

Prof. dr hab. Zbigniew Szewczuk
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel.: +48-71-3757212
e-mail: zbigniew.szewczuk@chem.uni.wroc.pl

Wrocław, 2019-10-31

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Załuskiej
zatytułowanej „Projektowanie, synteza i badania aktywności
biologicznej peptydów o właściwościach
pro-regeneracyjnych i neuroprotektoryjnych”**

Podstawowym zadaniem medycyny regeneracyjnej jest wspomaganie procesu gojenia, odtwarzania się oraz naprawy uszkodzonych tkanek i komórek. W wielu ośrodkach akademickich i farmaceutycznych prowadzi się intensywne badania nad farmakologiczną stymulacją regeneracji, której celem jest pobudzanie zdolności organizmu do naprawy jego uszkodzonych części. Racjonalne projektowanie nowych leków pro-regeneracyjnych i neuroprotektoryjnych wymaga zrozumienia molekularnych podstaw procesu regeneracji w żywych organizmach, a w szczególności u ssaków.

Pani mgr Izabela Załuska włączyła się w nurt tych badań i pod kierunkiem dr hab. Piotra Muchy, prof. UG wykonała pracę doktorską dotyczącą projektowania, syntezy i aktywności biologicznej peptydów o właściwościach proregeneracyjnych i neuroprotektoryjnych. Niewątpliwie tematyka badawcza przedstawiona w pracy doktorskiej mgr Izabeli Załuskiej jest aktualna i ciekawa zarówno z naukowego jak i użytecznego punktu widzenia. Praca doktorska została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Pracowni Chemii Związków Biologicznie Czynnych Katedry Biochemii Molekularnej.

Rozprawa doktorska mgr Izabeli Załuskiej zawiera 165 stron i składa się ze *Wstępu* (2 strony) i siedmiu rozdziałów: *Wprowadzenia* (rozdział I, 49 stron) i *Celu pracy* (rozdział II, 5 stron). Badania własne Doktorantka przedstawiła w rozdziale III *Synteza związków o właściwościach pro-regeneracyjnych i neuroprotektoryjnych* (22 strony). Natomiast badania biologiczne zostały przedstawione w trzech rozdziałach: IV.

Badania biologiczne – wstęp literaturowy (4 strony), **V. *Badania biologiczne in vitro i in vivo – metodologia*** (9 stron) i **VI. *Badania biologiczne – omówienie wyników*** (28 stron). Rozprawę kończy rozdział **VII. *Podsumowanie i wnioski*** (6 stron), *Streszczenia pracy* w języku polskim i angielskim oraz *Literatura* (227 pozycji). Rozprawa zawiera również *Wykaz stosowanych skrótów*, oraz *Spis publikacji*.

W pracy zachowana jest właściwa proporcja między częścią literaturową i częścią badawczą. Wprawdzie układ pracy doktorskiej mgr Izabeli Załuskiej i struktury podziału treści należy uznać za prawidłowe, lecz w mojej opinii Doktorantka poświęciła zbyt dużo miejsca opisowi badań biologicznych, które zostały przeprowadzone przez innych naukowców.

We *Wstępie* Autorka zamieściła podstawowe informacje o procesach regeneracyjnych u zwierząt. Następnie omówiła peptydy i inne związki wspomagające gojenie ran. Dużo uwagi poświęciła uszkodzeniom ośrodkowego układu nerwowego oraz terapiom neuroprotekcijnym, za szczególnym uwzględnieniem możliwości zastosowania peptydów neuroprotekcyjnych. Rozdział ten zawiera wiele starannie dobranych informacji naukowych i świadczy o dużej wiedzy Doktorantki na temat związków chemicznych stymulujących procesy regeneracji oraz o umiejętności prawidłowego korzystania ze źródeł literaturowych. Tekst tego rozdziału został napisany językiem prostym, przez co będzie zrozumiały dla szerokiego grona czytelników. Wysoko oceniam tą część rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Załuskiej. Rozdział ten zawiera wszystkie informacje niezbędne do wyjaśnienia celu pracy.

Celem ogólnym recenzowanej pracy doktorskiej było zaprojektowanie w oparciu o literaturę naukową i przeprowadzenie syntezy peptydów wykazujących potencjalną aktywność proregeneracyjną i neuroprotekcją wraz z charakterystyką otrzymanych związków za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekłowej oraz spektrometrii mas i oceną ich stabilności w roztworach wodnych i osoczu krwi. W mojej opinii problem badawczy, którego rozwiązania podjęła się Doktorantka, został poprawnie sformułowany a metody badawcze zostały trafnie dobrane.

Wybrane peptydy zostały poddane odpowiednim testom biologicznym mającym na celu zbadanie ich wpływu na proliferację, żywotność i migrację, a także potencjału proliferacyjnego na liniach unieśmiertelnionych fibroblastów i keratynocytów. Przeprowadzono również badania *in vivo* aby zbadać potencjał proregenerujący wybranych związków w modelu uszkodzenia małżowiny usznej u myszy Balb/c. Ponadto wykonano badania potencjału neuroprotekcijnego wybranych związków w modelu uszkodzeń neurobiologicznych *in vitro* oraz wykonaniu testów przeżywalności pierwotnej hodowli neuralnej pod wpływem wybranych związków.

Z kolejnych rozdziałów wynika, że badania zostały prawidłowo przeprowadzone, i dobrze opisane. Stosując syntezę na nośniku stałym Doktorantka zsyntezowała 14 racjonalnie zaprojektowanych polipeptydów. Większość z tych peptydów zawierała sekwencję RGD odpowiedzialną między innymi za procesy adhezji komórkowej związane z remodelowaniem podczas różnicowania tkanek lub sekwencji fragmentu białka TAT(49-57) i jego analogów. Przeprowadziła też wstępne próby otrzymania nieliniowego dendrymeru zawierającego trzy sekwencje RGD powstałego w wyniku reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji pomiędzy tri-propargiloaminą i N_3 -AcRGD-NH₂. Ponadto zsyntezowała *N*-ftaloilo-L-tryptofan.

Budowa chemiczna zsyntezowanych peptydów została potwierdzona za pomocą spektrometrii mas, a czystość za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Do badań biologicznych Autorka przekazała sterylizowane peptydy, w których aniony trifluorooctowe zostały wymienione na chlorkowe. Doktorantka sprawdziła stabilność zsyntezowanych peptydów w wodzie i osoczu krwi, co pozwoliło na wyciągnięcie wniosków dotyczących ich trwałości w warunkach testów biologicznych. Opis przeprowadzonych syntez był bardzo dokładny, chociaż momentami zbyt szczegółowy. Miejscami przypominał instrukcje do ćwiczeń laboratoryjnych dla niedoświadczonych studentów. Przykładem może być opis syntezy kwasu 2-azydooctowego zawierający informacje nieprzydatne dla przeciętnego specjalisty: *"Kolbę z roztworem z umieszczonym termometrem wstawiłam do łaźni wodnej aż mieszanina ochłodziła się do 0°C. Następnie powoli dodawałam do mieszaniny 7,15 g kwasu 2-bromoocetowego. Kolbę z roztworem zdjęłam z łaźni wodnej aby powoli roztwór uzyskał temperaturę pokojową i przy użyciu kwasu solnego doprowadziłam pH roztworu do 1 – 2, sprawdzając jego*

wartość papierkiem wskaźnikowym. Następnie mieszaninę zostawiłam na 24 godziny na mieszadle magnetycznym."

Zsyntezowane peptydy zostały przekazane dr. hab. med. Michałowi Pikule z Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, dr hab. Arkadiuszowi Piotrowskiemu prof. nadzw. GUM z Katedry Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, dr. hab. inż. Pawłowi Sachadynowi z Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, w celu przeprowadzenia odpowiednich testów biologicznych. Z recenzowanej rozprawy wynika, wszystkie badania biologiczne zostały zaprojektowane i przeprowadzone przez wyżej wymienionych badaczy i ich współpracowników. Doktorantka nie uczestniczyła bezpośrednio w tych badaniach więc metodologia tych badań nie wymaga mojej oceny.

Autorka przedstawiła uzyskane wyniki badań biologicznych w tabelach i wykresach. Prawidłowo je zinterpretowała i wyciągnęła ciekawe wnioski. Do najciekawszych wyników tych badań zaliczyć należy odkrycie podobnych właściwości neuroprotektynnych peptydu Tat(49-57)-NH₂ i jego analogu PTD4, w którym podstawiono trzy reszty Arg (52,55 i 57) i dwie reszty Lys (50,51) na reszty Ala. Oznacza to, że zasadowe reszty aminokwasowe fragmentu białka Tat nie są niezbędne dla zachowania aktywności neuroprotektynnej i mogą być z powodzeniem zastąpione innymi resztami. Z dużym uznaniem odnoszę się do tego odkrycia i uważam, że sekwencja peptydu PTD4 może posłużyć jako struktura wiodąca do poszukiwania nowej klasy neuroprotektantów w leczeniu skutków udaru niedokrwiennego.

Nie mniej ciekawe wyniki uzyskano badając wpływ *N*-ftaloilo-L-tryptofanu (inhibitora metylotransferaz DNA, RG108) na gojenie się uszkodzonej małżowiny usznej u myszy Balb/c. Okazało się, że niewielkie stężenie tego związku (rzędu 10 mg/kg) powoduje zmniejszenie się powierzchni otworu małżowiny usznej o ok. 63% po 35 dniach.

Na str. 142 Doktorantka stwierdziła: "*Do badań nad zastosowaniem motywu RGD jako neuroprotektanta włączyłam również peptyd RGDI. Dla sekwencji RGDI uzyskano najciekawsze wyniki i z powodu planowania ich publikacji w prestiżowym*

czasopiśmie, na żądanie jednego z konsorcjantów zostały one wyłączone z dysertacji." Takie stanowisko Autorki, a zwłaszcza Konsorcjanta, jest dla mnie zaskakujące, lecz z drugiej strony pozwala przypuszczać, że Doktorantka dysponuje jeszcze ciekawszymi wynikami badań nad swoimi substancjami, których z niezrozumiałych dla mnie powodów nie mogła przedstawić w swojej dysertacji.

W mojej opinii, uzyskane wyniki wykonanych badań są wartościowe i oryginalne, a cel pracy został osiągnięty. Autorka wykazała się krytycznym sposobem interpretowania rezultatów badań i ostrożnym wyciąganiem wniosków, co świadczy o Jej dojrzałości badawczej. Należy podkreślić, że część z wyników prac badawczych uzyskanych przez Autorkę została już opublikowana w czasopiśmie *Letters of Organic Chemistry* i przedstawiona w dwudziestu pięciu komunikatach konferencyjnych.

Rozprawa została napisana poprawnym językiem. Na pochwałę zasługuje jej estetyczny wygląd. Znalazłem stosunkowo niewiele drobnych błędów literowych i nietrafnych sformułowań. W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka uwag i wątpliwości. Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej niektóre z nich:

- Str. 65. Nazwa N,N'-diizopropylotetyloamina jest niepoprawna.
- Str. 66. Doktorantka stosowała różne zastawy chromatograficzne, różne rodzaje i wymiary kolumn chromatograficznych oraz różne spektrometry mas. Proszę o wyjaśnienie celu stosowania różnych kolumn do analizy czystości otrzymanych peptydów, a konkretnie, czym podyktowany był wybór producenta określonej kolumny do rozwiązywania konkretnego problemu naukowego. Dlaczego Doktorantka używała różnych spektrometrów mas, a w szczególności różnych metod jonizacji próbki do analizy mas cząsteczkowych otrzymanych związków chemicznych?
- Str. 69. Autorka pisze: "*Niektóre peptydy, przedstawione w poniższej tabeli zostały zsyntezowane manualnie ze względu na wcześniejsze niepowodzenia w syntezie za pomocą automatycznego syntezyzatora*". Proszę o wyjaśnienie ewentualnych przyczyn niepowodzeń syntezy peptydów za pomocą automatycznego syntezyzatora.

- Str. 77. Jediną eksperymentalną metodą potwierdzenia struktury otrzymanych substancji była spektrometria mas. Dlatego wątpliwości może budzić podana przez Autorkę duża różnica między obliczoną i obserwowaną wartością m/z dla *N*-ftaloilo-L-tryptofanu. Zalecam sprawdzenie obliczonej wartości $[M+H]^+$ dla tego związku chemicznego.
- Str. 86. Nie jest zrozumiałym wybór różnych metody oczyszczania dla takiego samego związku (AGF9), w zależności od tego czy był syntezowany "manualnie" czy za pomocą automatycznego syntezyzatora.
- Str. 99. Jak Autorka tłumaczy obecność dużej liczby pików w zakresie m/z 1480-1720 na widmie MS oczyszczonego peptydu propTat?

Powyższe uwagi i pytania nie podważają wartości merytorycznej rozprawy i nie wpływają na moją pozytywną ocenę tej pracy. Większość z moich uwag należy traktować jako zagajenie do dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej mgr Izabeli Załuskiej.

Biorąc pod uwagę istotne wyniki uzyskane przez Doktorantkę, dobre opanowanie syntezy i oczyszczania peptydów oraz interpretacji wyników badań biologicznych recenzowaną pracę doktorską oceniam pozytywnie. W moim przekonaniu rozprawa doktorska mgr Izabeli Załuskiej zatytułowana „Projektowanie, synteza i badania aktywności biologicznej peptydów o właściwościach pro regeneracyjnych i neuroprotektoryjnych” stanowi cenny wkład naukowy i spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie o stopniach i tytule naukowym. Dlatego stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Izabeli Załuskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

2. Jan 2011