



Gdańsk, 2018-03-30

**Opinia**  
**na temat kandydatury Pana mgr. Pawła Mozolewskiego**  
**do stopnia doktora nauk biologicznych**

Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora nauk biologicznych prowadzi Rada Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego według posiadanych pełnych uprawnień oraz wymaganych procedur i przepisów *Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*.

Rozprawa doktorska przygotowana przez Pana mgr. Pawła Mozolewskiego obejmuje dorobek publikacyjny przedstawiony jako spójny tematycznie zbiór czterech artykułów; wszystkie opublikowane są w punktowanych czasopismach naukowych. Cykl obejmuje publikacje przygotowane przez zespoły badaczy liczące 5-10 współautorów i zamieszczone są w czasopismach o uznaniu międzynarodowym z sumarycznym IF = 16,956. W przypadku dwóch publikacji, Doktorant jest pierwszym autorem. Według bazy *Web of Science* wszystkie prace Doktoranta posiadają na dzień 30.03.2018 r. 69 cytowań. Globalne parametry bibliometryczne dotyczące cyklu prac wchodzących w skład rozprawy są zatem dostrzegalnie wyróżniające w przypadku kandydata do stopnia doktora.

Cykl publikacji Pana mgr. Pawła Mozolewskiego, składający się ze spójnego tematycznie zbioru artykułów, został zatytułowany: „Molekularny mechanizm działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz flawonoidów w aspekcie ich potencjalnego zastosowania w leczeniu lizosomalnych chorób spichrzeniowych”. Spójny pod względem tematycznym charakter zbioru artykułów wraz z dołączonymi oświadczeniami współautorów, potwierdzają wiodącą rolę Pana mgr. Pawła Mozolewskiego w realizacji, założonej przez Promotora pracy doktorskiej – Pani dr hab. Magdaleny Gabig-Cimińskiej, prof. UG, koncepcji badawczej,



wykonaniu prac analitycznych i interpretacyjnych, oraz podczas przygotowania publikacji.

Zadania badawcze przedstawione w cyklu publikacji są właściwie sformułowane oraz systematycznie realizowane. Badania te posiadają także wartość poznawczą wnosząc zauważalny wkład w rozwój nowoczesnej farmakologii i biologii medycznej. Metodologia bazuje przy tym na sprawnie przeprowadzanej analizie z użyciem nowatorskich technik badawczych włączających wykorzystanie najbardziej zaawansowanych strategii analizy genomowej i biologii molekularnej. Cykl publikacji został podzielony na kilka etapów dotyczących określenia mechanizmu działania wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) oraz mieszanin flawonoidów podczas próby oceny modulacji procesów komórkowych z ostatecznym celem wykorzystania pozyskanej wiedzy w terapii lizosomalnych chorób spichrzeniowych.

Doktorant w swoich badaniach w pierwszym rzędzie skoncentrował się na ocenie wpływu genisteiny na metabolizm lizosomalny i aktywację czynnika transkrypcji EB (TFEB). Dlatego celem tej pracy było zidentyfikowanie genów modulowanych przez genisteinę, regulujących biosyntezę i degradację glikozaminoglikanów, których upośledzona hydroliza występuje w przebiegu mukopolisacharydoz – dużej grupy schorzeń należących do lizosomalnych chorób spichrzeniowych. W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano ponad 60 genów odgrywających rolę podczas aktywności lizosomalnej, których ekspresja została wzmocniona dodatkowo genisteiną. Ponadto stwierdzono, że 19 genów, których produkty biorą udział zarówno w syntezie glikozaminoglikanów, jak i w szlakach ich degradacji, jest znacząco inaczej regulowana poprzez dodatkowe podawanie genisteiny. Zaproponowano sieć regulacyjną łączącą kontrolę ekspresji genowej czynnika transkrypcyjnego EB (TFEB) z genisteiną, translokację jądrową TFEB oraz aktywację funkcjonowania lizosomów zależnych od TFEB. Za szczególnie wartościowe na tym etapie badań uważam przedstawioną koncepcję badawczą wskazującą, że molekularny mechanizm działania genisteiny obejmować może nie tylko upośledzenie syntezy glikozaminoglikanów, ale także może przyczyniać się do wzmocnienia aktywności lizosomalnej poprzez czynnik transkrypcyjny EB (TFEB). Zakładam również i ja, że odkrycia te mogą potencjalnie przyczynić się do dalszego wyjaśnienia korzystnego działania genisteiny w lizosomalnych chorobach spichrzeniowych, a także do ewentualnego opracowania nowych metod leczenia tych wyniszczających chorób. Wyniki badań opublikowano w *Journal of Biological Chemistry* w 2014 r. (IF = 4,573). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że praca ta posiada już 48 niezależnych cytowań (według

bazy *Web of Science* na dzień 30.03.2018 r.).

Drugi etap badań to kontynuacja etapu pierwszego, obejmująca przeprowadzenie próby oceny modulacji ekspresji tych genów, które zaangażowane są w metabolizm glikozaminoglikanów i aktywności lizosomalnej pod wpływem wybranych flawonoidów. W tym przypadku, oprócz genisteiny, do badań włączono także kemferol oraz daidzeinę). Uzyskane przez Pana mgr. Pawła Mozolewskiego wyniki z użyciem analizy mikromacierzy DNA, a następnie procedury ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy DNA w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) wykazały, że genisteina, kemferol i kombinacja tych dwóch związków indukowały zależne od dawki i czasu znaczące zmiany profili transkrypcyjnych genów metabolizmu glikozaminoglikanów w hodowlach ludzkich fibroblastów skórnych typu dzikiego (HDFa). Wykazano przy tym, że efekty biologiczne mieszaniny genisteiny i kemferolu były większe, niż te ujawnione przez którykolwiek z tych związków stosowanych samodzielnie. Obserwując zmniejszenie poziomów wytwarzania glikozaminoglikanów w komórkach HDFa i fibroblastach MPS II w obecności genisteiny i kemferolu wytypowano czterdzieści pięć genów do dalszej weryfikacji. Wyniki badań opublikowano w *Scientific Reports* w 2015 r. (IF = 5,228). Praca ta posiada 19 niezależnych cytowań (według bazy *Web of Science* na dzień 30.03.2018 r.).

Bardzo dobre kwalifikacje badawcze Pana mgr. Pawła Mozolewskiego znalazły wyraz w ostatnim etapie doświadczeń. Podjęto się próby oceny wpływu wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych, indometacyny i nimesulidu oraz dodatkowo dobranego porównawczo paracetamolu (funkcjonującego w nomenklaturze amerykańskiej jako acetaminofen) w zestawieniu z izoflawonoidem genisteiną jako potencjalnymi modulatorami metabolizmu glikozoaminoglikanów podczas terapii mukopolisacharydoz z objawami neurologicznymi; ze względu na skuteczne właściwości penetracji tych związków przez barierę krew-mózg. Stwierdzono, że indometacyna i nimesulid (nie zaś paracetamol), znacząco hamowały syntezę glikozoaminoglikanów w hodowlach ludzkich fibroblastów skórnych typu dzikiego (HDFa), podczas gdy najbardziej upośledzone wytwarzanie glikozoaminoglikanów obserwowano po ekspozycji na mieszaninę nimesulidu i genisteiny. Z kolei wykazano, że fosforylacja receptora EGF (EGFR) była najbardziej zahamowana w obecności indometacyny i nimesulidu. Podczas badania aktywności wytwarzania 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K) zaobserwowano najbardziej znaczący spadek jej produkcji w przypadku ekspozycji fibroblastów na nimesulid. Badania dowodzą, że niesteroidowe leki

przeciwzapalne (NLPZ) i ich mieszaniny z genisteiną mogą modulować komórkową syntezę glikoaminoglikanów poprzez wpływ na szlaki sygnalizacji EGFR i PI3K. Wyrażam przy tym pełne uznanie dla krytycznej interpretacji wyników sugerujących możliwość zaproponowanie wybranych leków z grupy NLPZ, paracetamolu i genisteiny w ewentualnej, perspektywicznej farmakoterapii chorób spichrzeniowych. Wyniki badań opublikowano w *Scientific Reports* w 2017 r. (IF = 4,259). Niezwykle cennym uzupełnieniem tych badań jest ich kontynuacja w ostatniej z cyklu publikacji przedstawiającej ocenę wpływu indometacyny i nimesulidu na profile transkryptomyczne w hodowlach ludzkich fibroblastów skórnych typu dzikiego (HDFa). Łącznie zaproponowano 3803 genów ulegających ekspresji różnicowej w odpowiedzi na zastosowane warunki eksperymentalne. Z drugiej strony, całkowita liczba różnicujących genów nie korelowała bezpośrednio ze zmianami profili transkryptomicznych fibroblastów. Zasugerowano przy tym, że wybrane leki mogą więc nieznacznie modulować transkryptom. Przedyskutowano również ograniczenia danych transkryptomicznych, które nie muszą odzwierciedlać wszystkich zmian po obróbce posttranskrypcyjnej. Wyniki badań opublikowano w *European Journal of Pharmacology* w 2018 r. (IF = 2,896).

W badaniach objętych zbiorem prac wchodzących w cykl pracy doktorskiej Pan mgr Paweł Mozolewski udowodnił bardzo dobre przygotowanie badawcze, doświadczalne i w zakresie analizy statystycznej. Wykazał się umiejętnością racjonalnej, systematycznej realizacji założonych prac eksperymentalnych oraz sprawnością podczas przygotowania wyników badań do ich bezpośredniego opublikowania w renomowanym, międzynarodowo uznawanym piśmiennictwie specjalistycznym.

Ostatecznie, wywiązując się z powierzonego obowiązku recenzenta, mam również kilka pytań, które poddane dyskusji być może zaowocują dalszym rozwinięciem opisywanej tematyki badawczej.

- 1) W pracy opublikowanej w *Journal of Biological Chemistry* z 2014 r. wskazano, że qRT-PCR umożliwia potwierdzenie istotnego znaczenia wybranych genów w rozpatrywanych chorobach spichrzeniowych. Czy dotyczy to wszystkich genów przedstawionych na Rycinie 3? Czy są to geny, dla których wykazano istotność statystyczną?
- 2) Wykonując analizę statystyczną dla wyników analizy mikromacierzy DNA i qRT-PCR opisanych w pracy opublikowanej w *Scientific Reports* w 2015 r., jakie

poczyniono statystycznie uzasadnione założenia wstępne przed rozpoczęciem analizy wariancji ANOVA?

- 3) Jakie są podobieństwa i różnice metodologiczne analizy transkryptomicznej i proteomicznej?

Podsumowując, zbiór publikacji przedstawiony przez Pana mgr. Pawła Mozolewskiego ma rozpoznawalną pozycję naukową. Cykl prac Doktoranta posiada wyraźne elementy nowości naukowej w zakresie nowoczesnej farmakologii i biologii medycznej. Praca doktorska swoją tematyką i zakresem materiału badawczego zasługuje na uwagę. Została ona dobrze zaprojektowana i wykonana, odzwierciedlając przy tym duży wkład pracy podczas opracowania danych pomiarowych. Biorąc powyższe pod uwagę, nie mam wątpliwości, że spełnione są wymogi formalne, aby Rada Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego mogła podjąć uchwałę o dopuszczeniu Pana mgr. Pawła Mozolewskiego do ostatniego etapu postępowania kwalifikacyjnego, czyli publicznej obrony. Ocenianą rozprawę proponuję równocześnie wyróżnić. Rozprawa doktorska zasługuje na wyróżnienie ze względu na to, że wszystkie publikacje oryginalne stanowią istotny wkład badawczy w dziedzinie farmakologii doświadczalnej. Posługując się nowoczesną metodologią badawczą z zakresu biologii molekularnej prace dostarczają wyniki wskazujące na pozyskanie wyraźnie nowej wiedzy. Dyskusja dotycząca wpływu rozpatrywanych substancji leczniczych i substancji pochodzenia naturalnego na poziomie modyfikacji komórkowych wskazuje bezpośrednio kierunki molekularne dla dalszych badań, które mogą być dalej jeszcze intensywniej eksplorowane także przez społeczność międzynarodową. Podsumowując, praca doktorska Pana mgr. Pawła Mozolewskiego stanowi wzorowy przykład podejścia badawczego opartego na publikacjach włączających się w globalną polemikę naukową i jestem przekonany, że, jak obecnie przedstawione, także i kolejne uzyskiwane wyniki badań będą publikowane w renomowanych, specjalistycznych czasopismach rangi międzynarodowej.

**K I E R O W N I K**  
Katedry i Zakładu  
Chemii Farmaceutycznej

*prof. dr hab. Tomasz Bączek*