



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Zakład Immunologii
prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska



Warszawa, 01.02.2020r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Piotra Krzeczyńskiego,
zatytułowanej:**

**Nowe, małowcząsteczkowe związki chemiczne hamujące biologiczną aktywność
interleukiny 15 (IL-15)**

Praca doktorska mgr inż. Piotra Krzeczyńskiego została wykonana w Zakładzie Chemii Instytutu Farmaceutycznego i Zakładzie Immunologii, Biochemii i Żywnienia Wydziału Nauki o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Katarzyna Koziak.

Wykazująca plejotropowe działanie interleukina 15 (IL-15) pełni w organizmie liczne funkcje, głównie w regulacji odpowiedzi szeregu komórek, co więcej jest syntetyzowana w wielu tkankach i narządach. Zwiększona produkcja IL-15 może prowadzić do rozwoju przewlekłych stanów zapalnych, jak również procesów autoimmunizacyjnych, dlatego tak ważna jest kontrola syntezy i funkcji tej cytokiny. W ostatnich latach podejmowane są badania nad możliwością wykorzystania IL-15 w immunoterapii chorób autoimmunizacyjnych i nowotworowych. Ze względu na szeroki zakres działań IL-15, w niektórych przypadkach próbuje się ją podawać, w innych hamować jej działanie, podając przeciwciała monoklonalne, rozpuszczalne receptory, czy też inne związki hamujące swoiste wiązanie IL-15 do jej receptora, hamując w ten sposób jej biologiczne działanie.

Badania fizyko-chemiczne kompleksu IL-15/IL-15R α w ostatnich latach stworzyły nowe możliwości w poszukiwaniach inhibitorów IL-15, w tym przy pomocy modelowania komputerowego.

W ten nurt poszukiwań wpisują się badania prowadzone przez mgr inż. Piotra Krzeczyńskiego. Podjęcie się zadania zaprojektowania, otrzymania, scharakteryzowania i oceny zdolności hamowania aktywności biologicznej interleukiny 15 należy uznać za ważne poznawczo zadanie naukowe, stanowiące solidną podstawę do prowadzenia dalszych badań zmierzających do opracowania leku.

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Piotra Krzeczyńskiego przedstawiona została w postaci manuskryptu, zawierającego 91 stron i podzielonego na typowe dla tego rodzaju dysertacji części.

Wstęp jest dobrym wprowadzeniem do tematyki rozwijanej w rozprawie, opartym na przeglądzie wielu, 148, pozycji z literatury przedmiotu. Doktorant charakteryzuje biologiczne aktywności interleukiny 15, przytacza wyniki badań nad strukturą tej cząsteczki i kompleksu IL-15/IL-15R α oraz opisuje dotychczas podejmowane próby, w tym również w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, otrzymania i charakterystyki inhibitorów działania IL-15. Rozdział napisany jest w sposób zwięzły, a jednocześnie poruszone zostały wszystkie zagadnienia związane z prowadzonymi badaniami w sposób wyczerpujący, świadczący o dobrej orientacji Doktoranta w tematyce. Wybór publikacji będących podstawą budowania hipotezy badań świadczy o swobodnym poruszaniu się Doktoranta w tematyce. Mgr Piotr Krzeczyński postanowił zaprojektować i otrzymać nowe małowcząsteczkowe związki chemiczne, jako potencjalne inhibitory receptora IL-15R α , hamujące biologiczną aktywność IL-15, ocenianą poprzez wpływ na proliferację jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) oraz na produkcję cytokin prozapalnych TNF- α i IL-17.

Rozdział Materiały i Metody został napisany przejrzysto. Dokładnie opisano przeprowadzone *in silico* modelowanie molekularne, syntezę związków chemicznych wykorzystanych w badaniach i stosowane metody laboratoryjne, odczynniki oraz schematy przeprowadzonych doświadczeń *in vitro*.

Kolejny, obszerny, rozdział obejmujący 37 stron, zawiera opis uzyskanych w badaniach wyników. Rozdział ten został podzielony na odpowiednie podrozdziały.

Przed przystąpieniem do dalszych badań przeprowadzono ocenę cytotoksyczności badanych związków w stężeniach 0,5 mM, 2 mM i 5 mM. Doktorant stwierdził, że żaden z badanych związków nie wykazywał działania cytotoksycznego w stosunku do komórek PBMC. W rezultacie dalsze badania prowadzono w trzech stężeniach: 5 mM, 300 μ M i 50 μ M. Nasuwa się pytanie, dlaczego wybrano właśnie te stężenia?

Do oceny proliferacji komórek PBMC zastosowano test bromodeoksyurydyny BrdU. Zaplanowano odpowiednie kontrole. Doktorant stwierdził, że w stężeniu 5 mM, 12 spośród badanych związków hamowało proliferację komórek PBMC stymulowanych za pomocą IL-15. W przypadku stężenia 300 μ M, 18 spośród 20 badanych związków hamowało proliferację PBMC indukowaną za pomocą IL-15. Natomiast w stężeniu 50 μ M, 15 związków wywierało efekt hamujący proliferację PBMC. Doktorant przeprowadził następnie analizę porównawczą wpływu badanych związków na proliferację komórek PBMC indukowaną za pomocą IL-15, i stwierdził zarówno działanie hamujące jak i działanie paradoksalne stymulacji proliferacji. Zauważył również, że efekt hamowania zależał od stężenia.

W trakcie badań mgr Piotr Krzeczyński zaobserwował działanie paradoksalne 8 spośród badanych związków, całkowity zanik efektu hamowania proliferacji, a w dwu przypadkach nawet efekt pobudzenia proliferacji komórek PBMC. Doktorant zauważył, że większość związków wykazujących działanie paradoksalne zawierała w swojej strukturze łańcuch pochodny kwasu maleinowego. Czy można tym tłumaczyć takie ich działanie i jaka jest opinia Doktoranta na temat wystąpienia obserwowanych działań paradoksalnych?

Jako drugi parametr hamowania funkcji biologicznej IL-15 przez badane związki (wybrane na podstawie hamującego działania tych związków w teście proliferacji), Doktorant oceniał ich wpływ w stężeniu 50 μ M na produkcję cytokin prozapalnych TNF- α i IL-17 przez komórki PBMC stymulowane za pomocą IL-15. Wszystkie badane związki hamowały indukowaną przez IL-15 syntezę TNF- α przez komórki PBMC. Jednak tylko połowa spośród 15 badanych potencjalnych inhibitorów IL-15 hamowała produkcję IL-17 przez stymulowane komórki PBMC.

Wykonana przez Doktoranta analiza ADME pozwoliła zakwalifikować badane związki chemiczne jako „podobne do leku”, ich wiązanie do receptora było na poziomie znanych leków (wartości stałej inhibicji K_i leżą poniżej 1000 pM).

Mgr Krzeczyński dokonał również analizy wpływu elementów struktury cząsteczki na aktywność badanych pochodnych. Stwierdził, że sposób podstawienia pierścienia aromatycznego nie ma znaczącego wpływu na działanie w testach *in vitro*. Natomiast, znaczenie wydaje się mieć obecność łańcuchów pochodnych kwasu maleinowego.

Opisane w pracy badania świadczą o dobrym opanowaniu przez Doktoranta metodyki badawczej stosowanej w doświadczeniach i wskazują na Jego dużą wiedzę i umiejętności w tym zakresie.

Dyskusja napisana jest dojrzałe i przejrzyste. Uzyskane wyniki są omówione na tle dostępnej wiedzy, a wnioski wyważone. Omówienie wyników podzielono na etapy, zgodnie z prowadzonymi badaniami oraz z wyszczególnieniem poszczególnych związków chemicznych badanych w pracy.

Dysertacja napisana została starannie, mgr inż. Piotr Krzeczyński w jasny sposób przekazuje założenia pracy, wyniki i ich znaczenie w badaniach światowych. Trudno też doszukać się większych uchybień edytorskich, poza nielicznymi niezręcznymi sformułowaniami jak ilość komórek, czy nielicznymi literówkami.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską mgr inż. Piotra Krzeczyńskiego bardzo pozytywnie. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wskazuje na ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w zakresie prowadzonych badań. Wykazał się również umiejętnością samodzielnego wykonywania pracy naukowej. Doktorant podkreśla potrzebę prowadzenia dalszych badań w tym zakresie, szczególnie takich które pozwoliłyby zwiększyć wydajność wiązania liganda czy też zoptymalizować związek wiodący. Nasuwa się więc pytanie, w jakim kierunku, według Doktoranta, powinny być prowadzone dalsze badania zmierzające do opracowania leku?

Rozprawa spełnia wymagania określone w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Tym samym, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr inż. Piotra Krzeczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. Grażyna Korczak-Kowalska