



Gdańsk, 27.06.2025 r.

Dr hab. Anna Wardowska
Katedra i Zakład Fizjopatologii
Wydział Lekarski
Gdański Uniwersytet Medyczny

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Wiktorii Rejmak
pt. „Nowe analogi ludzkiej katelicydyny (LL-37) o zwiększonej odporności na
degradację enzymatyczną. Projektowanie, synteza chemiczna i badania
biologiczne.”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Wiktorii Rejmak pt. „Nowe analogi ludzkiej katelicydyny (LL-37) o zwiększonej odporności na degradację enzymatyczną. Projektowanie, synteza chemiczna i badania biologiczne” została wykonana w Pracowni Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej Katedry Technologii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Opiekę promotorską nad mgr Rejmak sprawował prof. dr hab. Adam Lesner. Praca opisuje otrzymywanie analogów ludzkiej katelicydyny LL-37 oraz ocenę wpływu wprowadzonych modyfikacji na parametry fizykochemiczne uzyskanych związków oraz wybranych właściwości biologicznych.

Układ jest typowy dla prac o charakterze oryginalnym z wyraźnym podziałem na wstęp, cele pracy, część metodyczną oraz wyniki połączone z dyskusją. Pracę kończą sformułowane przez Autorkę wnioski oraz bogata bibliografia. Pracę wzbogacają liczne ryciny i tabele, adekwatnie rozmieszczone w poszczególnych częściach rozprawy. Dodatkowo praca poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim, a w końcowej części dysertacji znajduje się wykaz dorobku naukowego Doktorantki.

W swojej pracy doktorskiej mgr Wiktoria Rejmak skupiła się na naturalnych peptydach o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i ich roli w mechanizmach wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Wskazała również potencjalne zastosowanie tych substancji w terapiach chorób o podłożu infekcyjnym. Słaby punkt tych związków, którym jest podatność na degradację enzymatyczną, wykorzystała jako oś swojej pracy. Postawiła sobie za cel syntezę nowych analogów naturalnej ludzkiej katelidycyny LL-37 charakteryzujących się zwiększoną odpornością na działanie enzymów, a także potwierdzenie potencjalnej przydatności klinicznej uzyskanych analogów. Badania Doktorantki doskonale wpisują się w trend poszukiwania nowych substancji przeciwbakteryjnych, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu infekcji wywołanych przez bakterie lekooporne. Wartościowym elementem omawianej pracy było wprowadzenie badań biologicznych na liniach komórkowych różnicujących się do neutrofili, które stanowią niezwykle istotny element odpowiedzi przeciwbakteryjnej.



W części literaturowej doktorantka szczegółowo opisuje historię, budowę oraz znaczenie i właściwości biologiczne ludzkiej katelicydyny na tle całej grupy katelicydyn i innych peptydów antymikrobiotycznych. Na uwagę zasługuje dobrze skomponowany fragment poświęcony przeglądowi doniesień naukowych opisujących kliniczne znaczenie LL-37. W ten sposób Doktorantka podkreśla rolę LL-37 w patogenezie szeregu chorób człowieka oraz potencjalne zastosowanie natywnego peptydu, jak i jego pochodnych w warunkach klinicznych (zarówno w aspekcie diagnostycznym jak i terapeutycznym).

Rozwijając wstęp teoretyczny, Doktorantka poświęca dwa podrozdziały na omówienie zjawiska odporności proteolitycznej oraz metod służących jej zwiększeniu. Jest to istotna kwestia w kontekście działania zarówno naturalnych, jak i syntetycznych peptydów. Doktorantka kładzie nacisk na proteazy powiązane z aktywnością neutrofili, komórek układu immunologicznego zaangażowanych w odporność wrodzoną i indukcję zapalenia.

W kolejnej części wstępu, Doktorantka przechodzi do omawiania białek wiążących DNA, by następnie przejść do neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych i zakończyć wprowadzenie przedstawieniem wiedzy o budowie i funkcji neutrofili. Osobiście nie podążam za tokiem rozumowania Doktorantki. W moim mniemaniu kolejność przedstawiania powyższych zagadnień powinna być odwrotna, by móc w sposób logiczny wprowadzić czytelnika w dalszy ciąg pracy i wykazać zależność między poszczególnymi etapami pracy badawczej. Kluczowa jest również sekwencja zdarzeń dotycząca samej aktywacji neutrofili, które w przebiegu reakcji zapalnej wchodzi w proces aktywnej śmierci komórki i tworzą sieci NET. Na tym etapie kluczowe są zmiany związane z dekondensacją chromatyny, zmianą struktury białek czy uwolnieniem ziarnistości neutrofilowych. Wszystkie te elementy odpowiedzialne są za tzw. uwięzienie mikroorganizmu, mające na celu ograniczenie jego rozprzestrzeniania i ostateczną eliminację. Zatem, biorąc pod uwagę naturalną kolejność zjawisk w tym procesie, zasadne wydaje się odwrócenie kolejności wspomnianych podrozdziałów wstępu. Niezależnie od powyższych uwag, należy podkreślić dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki, dla której zagadnienia biologiczne nie stanowią codziennego obszaru pracy.

Cele pracy zostały przedstawione w bardzo klarowny i przystępny sposób. Wartością dodaną tej części pracy jest krótki opis dotyczący każdego ze sformułowanych celów pracy. Pozwoliło to na poznanie szerszego kontekstu poszczególnych zagadnień rozpatrywanych przez Doktorantkę w pracy. Głównym zadaniem, jakie postawiła przed sobą Doktorantka było uzyskanie nowych analogów ludzkiej katelidyny LL-37 o zwiększonej stabilności enzymatycznej. Wśród celów szczegółowych znalazła się analiza wpływu wprowadzonych modyfikacji na strukturę drugorzędową otrzymanych analogów, ocena ich zdolności do wiązania DNA, określenie stabilności enzymatycznej otrzymanych związków oraz ich oddziaływanie na linie komórkowe.

Rozdział „Metody przeprowadzonych badań” to kompendium technik stosowanych przez Doktorantkę w części eksperymentalnej pracy. Przedstawiony materiał wydaje się dobrze skomponowany i ułożony w logiczną całość. Tę część pracy otwierają metody otrzymywania peptydomimetyków oraz oceny ich właściwości fizykochemicznych. W tym miejscu przedstawione zostały techniki służące analizie oddziaływań między otrzymanymi analogami LL-37 a kwasami



nukleinowymi, a także ocenie wpływu wybranych enzymów na badane peptydomimetyki. Następnie Doktorantka opisuje badania biologiczne, na które złożyły się badania na liniach komórkowych, takie jak ocena cytotoksyczności otrzymanych związków oraz ich wpływ na aktywność wybranych komórek immunologicznych. Część chemiczna została przedstawiona dość szczegółowo, niemniej ze względu na brak praktyki, nie umiem określić, czy opis jest wystarczający do bezproblemowego powtórzenia doświadczeń przeprowadzonych przez Doktorantkę. Natomiast doceniam fakt, że Doktorantka nie przypisuje sobie wszystkich działań i otwarcie mówi o współpracach z laboratoriami specjalizującymi się w danych technikach.

W przedstawionej pracy wyniki zostały połączone z dyskusją. Doktorantka sprawnie przeprowadza czytelnika przez ogrom uzyskanych wyników, jednocześnie umiejętnie zestawiając je z dostępną literaturą. W tej części dysertacji umieszczone zostały wyniki potwierdzające uzyskanie właściwych produktów syntezy, ich zdolność do tworzenia kompleksów z kwasami nukleinowymi, odporność na działanie proteolityczne wybranych enzymów oraz wpływ badanych peptydomimetyków na wybrane linie komórkowe. Całość uzupełniają różnorodne wykresy, tabele oraz zdjęcia. Ważnym elementem, wartym podkreślenia, jest bardzo spójna i rozbudowana dyskusja wyników doświadczalnych z danymi literaturowymi. Świadczy to o dużej wiedzy ogólnej Doktorantki, umiejętności korzystania z dostępnych baz danych oraz syntetycznej analizy wyników pracy własnej z osiągnięciami innych zespołów. W kilku przypadkach brakowało mi jednego, dwóch zdań podsumowujących opisane obserwacje.

Podsumowanie i wnioski zamykają część merytoryczną pracy. Doktorantka odnosi się do wszystkich swoich celów, zarówno głównego jak i szczegółowych. Autorka niniejszej pracy otrzymała wszystkie zaplanowane peptydomimetyki, które mogła następnie poddać kolejnym analizom. Wykazała zachowanie α -helikalnej struktury drugorzędowej otrzymanych peptydomimetyków mimo wprowadzonych modyfikacji łańcucha. Istotnym osiągnięciem była analiza zdolności badanych analogów do wiązania kwasów nukleinowych. Ponadto Doktorantka określiła wielkości tworzonych kompleksów, przybliżyła ich struktury, a także ustaliła stężenia peptydomimetyków skutkujące najwyższym poziomem kondensacji DNA. Kolejno, Doktorantka wykazała zwiększoną oporność wybranych peptydomimetyków na działanie proteaz oraz wskazała, które z wprowadzonych modyfikacji mogą warunkować ten efekt. W badaniach komórkowych wykazała brak cytotoksyczności badanych analogów LL-37, a także potwierdziła modulujące działanie tych związków na populację neutrofili, sugerując ich potencjalne działanie przeciwzapalne. Moją uwagę w podsumowaniach przykuł punkt 5, w którym Doktorantka mówi o swoim niepowodzeniu. Uważam, że to niezwykle istotne by otwarcie mówić również o braku wyników, czy nieudanych eksperymentach. Daje to przestrzeń do dalszych dyskusji i poszukiwania rozwiązań, oraz odczarowuje rzeczywistość i uczy radzenia sobie z przeciwnościami losu tak częstymi w wymagającym naukowym świecie.

Dodatkowo w pracy znajduje się wykaz dorobku naukowego Doktorantki, który podkreśla jej zaangażowanie naukowe. Mgr Rejmak jest współautorem 6 publikacji, przy czym w jednej z nich figuruje jako pierwszy autor. Doktorantka może się również wykazać czynnym udziałem w szeregu konferencji naukowych, gdzie miała możliwość prezentowania swoich wyników w trakcie wystąpień ustnych oraz w formie posterów. Na uwagę zwraca również zaangażowanie projektowe Autorki, gdyż



oprócz uczestnictwa w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki, dwukrotnie zdobyła własne finansowanie w ramach programów oferowanych przez Uniwersytet Gdański.

Pytania i uwagi

Prosiłabym o doprecyzowanie kilku kwestii dotyczących pracy na liniach komórkowych.

1. W jaki sposób monitorowana była liczba komórek w naczyniach hodowlanych – na jakiej podstawie podejmowano decyzję o regulowaniu ich liczby? Na podstawie czasu trwania hodowli, konfluencji? Jak wyglądała procedura regulowania liczby komórek? Czy był to pasaż z użyciem enzymów typu trypsyna? Jak liczone były komórki?
2. Przy opisie testów cytotoksyczności Doktorantka napisała „Każdy z testów wykonywałam dwukrotnie” – proszę o doprecyzowanie liczby replikatów biologicznych i technicznych.
3. Na jakiej podstawie wybrano stężenie związków ($5,05 \mu\text{M}$) do testów oceny wpływu badanych związków na aktywność HL-60?
4. W jaki sposób potwierdzano efektywność różnicowania komórek linii HL-60 do neutrofilii (komórek neutrofilopodobnych)? Co stanowiło wyznacznik uzyskania pożądanego fenotypu komórek? Czy aktywność enzymatyczna była markerem zróżnicowania komórek i jednocześnie zmienną badaną w testach?

W części związanej z wynikami i dyskusją również pojawiło się kilka wątpliwości:

1. Co dokładnie, z punktu widzenia statystyki, przedstawiają wykresy nr 30-34? Cemu odpowiadają słupki i wąsy? Czy jest to średnia i odchylenie standardowe czy też mediana i kwartyle? Czy do analizy wyników z badań biologicznych użyto jakichś konkretnych testów statystycznych?
2. Proszę o próbę wyjaśnienia, dlaczego dla niektórych analogów nie udało się potwierdzić mas molekularnych z masami teoretycznymi oraz o czym świadczy fakt, że analiza wpływu stężenia niektórych z analogów LL-37 z dsDNA nie powiodła się ze względu na agregację próbek na wczesnym etapie? Czy i jak można przełożyć te obserwacje na biologiczne właściwości badanych związków?
3. Dlaczego nie wykonano pomiarów AFM (mikroskopii sił atomowych) dla kompleksów peptydomimetyków z DNA 76pz?
4. Na wykresach przedstawiających krzywe zaniku otrzymane w wyniku proteolizy PR3 nie widzę fragmentu 2183,92 g/mol na wykresie 27A. Proszę również o wyjaśnienie, dlaczego na rysunku 27C są tylko dwa fragmenty zamiast 3 jak w przypadku pozostałych wykresów?
5. Dlaczego peptydomimetyk [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37 jest częściowo odporny na hydrolizę przez PR3 (Rys. 27D) - czy Doktorantka ma jakieś sugestie?
6. Proszę jeszcze o wyjaśnienie dwóch terminów: morfologia limfoblastyczna i monoosteofile.
7. Strona edytorska pracy wymagałaby pewnych poprawek. W pracy pojawiają się błędy stylistyczne i interpunkcyjne. Ponadto, zauważyłam błędy dotyczące tłumaczenia terminów biologicznych, np. „granulki neutrofilii” zamiast „ziarnistości neutrofilii”. Również określenie: „neutrofile są strukturami” uważam za niefortunne.



Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Weroniki Rejmak stanowi interesujące podejście do globalnego problemu rosnącej lekooporności patogenów i zapotrzebowania na nowoczesne terapeutyki przeciwbakteryjne. Doktorantka z sukcesem otrzymała peptydomimetyki, będące efektem modyfikacji łańcucha naturalnej ludzkiej ketalidycyny LL-37. Co istotne, zsyntetyzowane związki charakteryzowały się zwiększoną odpornością na działanie enzymów, a także wykazywały korzystniejsze właściwości biologiczne w porównaniu do natywnego peptydu. Istotnym osiągnięciem niniejszej pracy, wartym kontynuacji, były wyniki badań przeprowadzonych na liniach komórkowych. Okazało się bowiem, że wyindukowane z linii HL-60 komórki o charakterze neutrofilopodobnym, odpowiadały na obecność badanych peptydomimetyków zmianą poziomu aktywacji. Powyższe obserwacje pokazują szereg możliwości aplikacyjnych badanych związków. W swoim podsumowaniu Doktorantka skupiła się głównie na przeciwzapalnym efekcie wywieranym przez badane analogi. Chciałabym podkreślić, że kilka z otrzymanych związków prowadziło również do aktywacji komórek w hodowlach. Zatem dalsze analizy właściwości immunomodulacyjnych peptydomimetyków otrzymanych przez Doktorantkę wydają się niezbędne. Pomimo szeregu uwag zawartych w niniejszej recenzji, chciałabym podkreślić wysoką wartość naukową oraz duży potencjał aplikacyjny uzyskanych przez Doktorantkę wyników.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Wiktorii Rejmak pt. „Nowe analogi ludzkiej ketalidycyny (LL-37) o zwiększonej odporności na degradację enzymatyczną. Projektowanie, synteza chemiczna i badania biologiczne” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 z późniejszymi zmianami.

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Wiktorii Rejmak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki chemiczne.


dr hab. Anna Wardowska