



Politechnika Łódzka

Wydział Chemiczny

Łódź, 04. 10. 2019 r.

ul. Żeromskiego 116  
Prof. dr hab. inż. Aleksandra Olma  
e-mail: aleksandra.olma@p.lodz.pl

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Załuskiej

**PROJEKTOWANIE, SYNTEZA I BADANIE AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ PEPTYDÓW  
O WŁAŚCIWOŚCIACH PRO-REGENERACYJNYCH I NEUROPROTEKCYJNYCH**

Praca doktorska Pani mgr Izabeli Załuskiej została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, w Katedrze Biochemii Molekularnej, w Pracowni Chemii Związków Biologicznie Czynnych pod kierunkiem dr hab. Piotra Muchy, prof. UG. Rozprawa została zrealizowana w ramach projektu „Nowe technologie farmakologicznej stymulacji regeneracji” (REGENNOWA) współfinansowanego ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, realizowanego w ramach programu strategicznego „Profilaktyka i leczenie chorób cywilizacyjnych – STRATEGMED”.

REGENNOWA jest projektem interdyscyplinarnym kierowanym przez dr hab. Sylwię Rodziewicz-Motowidło, prof. UG, realizowanym przez siedem zespołów badawczych (Uniwersytet Gdański, Gdański Uniwersytet Medyczny, Politechnika Gdańska, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, MedVentures Sp. z o.o oraz Pro-Science Polska Sp. z o.o.).

Inżynieria tkankowa i medycyna regeneracyjna to szybko rozwijające się dziedziny nauk przyrodniczych o ogromnym potencjale terapeutycznym, mimo że, regeneracja narządów jest procesem nie w pełni poznany. Głównym jej celem jest naprawa, odtworzenie, regeneracja tkanek i narządów, które uległy uszkodzeniu w wyniku choroby, wady wrodzonej lub urazu, ale i procesu starzenia się organizmu. Postępy tych interdyscyplinarnych badań dają duże nadzieje pacjentom, dla których brakuje rozwiązań terapeutycznych.

Celem pracy mgr Załuskiej było zaprojektowanie, synteza peptydów lub peptydomimetyków o potencjalnej aktywności biologicznej w obszarze regeneracji skóry lub neuroprotekcji, określenie potencjału pro-proliferacyjnego otrzymanych związków na liniach nieśmiertelnych fibroblastów i keranocytów oraz wpływu na żywotność i migrację jak również zbadanie ich cytotoksyczności.

 **DZIEKANAT**  
Wydziału Chemii UG

1

Wpłynęło dn. 08. 10. 2019

L.dz. 8010-WCh/KC-2389/19



Wydział Chemiczny

90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116, budynek A27

tel. 42 631 31 00, fax 42 636 14 84, e-mail: deanchem@adm.p.lodz.pl, www.p.lodz.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Doktorantka zaplanowała również badania *in vivo* potencjału proregenerującego wybranych związków w modelu uszkodzenia małżowiny usznej u myszy Balb/c oraz potencjału neuroprotekcijnego w modelu uszkodzeń neurobiologicznych *in vitro*. Badania aktywności zostały wykonane we współpracy z dr hab. med. Michałem Pikułą z Pracowni Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej Zakładu Embriologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,.

Praca licząca 165 stron zawiera Wstęp, Część literaturową zatytułowaną „Wprowadzenie”, Cel pracy, Syntezę związków o właściwościach pro-regeneracyjnych i neuroprotekcyjnych, Badania biologiczne-wstęp literaturowy, Badania biologiczne *in vitro* i *in vivo* - metodologia, Badania biologiczne - omówienie wyników, Podsumowanie i wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Literaturę (227 odnośników).

Część literaturowa (49 stron) wprowadza czytelnika w tematykę związaną ze zdolnością do regeneracji, cechą charakterystyczną dla różnych organizmów oraz przedstawia terapie, które są stosowane do regeneracji tkanek. Doktorantka omówiła procesy regeneracyjne u zwierząt, rodzaje urazów skóry i związki wspomagające gojenie ran, w tym peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej, angiopoetyno-podobny czynnik wzrostu, tymozynę  $\beta$ , tripeptyd GHK, oraz N-Pht-Trp - nienukleozydowy inhibitor metylotransferazy DNA. Dalszą część poświęciła neuroprotekcji ośrodkowego układu nerwowego, mechanicznym uszkodzeniom neurologicznym oraz w wyniku udaru (niedokrwiennego lub krwotocznego). Wśród strategii terapeutycznych ona omówiła najczęściej stosowane leki, w tym peptydy neuroprotekcyjne oraz ich koniugaty z peptydami penetrującymi do komórek (CPP). Ostatnia część przeglądu literaturowego poświęcona jest celom farmakologicznej stymulacji procesów regeneracji. Mgr Załuska dokonała subiektywnego wyboru przykładów z bardzo obszernej literatury, szkoda, że na 227 odnośników tylko 6 obejmuje badania opublikowane w 2018 roku, natomiast brak jest najnowszych doniesień. Celem jaki sobie postawiła mgr Załuska w swoich badaniach własnych było zaprojektowanie 15 peptydów o potencjalnych właściwościach proregeneracyjnych. Syntezę peptydów przeprowadziła według strategii Fmoc/Boc, na nośniku polimerowym. Zastosowała żywice pozwalające otrzymać amidy peptydów - TantaGel® S Ram lub Fmoc-Rink Amide AM. Wydaje się zbędne umieszczanie w pracy doktorskiej opisu podstaw syntezy na fazie stałej (strona 64). Krótkie peptydy (3-9 reszt) doktorantka otrzymała manualnie, a do syntezy dłuższych sekwencji wykorzystowała automatyczny syntezytor peptydów. Wszystkie peptydy zostały oczyszczone i scharakteryzowane oraz przeprowadzone w chlorki, a następnie ich roztwory poddane sterylizacji, co było konieczne dla badań biologicznych. Doktorantka podjęła również próbę

syntezy zaplanowanego dendrymeru Dend(RGD)<sub>3</sub>, koniugatu N<sub>3</sub>AcRGD-NH<sub>2</sub> z tripropargiloaminą z wykorzystaniem katalizowanej jonami miedzi(I) 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena, tzw. „reakcji klik”. Wykorzystała dwie procedury, różniące się sposobem generowania Cu(I), ale żadna nie dała oczekiwanego produktu, mono- i dipodstawiona pochodna zostały otrzymane jedynie w śladowych ilościach, które wystarczyły do przeprowadzenia analizy (RP-HPLC i ESI-MS).

Wśród peptydów o potencjalnej aktywności proregeneracyjnej w uszkodzeniach skóry doktorantka zaprojektowała nanopeptyd AGF9 (TSRGDHEEL-NH<sub>2</sub>), fragment 338-346 białka AGF (angiopoetyno-podobnego czynnika wzrostu), jak również jego analog, 27-peptyd AGF27, wydłużony na N- i C-końcu, będący fragmentem 330-356 białka AGF. Otrzymała również amid RGD, najczęstszy motyw peptydowy odpowiedzialny za adhezję komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej oraz serię peptydów zawierających sekwencję RGD i jej wielokrotne powtórzenia, wśród nich amidy AcRGD1, RGD3 AcRGD3 RGD2 i RGD4. Do badań nad neuroprotekcją w modelu udaru mózgu mgr Załuska zsyntetyzowała fragment białka ADNP, amid heptapeptydu NAP, który wykazuje aktywność neuroprotekcijną w bardzo niskich stężeniach. W dalszej części pracy skupiła się na syntezie peptydów z grupy CPP (peptyd PTD4 i jego koniugat PTD4-NAP). Kontynuując badania nad peptydami o charakterze zasadowym penetrującymi do komórek oraz mózgu, syntetyzowała amid peptydu Tat, fragment białka Tat HIV-1 oraz jego analog zawierający resztę propynoilową na N-końcu.

Otrzymane 14 peptydów, handlowo dostępny RGD10-PM oraz N-Pht-Trp (RG108) zostały poddane szerokim badaniom biologicznym *in vitro* i *in vivo*, które obejmowały cytotoksyczność oraz proliferację keratynocytów i fibroblastów. Badania te były przeprowadzone we współpracy z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym. Omówienie wyników badań biologicznych doktorantka poprzedziła wstępem literaturowym oraz przedstawieniem metodologii wykorzystanych w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Peptydy AGF9, AGF27, RGD1 oraz jego analogi o zwielokrotnionej sekwencji wykazują efekt proliferacyjny do 30%, dla wybranych linii komórkowych. Nie zaobserwowano natomiast takiego efektu dla AGF9 w badaniach *in vitro* (model uszkodzenia małżowiny usznej u myszy). Wykazano również, że wszystkie peptydy z serii RGD wykazały właściwości ochronne w wieloczynnikowym modelu uszkodzenia neurologicznego i co ważne, nie wykazały istotnej toksyczności w zakresie stężeń 1,0-100,0 μM/ml. Doktorantka podjęła się przeprowadzenia korelacji pomiędzy strukturą a aktywnością neuroprotekcijną peptydów z motywem RGD. Badanie peptydów RGD na właściwości neuroprotekcyjne w modelu uszkodzenia neurologicznego (peptydy RGD2, RGD3, RGD4, AcRGD1, AcRGD3 i RGD10PM) nie dało jednoznacznej odpowiedzi o wpływie wielokrotności fragmentu RGD na aktywność. Zbadano aktywność (Tat(49-57)-NH<sub>2</sub>, PTD4, propTat, NAP oraz PTD4-NAP w wieloczynnikowym

modelu udaru mózgu *in vitro*. Dla wybranych peptydów przeprowadzono analizę stabilności w osoczu krwi metodą elektroforezy kapilarnej.

Mgr Izabela Załuska wykazała się dojrzałością w projektowaniu związków do badań, biegłością warsztatową, zarówno jeśli chodzi o syntezę peptydów na fazie stałej, reakcję klik, metody chromatograficzne oczyszczania peptydów oraz potwierdzenia struktury związków za pomocą spektrometrii mas jak również umiejętnością interpretacji wyników badań biologicznych.

Praca napisana jest logicznie, poprawnym językiem, jednak korekta pracy powinna być przeprowadzona z większą starannością, co zredukowałoby liczne błędy literowe.

Z obowiązku recenzenta przedstawię kilka wybranych pomyłek/niejasności:

- Nie znalazłam w pracy porównania uzyskanych wyników badań biologicznych do wcześniej opublikowanych lub stosowanych związków pro-regeneracyjnych i neuroprotektynowych. Liczę na komentarz w czasie obrony.
- Oba zapisy „N- i C-” lub „N- i C-” są poprawne, ale należy wybrać jeden i stosować konsekwentnie w całej pracy, a nie jak na str. 65 N,N'-Diizopropylkarbodiimid/N-hydroksybenzotriazol. Podobnie *in vivo* i *in vitro* powinno być pisane kursywą, a nie dość dowolnie jak np. na str. 106.
- „W dzisiejszych czasach szereg terapeutycznych peptydów i białek wytwarza się technikami rekombinacji, niemniej jednak zostały zaobserwowane immunologiczne niezgodności leków pochodzących od zwierząt” – proszę o wyjaśnienie sensu tego zdania (str. 30).
- Opis podstaw syntezy peptydów na nośniku stałym w pracy doktorskiej nie jest konieczny.
- Niejasny jest opis podziału żywicy w tabeli 4 (str. 69).
- W jaki sposób zostały odmierzone objętości z tak wysoką dokładnością np. 187,44  $\mu\text{l}$  (str. 70).
- Zbyt szczegółowe opisy procedur np. synteza kwasu 2-azydooctowego (str. 72). Zawiera ona również błąd w opisie („wykonałam ekstrakcję, 3 x 50 ml, z eteru etylowego” zamiast eterem etylowym, czy schłodziłam do 0°C w łaźni wodnej).
- Błędne numery stron w tekście np. (str. 70) – „według procedury opisanej w punkcie 1.2.1 str. 70 a powinno być 72, czy (str. 114) - „zastosowano taki sam model uszkodzenia neurologicznego jak w punkcie 8 (str. 109 a powinno być str. 111) i 10 (str. 111 zamiast 113). Wystarczyło podać numery rozdziałów i punktów, żeby uniknąć błędów.
- W rozdziale „Badania biologiczne – omówienie wyników” autorka używa formy bezosobowej natomiast w „Podsumowaniu i wnioskach” te same badania w pierwszej osobie. Proszę o wyjaśnienie, w których badaniach brała udział.

Wymienione uwagi nie pomniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy, doktorantka dobrze zaplanowała i zrealizowała zadania badawcze.

Całkowity dorobek naukowy mgr Załuskiej obejmuje jedną, wieloautorską publikację, które nie wchodzi tematycznie z zakres rozprawy doktorskiej (*Lett. Org. Chem.* **2018**; 15, 282-289, IF 0,594). Mgr Załuska jest także współautorką 25 komunikatów na krajowych konferencjach.

W podsumowaniu stwierdzam, że:

- Temat podjęty przez doktorantkę jest z punktu widzenia naukowego i aplikacyjnego wysoce aktualny.
- Doktorantka dobrze zaplanowała swoje badania i wykazała się dojrzałym podejściem do realizowanego tematu oraz interpretacji otrzymanych wyników.
- Przedstawione badania mają charakter wstępny i stanowi podstawę do podjęcia dalszych prac, nad znalezieniem związków o potencjalnej aktywności proregeneracyjnej w uszkodzeniach skóry oraz o właściwościach neuroprotektoryjnych.
- Przeprowadzone interdyscyplinarne badania w ramach projektu „Nowe technologie farmakologicznej stymulacji regeneracji” mogą się przyczynić do opracowania nowych rozwiązań terapeutycznych w zakresie medycyny regeneracyjnej, które można wykorzystać do regeneracji uszkodzonych tkanek.

Na tej podstawie stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja mgr Izabeli Załuskiej pt. „Projektowanie, synteza i badanie aktywności biologicznej peptydów o właściwościach proregeneracyjnych i neuroprotektoryjnych” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Izabeli Załuskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Alexandre Olma