
pod kierunkiem prof. dr hab. Rafała Krenke;
Promotor pomocniczy: dr Karolina Dzwonek

Śródmiąższowe choroby płuc to heterogenna grupa schorzeń charakteryzujących się zróżnicowaną etiologią, obrazem klinicznym, przebiegiem oraz rokowaniem, a także różnym nasileniem i typem zmian zapalnych, którym może towarzyszyć nieodwracalne włóknienie miąższu płucnego. Istnieje wiele różnych chorób, które mogą być określane tym mianem, w tym sarkoidoza i idiopatyczne włóknienie płuc. Badania dotyczące chorobowości śródmiąższowych chorób płuc są trudne, ponieważ nie zawsze udaje się ustalić właściwe rozpoznanie. Niektóre badania sugerują, że przypadki idiopatycznego włóknienia płuc i sarkoidozy odpowiadają łącznie za 50% wszystkich śródmiąższowych chorób płuc. Przyczyny można określić jedynie w około jednej trzeciej przypadków. Eksperci sądzą, że to kombinacja czynników genetycznych, które sprawiają, że osoba jest podatna na daną chorobę, i środowiskowych może wyjaśnić wystąpienie tych stanów chorobowych. Pomimo terapii, także glikokortykosteroidami i lekami immunosupresyjnymi,

w niektórych postaciach śródmiąższowych chorób płuc konieczna może być transplantacja płuc.

Pomimo postępów w diagnostyce i terapii, schorzenia te nadal stanowią istotny problem społeczny i medyczny. Ze względu na niedostateczną skuteczność dostępnych leków lub efekty uboczne terapii, poszukiwane są substancje, których działanie oparte byłoby na nowym mechanizmie działania. W tym kontekście, inhibicja chitotriozydazy (CHIT1) może stanowić potencjalne nowe podejście terapeutyczne w leczeniu wybranych chorób należących do śródmiąższowych chorób płuc. To właśnie CHIT1 można uznać za białko zaangażowane w procesy zapalne i włóknieniowe w płucach, które przedstawiane jest jako potencjalny nowy cel terapeutyczny w schorzeniach, u podstaw patobiologii których leży nieprawidłowa odpowiedź immunologiczna lub nadmierne odkładanie się białek macierzy zewnątrzkomórkowej.

Rozprawa doktorska opracowana przez panią mgr Barbarę Dymek poświęcona jest właśnie tym zagadnieniom. Stanowi ją monotematyczny cykl 3 oryginalnych prac opublikowanych w specjalistycznych czasopismach z listy filadelfijskiej takich jak: J Med Chem. 2020; 63(24):15527-15540 (punktacja MEiN: 200, Impact Factor: 7,446), Eur J Pharmacol. 2022; 919:1-13 (punktacja MEiN: 100, Impact Factor: 5,195) oraz J Inflamm Res. 2022; 15:5621-5634 (punktacja MEiN: 140, Impact Factor: 4,631). W pierwszej pracy Doktorantka jest drugą autorką, w drugiej wskazano na równoważne współautorstwo z pierwszą autorką, w trzeciej jest pierwszą autorką. Do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów tych prac wskazujące na wiodący udział Doktorantki w ich powstawaniu (25-60%).

Zważywszy na fakt, iż prace te przed opublikowaniem, zgodnie z wymogami redakcji, zostały już ocenione przez kilku ekspertów w danej dziedzinie, trudno więc dopatrywać się

w ich ewentualnych niedociągnięć lub uwag merytorycznych. Analizując dołączone kopie publikacji stwierdzam, iż są to prace wieloautorskie (z Promotorem jako jednym ze współautorów w dwóch pracach). Badania przedstawione w recenzowanej rozprawie zostały częściowo finansowane z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Doktorat Wdrożeniowy 50//DW/2017/01/1) oraz Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (POIR.01.01.01-00-0168/15, POIR.01.01.01-00-0551/15, (MAZOWSZE/0128/19).

Należy podkreślić, iż Doktorantka zamieściła oświadczenie, iż współautorzy prac wyrazili zgodę na wykorzystanie publikacji jako podstawy ocenianej rozprawy i dodatkowo do dokumentacji dołączono podpisane oświadczenia współautorów i samej Doktorantki, wskazujące na ich wkład w powstawanie poszczególnych publikacji, z opisem realizowanych zadań. Uważam więc dokumentację przedstawioną do wglądu recenzentom za kompletną.

Układ dysertacji doktorskiej jest typowy dla tego typu prac. Autorka obok kopii wspomnianych publikacji zamieściła streszczenia w języku polskim i angielskim, podsumowanie rozprawy z opisem kontekstu badań we wstępie wraz z czterema czytelnymi rycinami, właściwie konkretnie sformułowany cel badań, podsumowanie wyników i bibliografię do rozdziałów w języku polskim. Dołączono także wspomniane wyżej oświadczenia współautorów i kopię zgody Komisji Bioetycznej. Nie dołączono kopii zgody Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach, jednak w publikacji wskazany jest numer stosownej uchwały tej Komisji.

Cel pracy opiera się na scharakteryzowaniu aktywności i ekspresji chitynaz w materiale klinicznym od pacjentów z wybranymi śródmiąższowymi chorobami płuc, takimi jak sarkoidoza oraz idiopatyczne włóknienie płuc oraz na identyfikacji i określeniu właściwości farmakologicznych nowego drobnocząsteczkowego inhibitora chitotriozydazy z wykorzystaniem metod *in vitro* oraz modeli zwierzęcych.

Oprócz ogólnego celu, Doktoranta postanowiła zrealizować cele szczegółowe, w tym:

1. Porównanie aktywności i ekspresji chitynaz w próbkach surowicy oraz indukowanej płwociny od pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc oraz analiza ekspresji genu CHIT1 w komórkach płuc z wykorzystaniem dostępnych baz danych.
2. Analiza ekspresji i aktywności CHIT1 w surowicy pacjentów z sarkoidozą oraz ocena ekspresji CHIT1 metodami immunohistochemicznymi w preparatach biopsyjnych węzłów chłonnych śródpiersia i błony śluzowej oskrzeli chorych z sarkoidozą.
3. Selekcja inhibitora CHIT1 z wykorzystaniem badań przesiewowych oraz charakterystyka wyłonięgo związku pod kątem jego właściwości farmakokinetycznych, farmakodynamicznych oraz farmakologicznych.
4. Ocena wpływu inhibitora CHIT1 OATD-01 na ekspresję prozapalnych i prowłóknieniowych cytokin i chemokin wydzielanych przez makrofagi wyizolowane z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BALf) pacjentów ze śródmiąższowym włóknieniem płuc oraz sarkoidozą.
5. Ocena efektów terapeutycznych OATD-01 w mysich przedklinicznych modelach włóknienia płuc oraz zapalenia ziarniniakowego.

W przeprowadzonych doświadczeniach Doktorantka wraz z zespołem zastosowała metody badawcze obejmujące analizy biochemiczne, immunohistochemiczne i farmakologiczne, co pozwoliło na odpowiednie scharakteryzowanie aktywności i ekspresji chitynaz w materiale klinicznym od pacjentów z wybranymi śródmiąższowymi chorobami płuc, a szereg opracowanych testów enzymatycznych komórkowych oraz przedklinicznych modeli zwierzęcych pozwolił na identyfikację i określenie właściwości farmakologicznych OATD-01 - nowego drobnocząsteczkowego inhibitora CHIT1.

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe Doktorantki uznać można m.in. i) wykazanie u pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc znaczącego podwyższenia aktywności i

poziomu CHIT1 w surowicy i indukowanej płwocinie i stwierdzenie, iż gen CHIT1 stanowić może marker subpopulacji profibrotycznych makrofagów charakterystycznych dla chorych ze śródmiąższowymi chorobami płuc; ii) wykazanie, że sarkoidozę charakteryzuje znacznie podwyższona aktywność chitynolityczna oraz stężenie CHIT1 w surowicy, jak również silna ekspresja CHIT1 w patologicznych zmianach ziarniniakowych obserwowanych w preparatach biopsyjnych węzłów chłonnych śródpiersia i błony śluzowej oskrzeli; iii) wskazanie, iż związek OATD-01, jako nowy drobnocząsteczkowy inhibitor CHIT1 o pożądanym profilu farmakokinetycznym, farmakodynamicznym i farmakologicznym, może posiadać potencjalne zastosowanie w leczeniu idiopatycznego włóknienia płuc oraz sarkoidozy; iv) dalsza charakterystyka tego związku wskazywać może, iż OATD-01 jest efektywny in vitro i wpływa na zmniejszenie sekrecji prozapalnych mediatorów przez makrofagi wyizolowane z BALf chorych na idiopatyczne włóknienie płuc i sarkoidozę; v) inhibitor OATD-01 wykazuje także efektywność terapeutyczną w mysich modelach włóknienia płuc i zapalenia ziarniniakowego w płucach, w których to modelach podanie inhibitora wpłynęło, odpowiednio, na ograniczenie stopnia włóknienia oraz zmniejszenie liczby patologicznych zmian ziarniniakowych w płucach.

Podsumowując, CHIT1 wydaje się być białkiem o podwyższonej ekspresji u pacjentów ze śródmiąższowymi chorobami płuc, takimi jak idiopatyczne włóknienie płuc i sarkoidoza, a inhibicja CHIT1 z wykorzystaniem OATD-01 – nowego inhibitora o korzystnym profilu farmakologicznym, może stanowić skuteczne podejście terapeutyczne w schorzeniach z tej grupy.

Jeśli chodzi o stronę techniczną, graficzną, edytorską i językową, to rozprawa będąca omówieniem publikacji jest starannie zredagowana, jej język i terminologia naukowa poprawne. Piśmiennictwo, odpowiednio dobrane i aktualne, zostało zacytowane właściwie.

Dowodzi to właściwego warsztatu naukowego Doktorantki i jej przygotowania do redagowania prac naukowych.

W podsumowaniu chcę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa będąca spójnym tematycznie cyklem opublikowanych prac łącznie z ich omówieniem, dotyczy bardzo ważnego, nie do końca poznanego, ale i trudnego tematu badawczego. Zastosowano nowoczesne metody badawcze, także z zakresu farmakologii doświadczalnej oraz badania immunocytochemiczne. Eksperymenty zaplanowano, wykonano i opisano starannie, a prace dołączone do monotematycznego cyklu posiadają dużą wartość naukową. Dojrzałe merytorycznie omówienie wyników stanowiących podstawę poszczególnych publikacji ma charakter ogólny i dobrze odnosi otrzymane wyniki do współczesnej wiedzy. Praca niesie istotne i nowe treści, a oryginalne wyniki, dotyczące potencjalnie korzystnych powiązań, także z klinicznego punktu widzenia, będą bardzo przydatne dla dalszego rozwoju badań nad etiopatogenezą śródmiąższowych chorób płuc oraz poszukiwaniem nowych leków i ich punktów uchwytu. Podjęte przez Panią **mgr Barbarę Dymek** badania, precyzyjne sformułowanie ich celu, zakresu i sposobu przeprowadzenia doświadczeń uważam za przemyślane. W świetle przytoczonych przez Doktorantkę danych podjęty temat dysertacji jest wysoce uzasadniony i wnosi wiele nowych elementów o charakterze poznawczym.

Reasumując, rozprawę doktorską pani mgr Barbary Dymek p.t. „**Opracowanie drobnocząsteczkowego inhibitora chitotriozydazy (CHIT1) oraz weryfikacja CHIT1 jako nowego celu terapeutycznego w leczeniu śródmiąższowych chorób płuc**”, wykonaną w laboratoriach Molecure S.A. w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy realizowanego w Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. Rafała Krenke, Promotor pomocniczy: dr Karolina Dzwonek, oceniam wysoko. Publikacje oryginalne składające się na spójny tematycznie

cykl prac, opublikowane w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, wnoszą nowe treści i stanowią ważny przyczynek do zrozumienia roli chitotriozydazy w patogenezie śródmiąższowych chorób płuc jako nowego celu terapeutycznego w ich terapii

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Wnioskuje więc do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pani **mgr Barbary Dymek** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 17. 01. 2023

A large, irregular white rectangular area redacting the signature of the official.

