

dr hab. n.med. Renata Perlikowska, prof. uczelni
Zakład Biochemii Kwasów Nukleinowych
Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 06.07.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Aleksandry Doroty Helbik-Maciejewskiej, zatytułowanej

„Design, chemical synthesis and enzymatic studies of transmembrane serine proteases inhibitors: matriptase-1, matriptase-2 and furin” (Projektowanie, chemiczna synteza oraz ocena aktywności inhibitorów transmembranowych proteinaz serynowych: matryptazy-1, matryptazy-2 oraz furyny)

wykonanej w Katedrze Biochemii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Rolki oraz promotora pomocniczego dr Agaty Gitlin-Domagalskiej

Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Doroty Helbik-Maciejewskiej została przygotowana w odpowiedzi na powierzenie mi obowiązków recenzenta przez Radę Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego uchwałą z dnia 13 maja 2026 roku.

Ocena wyboru tematyki badawczej

Proteazy zakotwiczone w błonie komórkowej, odgrywają fundamentalną rolę w regulacji procesów fizjologicznych, takich jak dojrzewanie białek, przekazywanie sygnałów komórkowych czy utrzymanie integralności tkanek. Jednocześnie coraz liczniejsze badania wskazują, że deregulacja aktywności tych enzymów prowadzi do rozwoju wielu schorzeń, w szczególności nowotworów, chorób zapalnych oraz infekcji wirusowych i bakteryjnych. W tym kontekście proteazy takie jak matryptaza-1 (MT1) oraz furyna są uznawane za istotne cele terapeutyczne, których modulacja może przyczynić się do opracowania nowych strategii leczenia.

Szczególne znaczenia nabiera potrzeba projektowania inhibitorów charakteryzujących się wysoką selektywnością działania. Jest to związane z faktem, że blisko spokrewnione enzymy, takie jak MT1 i matryptaza-2 (MT2), mogą pełnić odmienne, a nawet przeciwstawne funkcje biologiczne, zwłaszcza w kontekście procesów nowotworowych. Nieselektywne hamowanie aktywności tych proteaz mogłoby zatem prowadzić do efektów niepożądanych, ograniczając potencjalne zastosowanie kliniczne inhibitorów.

W tym świetle badania ukierunkowane na racjonalne projektowanie, chemiczną syntezę oraz ocenę aktywności nowych inhibitorów omawianych enzymów mają nie tylko istotne znaczenie poznawcze, ale również wyraźny potencjał aplikacyjny. Mogą one bowiem stanowić podstawę do rozwoju nowych związków o charakterze terapeutycznym, znajdujących zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych, zakażeń oraz innych schorzeń związanych z zaburzoną aktywnością proteaz.

Pani mgr Aleksandra Dorota Helbik-Maciejewska, poświęciła swoją rozprawę doktorską istotnemu i aktualnemu zagadnieniu z pogranicza chemii medycznej, biochemii oraz biologii molekularnej, jakim jest poszukiwanie nowych, selektywnych inhibitorów enzymów o kluczowym znaczeniu w patogenezie wielu chorób.

Celem rozprawy doktorskiej było zaprojektowanie, otrzymanie metodami syntezy chemicznej oraz scharakteryzowanie aktywności biologicznej inhibitorów wybranych transbłonowych proteaz, ze szczególnym uwzględnieniem ich selektywności oraz stabilności. Szczególny nacisk położono na selektywną inhibicję MT1 przy jednoczesnym zachowaniu braku aktywności wobec blisko spokrewnionej MT2, natomiast drugą grupę zsyntetyzowanych związków stanowiły inhibitory furyny. Kolejnym celem badań było opracowanie i optymalizacja efektywnej, skróconej metody N-metylowania peptydów na nośniku stałym, z wykorzystaniem techniki ultradźwiękowej, w celu zwiększenia wydajności i skrócenia czasu syntezy. Otrzymane związki zaprojektowano zarówno jako narzędzia badawcze do analizy funkcji proteaz, jak i potencjalne struktury wiodące do opracowania nowych terapii przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych. W świetle powyższych danych, tematyka przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Doroty Helbik-Maciejewskiej jest wartościowa i uzasadniona, a podjęte badania wpisują się w nurt poszukiwań nowoczesnych, ukierunkowanych terapii o wysokiej selektywności działania.

Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Doroty Helbik-Maciejewskiej stanowi oryginalne opracowanie naukowe i została przygotowana w klasycznej formie monografii, tym samym spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Tematyka rozprawy znajduje odzwierciedlenie w dorobku publikacyjnym Doktorantki, obejmującym 5 prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Prace te charakteryzują się wysokim poziomem merytorycznym i wpisują się w aktualne nurty badawcze w zakresie chemii medycznej, co potwierdza kompetencje Doktorantki w podejmowanej problematyce.

Rozprawa ma formę monografii naukowej, której opracowanie wymagało znacznego nakładu pracy, a zarazem umożliwiło Doktorantce pogłębione i szczegółowe omówienie obszernego materiału badawczego oraz uzyskanych wyników. Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Doroty Helbik-Maciejewskiej jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu monografii i liczy łącznie 169 stron. Praca została napisana w języku angielskim i obejmuje streszczenia w języku angielskim i polskim, wykaz stosowanych skrótów oraz rozbudowaną część wprowadzającą i eksperymentalną.

Rozprawa rozpoczyna się wprowadzeniem teoretycznym, w którym omówiono właściwości i klasyfikację proteaz, ze szczególnym uwzględnieniem proteaz związanych z błoną komórkową, takich jak MT1, MT2 oraz furyna. W kolejnych podrozdziałach przedstawiono ich budowę, mechanizmy działania oraz znaczenie biologiczne i kliniczne. Istotnym elementem części literaturowej jest również przegląd inhibitorów proteaz serynowych, obejmujący ich klasyfikację, mechanizmy działania oraz przykłady związków o potencjale terapeutycznym. W dalszej części pracy omówiono zagadnienia związane z projektowaniem związków o potencjale diagnostycznym, w tym peptydowych sond molekularnych.

Rozdział poświęcony celom pracy został osadzony w szerokim kontekście biologiczno-medycznym i identyfikuje istotny problem opracowania selektywnych inhibitorów MT1 oraz ulepszenia inhibitorów furyny.

Część eksperymentalna obejmuje szczegółowy opis zastosowanych materiałów oraz metod, w tym technik syntezy peptydów w fazie stałej, metod modyfikacji strukturalnych (m.in. cyklizacji, znakowania fluorescencyjnego oraz N-metylacji), a także procedur oczyszczania i analizy otrzymanych związków. Oddzielny rozdział poświęcono badaniom enzymatycznym, obejmującym charakterystykę aktywności inhibicyjnej zsyntezowanych inhibitorów wobec badanych proteaz, oraz ocenę ich stabilności proteolitycznej.

Najobszerniejszą część rozprawy stanowi rozdział „Results and discussion”, w którym przedstawiono wyniki badań dotyczących projektowania, syntezy oraz charakterystyki inhibitorów MT1, MT2 i furyny. Zaprezentowane wyniki obejmują zarówno analizę zależności struktura–aktywność, jak i ocenę właściwości biologicznych oraz stabilności otrzymanych związków.

Pracę kończą wnioski, które syntetyzują uzyskane rezultaty, oraz obszerny wykaz literatury obejmujący 286 pozycje. Uzupełnienie stanowią spisy rycin i tabel.

W dysertacji zawarty jest również wykaz osiągnięć naukowych Doktorantki, w tym zestawienie publikacji, spis wystąpień konferencyjnych w formie komunikatów ustnych i prezentacji posterowych, których współautorem była Pani mgr Aleksandra Dorota Helbik-

Maciejewska. Ponadto zestawione są informacje dotyczące doświadczenia Doktorantki, przyznanych stypendiów, grantów badawczych.

Układ pracy jest logiczny i przejrzysty, a kolejność przedstawianych zagadnień odpowiada standardom obowiązującym dla rozpraw doktorskich o charakterze eksperymentalnym. Rozprawa została napisana poprawnym językiem naukowym, jednak ze względu na jej opracowanie w języku angielskim pojawiają się sporadyczne niedoskonałości językowe. W tekście dostrzegalne są także uchybienia edytorskie. Wskazane byłoby również podniesienie jakości rycin, co przyczyniłoby się do lepszej przejrzystości prezentowanych wyników. Podsumowując tę część oceny mogę stwierdzić, że **recenzowana praca spełnia wszystkie formalne wymagania stawiane rozprawom doktorskim.**

Ocena merytoryczna rozprawy

We wstępie rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandra Dorota Helbik-Maciejewska scharakteryzowała proteazy, ze szczególnym uwzględnieniem serynowych proteaz błonowych. Przedstawiła ich podział, obejmujący m.in. proteazy transbłonowe typu I oraz typu II. Szczególną uwagę poświęciła MT1 i MT2. Scharakteryzowała także proproteinowe konwertazy, z uwzględnieniem furyny. Jednakże w tym miejscu, chciałabym się odnieść do zaproponowanej przez Doktorantkę systematyki, jest ona przejrzysta, jednak wymaga doprecyzowania w zakresie klasyfikacji furyny. W mojej ocenie bardziej właściwe byłoby wyodrębnienie proproteinowych konwertaz w osobnym rozdziale, a nie w obrębie proteaz serynowych, ponieważ, mimo wspólnego mechanizmu katalitycznego opartego na reszcie seryny, stanowią one odrębną rodzinę enzymów (subtilizynopodobnych), różną pod względem strukturalnym i ewolucyjnym od klasycznych proteaz serynowych typu trypsynowego. Furyna, mimo mechanizmu katalitycznego opartego na reszcie seryny, nie jest zaliczana do klasycznych transbłonowych proteaz serynowych typu matriptaz.

W dalszej części Doktorantka rzeczowo nakreśliła problemy, wyzwania i cele badawcze związane z aktywnością wspomnianych enzymów, bowiem nadekspresja MT1 sprzyja progresji, przerzutowaniu oraz pogarsza rokowanie w wielu typach nowotworów, podczas gdy MT2 odpowiada przede wszystkim za regulację metabolizmu żelaza i wykazuje odmienny do MT1, często protekcyjny charakter w onkogenezie. Natomiast, furyna odgrywa istotną rolę w rozwoju nowotworów, gdyż aktywuje liczne białka zaangażowane w proliferację, angiogenezę i inwazję komórek, a jej nadekspresja koreluje z agresywnością i złym rokowaniem w wielu typach raka. Ponadto enzym ten uczestniczy w patogenezie infekcji wirusowych, aktywując glikoproteiny wirusowe niezbędne do wnikania do komórek gospodarza, co czyni go atrakcyjnym celem terapeutycznym. Doktorantka słusznie podkreśliła znaczenie hamowania aktywności ww. enzymów, jako obiecującej strategii

terapeutycznej. Jak sama zauważyła, ze względu na szerokie spektrum działania oraz możliwość racjonalnego projektowania, inhibitory proteaz stanowią obiecującą grupę związków w nowoczesnej farmakoterapii. Podkreślając znaczenie badań w tym obszarze, szeroko scharakteryzowała poznane do tej pory inhibitory proteaz, z uwzględnieniem inhibitora trypsyny (SFTI-1) oraz inhibitora Bowmana–Birka (HV-BBI), które wykazują wysoką stabilność i silne właściwości inhibitorowe wobec proteaz serynowych. SFTI-1 stanowi doskonały, dobrze scharakteryzowany szkielet do projektowania selektywnych inhibitorów różnych enzymów, natomiast HV-BBI i jego analogi wyróżniają się wysoką aktywnością, zwłaszcza wobec MT1, co czyni je obiecującymi związkami w projektowaniu nowych inhibitorów o potencjale terapeutycznym. Odrębnym zadaniem była próba opracowania peptydowych sond molekularnych do wizualizacji komórek wykazujących nadekspresję MT1 i furyny, przy czym Doktorantka trafnie wskazała na przewagę peptydów nad przeciwciałami oraz wyróżniła dwa podstawowe typy takich sond, oparte na powinowactwie i aktywnościowe.

Cele pracy zostały osadzone w szerokim i dobrze uzasadnionym kontekście biologicznym i medycznym, obejmującym rolę proteaz serynowych MT1, MT2 oraz furyny w procesach nowotworowych i infekcyjnych. Doktorantka wskazuje na kluczowy problem badawczy, jakim jest potrzeba opracowania selektywnych inhibitorów MT1 przy jednoczesnym uniknięciu oddziaływania na MT2, a także poprawy właściwości inhibitorów furyny. Jednakże należy zauważyć, że cele pracy nie zostały wyodrębnione w sposób jednoznaczny i mają częściowo charakter opisowy. Są one wplecione w szerszy kontekst wprowadzenia i momentami łączą elementy uzasadnienia, założeń projektowych oraz opisu podejścia badawczego. Bardziej przejrzyste sformułowanie celów, np. w postaci wyraźnie wydzielonego fragmentu lub punktów, zwiększyłyby klarowność tej części pracy.

W części eksperymentalnej Doktorantka szczegółowo opisała stosowane materiały, metody analityczne oraz procedury syntezy peptydów na nośniku stałym, w tym różne strategie cyklizacji (mostki disiarczkowe, triazolowe, diselenidowe), modyfikacje strukturalne (m.in. N-metylację, znakowanie fluoroforami), a także metody oczyszczania i charakterystyki otrzymanych inhibitorów. W części dotyczącej badań enzymatycznych Doktorantka dokładnie przedstawiła zastosowane materiały oraz procedury pozwalające na ocenę zdolności inhibitorów do hamowania aktywności enzymów, MT1, MT2 i furyny, w tym wyznaczanie parametrów kinetycznych (IC_{50} , K_m , K_i) oraz badania stabilności proteolitycznej otrzymanych związków. Niemniej, w omawianym fragmencie brakuje informacji na temat przeprowadzonej analizy statystycznej, co zostanie omówione w dalszej części niniejszej recenzji.

Analiza eksperymentalnej części rozprawy pozwoliła na weryfikację przydatności przyjętych metod badawczych do założonych celów pracy. Pani mgr Aleksandra Dorota Helbik-Maciejewska realizowała postawione cele badawcze z zastosowaniem szerokiego panelu metod z zakresu chemii medycznej i chemii peptydów, obejmujących syntezę oraz modyfikację strukturalną związków peptydowych. Metody te były w pełni wystarczające do realizacji założonych celów pracy i analizy wyników. Z opisu rozprawy wynika, że Doktorantka bardzo dobrze opanowała szereg technik eksperymentalnych z zakresu chemii peptydów, wykazując kompetencje w syntezie, projektowaniu i modyfikacji strukturalnej peptydów oraz w analizie uzyskanych wyników, a także zdobyła duże doświadczenie w planowaniu i prowadzeniu badań.

Dalej, Pani mgr Aleksandra Dorota Helbik-Maciejewska szczegółowo omówiła strategię i metody badawcze, wraz z opisem uzyskanych wyników i wniosków. Z części tej wynika, że Doktorantka zaprojektowała nowe analogi inhibitorów MT1, MT2 i furyny, z czego większość była cykliczna; część zawierała mostki disiarczkowe, triazolowe lub diselenidowe, a wybrane peptydy poddano znakowaniu fluorescencyjnemu i N-metylacji. Zaproponowane modyfikacje pozwoliły na uzyskanie związków skutecznie hamujących MT1; jeden z nich wykazał korzystną selektywność względem MT2. Na podstawie analiz enzymatycznych i symulacji dynamiki molekularnej (MD) potwierdzono, że różnice konformacyjne determinują efektywność wiązania do miejsca aktywnego enzymu, co posłużyło jako podstawa do dalszego projektowania i optymalizacji inhibitorów.

Badania struktura–aktywność, w tym skanowanie alaninowe, wskazały na istotną rolę reszt w obrębie pętli wiążącej, przy jednoczesnej możliwości modyfikacji regionów terminalnych. Redukcja długości peptydu umożliwiła uzyskanie krótszych analogów o zachowanej aktywności i poprawionej stabilności. Wykazano także współdziałanie wybranych reszt aminokwasowych w utrzymaniu aktywności oraz znaczenie mostka disiarczkowego dla funkcji inhibitora.

Część otrzymanych związków poddano badaniom biologicznym, potwierdzając ich potencjał jako sond fluorescencyjnych oraz kandydatów na leki przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe. Najaktywniejsze analogi wykazały wysoką aktywność wobec wirusa Zika, niską cytotoksyczność oraz selektywność działania.

Przeprowadzono również badania stabilności i degradacji inhibitorów w surowicy oraz analizy NMR, potwierdzające ich właściwości konformacyjne.

Dodatkowo, Doktorantka opracowała i zoptymalizowała skróconą metodę N-metylacji peptydów na nośniku stałym, redukując czas reakcji z 4 godzin do 40 minut przy zachowaniu wysokiej wydajności. Wykazała uniwersalność tej procedury dla wielu różnych aminokwasów N-końcowych (His, Ser, Trp, Tyr, Glu, Cys, Phe, Ala) oraz jej skuteczność w

syntezie wielokrotnie N-metylowanych peptydów, co potwierdza istotną wartość praktyczną N-metylacji w chemii peptydów.

Zaprezentowane wyniki prac badawczych, stanowią wyczerpujące opracowanie, dzięki czemu rozprawa stanowi bazę służącą dalszemu projektowaniu i syntezie nowych inhibitorów, oraz planowaniu dalszych badań *in vitro/in vivo*.

Rozdział „Conclusions” został opracowany w sposób przejrzysty i logiczny, z wyraźnym podziałem na główne wątki badawcze odpowiadające zakresowi pracy (inhibitory MT1, furyny oraz optymalizacja N-metylacji). Doktorantka w syntetyczny sposób podsumowała najważniejsze wyniki, jasno wskazując kluczowe elementy strukturalne warunkujące aktywność i selektywność inhibitorów, a także znaczenie przeprowadzonych modyfikacji dla poprawy ich właściwości biologicznych i aplikacyjnych. Wnioski te wnoszą istotny wkład w rozwój strategii projektowania selektywnych inhibitorów proteaz oraz metod modyfikacji peptydów.

Do obowiązków recenzenta należy nie tylko podkreślenie walorów pracy, ale również zwrócenie uwagi na dostrzeżone niedociągnięcia. Zauważone uwagi nie mają charakteru negatywnego i nie wpływają na moją pozytywną ocenę oraz wysoką jakość przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Stanowią one jedynie podstawę do konstruktywnej dyskusji podczas obrony rozprawy doktorskiej.

Moje zastrzeżenia dotyczą następujących elementów:

1. W pracy występują uchybienia redakcyjne, takie jak literówki (np.: strona 68: „in water an lyophilized”, „Than 50 µl inhibitor”), nadmierne/brakujące spacje (strona 70: „5mg”) oraz niekonsekwencje w zapisie (niespójność w stosowaniu wielkich i małych liter w nazwach rodzin inhibitorów no.: Bowman-Birk inhibitors vs. Bowman-Birk Inhibitors, or Sunflower trypsin inhibitor-1). Nie wpływają one istotnie na wartość merytoryczną rozprawy, jednak ich korekta poprawiłaby przejrzystość tekstu. Proszę nie odnosić się do nich podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej.
2. Użyte w anglojęzycznym tytule określenie „enzymatic studies” sugeruje szerszy zakres badań enzymologicznych niż przedstawiono w pracy. Z opisu badań wynika przede wszystkim ocena aktywności inhibitorowej otrzymanych związków wobec MT-1, MT-2 i furyny. W związku z tym warto rozważyć, czy termin „inhibitory activity studies” nie byłby bardziej adekwatny do rzeczywistego zakresu przeprowadzonych badań.
3. W mojej opinii część rycin (np.: Figure 38, 41, 45, itp.) oraz ich tytuły wymagają doprecyzowania, zarówno pod względem terminologicznym, jak i edytorskim. Uwaga dotyczy części pracy prezentującej wyniki oceny inhibicji enzymów. Prezentowane dane

dotyczą aktywności enzymu w obecności inhibitora, czyli efektu inhibicji. Z naukowego punktu widzenia bardziej właściwe byłoby stosowanie sformułowań odnoszących się do hamowania aktywności enzymatycznej lub aktywności enzymu w obecności inhibitorów. Zalecałabym w takich przypadkach ujednolicenie nomenklatury i konsekwentne podkreślenie, że analizowane jest działanie inhibicyjne peptydów (inhibitorów) na enzym („inhibitory activity”, „inhibition studies”, „inhibitory assays”, „evaluation of inhibitory potency”), a nie ich „aktywność” *sensu stricto*.

Ponadto, na części rycin brakuje opisu osi rzędnych, co utrudnia jednoznaczną interpretację danych (np. czy przedstawiono procentową aktywność enzymu, inhibicję, czy inne przekształcenie wyników).

Dodatkowo zwracam uwagę na brak informacji dotyczących analizy statystycznej, ponieważ nie wskazano zastosowanych testów statystycznych, liczby powtórzeń, ani poziomu istotności. Informacje te powinny być jednoznacznie przedstawione zarówno w opisach rycin, jak i, co szczególnie istotne, w części metodycznej, najlepiej w formie wydzielonego podrozdziału dotyczącego analizy statystycznej.

W przypadku rycin pochodzących z opublikowanych artykułów brakuje odniesień do źródeł w ich podpisach. Zgodnie z dobrą praktyką naukową należy umieścić stosowny odnośnik bibliograficzny bezpośrednio w tytule lub opisie rycin.

4. W pracy zauważalne są pewne nieścisłości dotyczące sposobu cytowania literatury oraz formułowania wniosków na jej podstawie.

- Ta sama publikacja została ujęta dwukrotnie w wykazie literatury (203 i 258)

- W zdaniu: “A comprehensive classification of proteases was introduced in 1993 by Rawlings and Barrett, who organized peptidases into clans and families” powinien zostać umieszczony odpowiedni odnośnik bibliograficzny, najprawdopodobniej pozycja [6], która powinna zostać przywołana już w tym miejscu tekstu. Konsekwentnie, we fragmencie “As mentioned in the Section 1., Barrett and Rawlings developed a revolutionary classification system for proteases” brakuje wskazania właściwych odniesień literaturowych (powinny zostać przytoczone pozycje [3–6]).

- Zwracam również uwagę na techniczne aspekty cytowania: w kilku miejscach (np. odnośniki [187], [209]) cytowanie zostało umieszczone na końcu akapitu zamiast przy konkretnym zdaniu, którego dotyczy.

- Strona 22, fragment “Although the precise physiological function of PRSS31 remains unclear, (...) modified animals exhibited increased resistance to chronic obstructive pulmonary disease and colitis.”, odwołanie do pracy Hansbro et al. zostało umieszczone dopiero w końcowej części zdania, podczas gdy przedstawione wcześniej informacje

również pochodzą z tej publikacji. W mojej opinii bardziej przejrzyste byłoby wprowadzenie cytowania już w pierwszym zdaniu, co jednoznacznie wskazywałoby na źródło wszystkich przytoczonych danych.

- Strona 25, fragment: „which indicated that prostasin is not required and involved in MT1 autoactivation”, nie jest jednoznaczne, czy oba zdania odnoszą się do tej samej publikacji (Su et al. [30]), co wymaga doprecyzowania.

- Strona 30, użyto sformułowania „Numerous studies have indicated...”, jednak nie zostało ono poparte odpowiednią liczbą odniesień bibliograficznych. W przypadku takich uogólnień konieczne jest wskazanie reprezentatywnych źródeł. W tym samym fragmencie warto również doprecyzować nazewnictwo genów (np. kursywa, małe litery w odniesieniu do genów zwierzęcych) oraz skorygować terminologię; poprawna nazwa BMPs to bone morphogenetic proteins.

- Analogiczne braki w zakresie cytowania występują w dalszej części pracy. Na str. 48 fragment dotyczący aktywności biologicznej inhibitorów (anti-inflammatory, anticoagulant, antithrombotic, anticancer) wymaga uzupełnienia o odpowiednie odniesienia do literatury. Szczególnie stwierdzenia odnoszące się do działania w organizmie człowieka powinny być poparte źródłami.

- Strona 49, opis inhibitora SFTI-1 również powinien zostać uzupełniony o cytowanie; jeśli dane te pochodzą z pozycji [173], odnośnik ten należy umieścić bezpośrednio na końcu zdania, którego dotyczy.

- Strona 51: ”Interestingly, one of its shortest analogs, i.e. HV-BBI (4-16) (Figure 13C), (...) that peptide was also examined toward bovine β -trypsin (K_i = 151 nM) and human plasmin (K_i = 120 nM).”- Fragment wymaga uzupełnienia o odpowiednie odnośniki. Sugeruję doprecyzowanie źródła danych dotyczących wartości K_i .

5. W zdaniu: ”This strictly hierarchical division categorizes proteins into species, families and clans.” (str.17)- baza danych, o której mowa (np. MEROPS), dotyczy peptydaz (proteases) i ich substratów i inhibitorów. A więc klasyfikacja odnosi się do enzymów proteolitycznych, nie do wszystkich białek, wobec czego zamiast „proteins” powinno być ”proteases”.
6. W pracy chemicznej dopuszczalne jest stosowanie standardowych skrótów aminokwasów (np. Lys, Ala) bez konieczności ich rozwijania, jednak wskazane jest zachowanie konsekwencji stylistycznej w całym tekście. Co więcej, warto rozważyć zastosowanie standardowych skrótów dla cytruliny (Cit) i ornityny (Orn), aby zachować spójność z używanymi w zdaniu skrótami aminokwasów (Arg, Lys, Ile, Phe)- Strona 53.

7. W tekście użyto pojęcia „prM/E ratio” (Strona 55) bez jego wcześniejszego wyjaśnienia. Wskazane jest doprecyzowanie, że odnosi się ono do stosunku białka prekursorowego prM do białka otoczki E i stanowi wskaźnik dojrzewania wirusa.
8. 5% fetal bovine serum (FBS) buffer” → nieprecyzyjne sformułowanie (to nie jest bufor).

Niniejsze uwagi, mają charakter marginalny i w niczym nie umniejszają wartości naukowej recenzowanej rozprawy.

W trakcie lektury pracy doktorskiej nasunęły mi się również pewne pytania do dyskusji:

1. W rozdziale “6.5. Monitoring of peptide coupling and deprotection reactions” wspomniano, o teście Kaisera i chloranilowym. Jakie kryteria stosowano do rozróżnienia „slight blue coloration” od reakcji negatywnej? Czy była to ocena subiektywna, czy stosowano kontrolę odniesienia? Czy test chloranilowy był stosowany rutynowo po każdym etapie, czy tylko w przypadku wprowadzania amin II-rzędowych (np. Pro)? Czy wyniki uzyskane testem Kaisera i chloranilowym były zawsze zgodne? Jeśli nie, jak rozstrzygano rozbieżności?
2. W rozdziałach: “6.7.2.1. Confirmation of the presence of triazole bridge”, “6.7.2.1.1. Test with DTT”, i “6.7.2.1.2. Incubation with trypsin” mowa o testach pośrednio potwierdzających cyklizację i powstanie mostka triazolowego. Skoro ani MS, ani HPLC nie pozwalają potwierdzić cyklizacji, to dlaczego wybrano akurat test DTT i trawienie trypsyną jako metody weryfikacji? Jakie są ograniczenia testu DTT i trawienia trypsyną w kontekście jednoznacznego potwierdzenia cyklizacji? Czy mogą one prowadzić do błędnej interpretacji? Jakie są inne metody pozwalające na bardziej bezpośrednie rozróżnienie form liniowych i cyklicznych?
3. Dlaczego badania inhibicji przeprowadzono jedynie dla dwóch stężeń inhibitorów (str. 92, Fig. 38: 0,1 oraz 10 μ M; str.95, Fig. 41: 10 μ M and 100 nM)? Czy eksperymenty wykonano w powtórzeniach (technicznych i/lub biologicznych)? Czy bez pełnych krzywych inhibicji wnioski dotyczące siły działania i selektywności inhibitorów nie są ograniczone?
4. Dlaczego wybrano akurat linie U251 i A549 jako modele nadekspresji furyny? Czy Doktorantka może podać dane potwierdzające poziom ekspresji furyny w tych liniach?

5. Jakie są kolejne kroki niezbędne, aby potwierdzić potencjał terapeutyczny wyselekcjonowanych inhibitorów (np. modele *in vivo*, farmakokinetyka)? Jakie są główne wyzwania związane z potencjalnym zastosowaniem terapeutycznym tych peptydów (np. stabilność, biodostępność, degradacja proteolityczna)?”

Podsumowanie i wniosek końcowy

Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego opisanego w celach pracy, zawartość merytoryczna, przedstawienie wyników i ich wnikliwa analiza, świadczą o dużej wiedzy teoretycznej i praktycznej, oraz samodzielności i dojrzałości naukowej Doktorantki. Biorąc pod uwagę szeroki zakres badań, warto docenić nakład pracy włożony przez Doktorantkę w realizację planu. Badania zostały wykonane w ramach współpracy z wieloma ośrodkami badawczymi m.in. the Department of Pharmacology-Physiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada (badanie dynamiki molekularnej (MD) kompleksów peptydów z MT1, które pozwoliły na szczegółową analizę oddziaływań między inhibitorem a enzymem), the Laboratory of Recombinant Vaccines, the Laboratory of Virus Molecular Biology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdańsk and Medical University of Gdańsk (ocena aktywności przeciwwirusowej najaktywniejszych inhibitorów furyny wobec wirusa Zika (ZIKV)), the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Medical University of Warsaw (badania aktywności inhibitorów na wybranych liniach komórek nowotworowych (U251 – glejak, A549 – rak płuca) oraz na linii komórek prawidłowych (HEK293), co pozwoliło na ocenę ich potencjalnej selektywności i cytotoksyczności), the Laboratory of Biological NMR Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences (badania NMR).

Ważnym aspektem rozprawy doktorskiej jest fakt, że wyniki zawartych w niej badań zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, co istotnie podnosi wartość naukową przedstawionej pracy. Dorobek publikacyjny Doktorantki obejmuje artykuły opublikowane m.in. w *European Journal of Medicinal Chemistry*, *Journal of Organic Chemistry*, *ACS Medicinal Chemistry Letters* oraz *Molecules*, co świadczy o wysokiej jakości prowadzonych badań oraz ich znaczeniu dla rozwoju chemii medycznej i peptydów. Na uwagę zasługuje fakt, że wyniki badań nad inhibitorami furyny stały się podstawą zgłoszenia patentowego (Patent Office of the Republic of Poland, P.449419), co istotnie podnosi wartość aplikacyjną rozprawy. Ponadto Doktorantka, przygotowała manuskrypt, który został złożony do publikacji, to z kolei potwierdza ciągłość prowadzonych badań oraz ich aktualność. Należy również podkreślić, że uzyskane dotychczas wyniki stanowią solidną podstawę do kolejnych publikacji, które, jak można oczekiwać, będą sukcesywnie ukazywać się w przyszłości.

Warto zauważyć, że Doktorantka wykazuje znaczące doświadczenie badawcze, potwierdzone zarówno udziałem w projektach naukowych, jak i kierowaniem nimi. Obecnie pełni funkcję kierownika projektu NCN Preludium 23, a wcześniej realizowała kilka grantów dedykowanych młodym naukowcom (m.in. UGrants-start oraz BMN), co świadczy o dużej samodzielności badawczej i skuteczności w pozyskiwaniu finansowania. Brała również udział jako wykonawca w projekcie SONATA15.

Aktywność konferencyjna Doktorantki jest bardzo dobra i obejmuje liczne wystąpienia ustne i posterowe na konferencjach krajowych i międzynarodowych, w tym prestiżowym European Peptide Symposium. Na szczególne wyróżnienie zasługuje nagroda za najlepszą prezentację w obszarze nauk farmaceutycznych, co potwierdza wysoką jakość prezentowanych wyników oraz umiejętność ich komunikowania.

Podsumowując, dorobek publikacyjny i naukowy Doktorantki jest spójny tematycznie, ukierunkowany na aktualne i istotne zagadnienia z zakresu chemii peptydów i ich zastosowań biomedycznych, a także świadczy o jej dojrzałości badawczej, dużym zaangażowaniu oraz potencjale do dalszego rozwoju naukowego. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Doroty Helbik-Maciejewskiej zatytułowana „Design, chemical synthesis and enzymatic studies of transmembrane serine proteases inhibitors: matriptase-1, matriptase-2 and furin (Projektowanie, chemiczna synteza oraz ocena aktywności inhibitorów transmembranowych proteinaz serynowych: matryptazy-1, matryptazy-2 oraz furyny)” **spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim** określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” wraz z późniejszymi zmianami oraz w rozporządzeniach wykonawczych obowiązujących w tym zakresie. Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego **o dopuszczenie** Pani mgr Aleksandry Doroty Helbik-Maciejewskiej **do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**



Signed by /
Podpisano przez:

Renata Ewa
Perlikowska

Date / Data: 2026-
07-07 14:19

Podpis elektroniczny/certyfikat został usunięty podczas anonimizacji dokumentu.