

**WYDZIAŁ ODLEWNICTWA**

dr hab. Edyta Proniewicz, prof. AGH  
[proniewi@agh.edu.pl](mailto:proniewi@agh.edu.pl)

Kraków, dnia 28 lipca 2017 r.

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**mgr Moniki Lewandowskiej-Goch**

**nt.: „Projektowanie i chemiczna synteza inhibitorów furyny”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska zatytułowana „Projektowanie i chemiczna synteza inhibitorów furyny” została zrealizowana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Adama Prahla, Osoby o uznanej pozycji naukowej, w Katedrze Chemii Organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego – w jednej z najlepszych jednostek naukowo-badawczych w Polsce. Tematyka badawcza niniejszej rozprawy wpisuje się doskonale w nurt badawczy prowadzony przez grupę promotora pracy i obejmuje projektowanie, automatyczną syntezę chemiczną na nośniku stałym z wykorzystaniem metodologii Fmoc/tBu, oczyszczanie i analizę czystości przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz określenie typu inhibicji (parametry  $IC_{50}$  i  $K_i$ ) metodą spektrofluorymetryczną dla serii analogów inhibitora furyny, o sekwencji *Ac-RARRRKKRT-NH<sub>2</sub>*, modyfikowanych w pozycjach od 5 do 8 sekwencji łańcucha peptydowego kodowanymi i niekodowanymi resztami aminokwasowymi.

Przedmiot niniejszej dysertacji jest niezwykle interesujący i mieści się w jednym z głównych światowych nurtów badawczych mających na celu pogłębienie wiedzy na temat tkankowo-swoistej regulacji i przemiany konwertaz probiałkowych (ang. *proprotein convertases*, PCs), których przedstawicielem jest furyna, do aktywnych cząsteczek. Nieustające zainteresowanie konwertazami probiałkowymi wynika z faktu,



iż nadal posiadamy wiedzę niewystarczającą do kompleksowego zrozumienia różnorodnych konsekwencji wynikających z funkcji pełnionych przez te białka i nie potrafimy jednoznacznie zidentyfikować substratów tych białek. W tej sytuacji, badania nad projektowaniem i syntezą inhibitorów furyny pozwolą osiągnąć poziom informacji umożliwiający pełniejsze opisanie mechanizmów związanych ze złożonymi funkcjami fizjologicznymi tego peptydu w stanach chorobowych i bezchorobowych. O randze tematyki poruszanej w dysertacji może świadczyć także fakt ogromnego zainteresowania przemysłu farmaceutycznego i medycznego opracowaniem nowych generacji leków i nowoczesnych terapii ukierunkowanych na te enzymy. W tym względzie, zahamowanie aktywności furyny poprzez wykorzystanie efektywnych i selektywnych jej inhibitorów jest zagadnieniem kluczowym.

Badania naukowe przedstawione w w/w rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane z grantu nt.: „Synteza i analiza potencjalnych inhibitorów furyny jako pomoc w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych do walki z infekcjami bakteryjnymi i wirusowymi.” przyznanego w ramach konkursu PRELUDIUM 4 Narodowego Centrum Nauki (nr 2012/07/N/ST5/01998) oraz ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego (jakkolwiek, w tym miejscu została pominięta „metryka” środków, tj. nr grantu, umowa, itp.).

Dorobek naukowy Pani mgr Moniki Lewandowskiej-Goch jest udokumentowany jedną publikacją (A. Kwiatkowska, M. Lewandowska, L. Borovickova, J. Slaninova, B. Lammek, A. Prahl, Design, Synthesis and Structure–Activity Relationship of New Arginine Vasopressin Analogues Containing Proline Derivatives in Position 2. *Chem. Biol. Drug Des.* 2013, 81, 420–428), która ukazała się drukiem w czasopiśmie specjalistycznym, znajdującym się na liście Thomson Reuters Journal Citation Reports, o IF = 2,396 (dane z 2016/2017 r.). Dyskusję wyników otrzymanych Doktorantka nie podpira swoimi pracami, co sugeruje, iż wyniki dysertacji wkrótce zostaną opublikowane.

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Lewandowskiej-Goch została przygotowana zgodnie z wymaganiami ustawowymi, jak i zwyczajowymi stawianymi pracom doktorskim. Obejmuje ona 121 stron maszynopisu podzielonych na 10 rozdziałów (a nie 9 rozdziałów, co wynika z pominięcia rozdziału 4 oraz z podwójnej numeracji rozdziałów: WYKAZ RYSUNKÓW i WYKAZ TABEL (Roz. VII) oraz WYKAZ WYKRESÓW i WYKAZ HISTOGRAMÓW (Roz. VIII)) poprzedzonych spisem treści (3 str.) i wykazem skrótów stosowanych w pracy (3 str.), w którym niestety zostały pominięte niektóre objaśnienia, jak np. s, S, p czy P (wprowadzone w Tabeli 11 na str. 95). Praca została napisana w j. polskim zachowując klasyczny układ: PRZEGLĄD LITERATUROWY, CEL PRACY, BADANIA WŁASNE i PODSUMOWANIE WYNIKÓW. Rozprawa została opatrzona WYKAZAMI SCHEMATÓW, RYSUNKÓW, WYKRESÓW, HISTOGRAMÓW i TABEL oraz 218 pozycjami literaturowymi obejmującymi lata 1963 – 2015 oraz dwiema pozycjami z lat 1913 i 1925. Bibliografia została adekwatnie wybrana i uwzględnia dużą liczbę cytowań prac, które ukazały się w ostatnich kilku latach (zacytowano 12 prac z roku 2011, 5 prac z roku 2012, 4 prace z roku 2013, 3 prace z roku 2014 i 1 pracę z roku 2015).

Rozdział pierwszy dysertacji, PRZEGLĄD LITERATUROWY, stanowi około 36% objętości pracy (tj. 44 strony). Został on poświęcony szerokiemu i umiejętnie przedstawionemu obecnemu stanowi wiedzy na temat konwertaz probiałkowych, ich pochodzenia, podziału, struktury, specyficzności substratowej, roli biologicznej i zaangażowania w powstawanie i rozwój stanów patologicznych. Rozdział ten wprowadza recenzenta w obszar zagadnień realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej. Pomimo, iż został on przygotowany starannie czyta się go z pewną trudnością, co jest podyktowane zarówno tematem badań, jak również zapisem treści za pomocą zdań wielokrotnie złożonych podrzędnie i współrzędnie oraz nadmiernym stosowaniem zaimków dzierżawczych w miejsce podmiotu. Zamieszczona w tej części opracowania bogata i estetyczna szata graficzna w postaci schematów (w liczbie 4), rysunków (w liczbie 8) i tabel (w liczbie 2) wpływa nie tylko na pozytywny odbiór estetyczny, ale także ułatwia zrozumienie treści.

Rozdział drugi, CEL PRACY (4 str.) to jasno i precyzyjnie zdefiniowane zadania, jakie Doktorantka stawia przed sobą. Zwraca uwagę zadanie badawcze: „przekazanie przygotowanych peptydów do ośrodka współpracującego w celu wyznaczenia stałych inhibicji wobec furyny”, który jest niefortunnie sformułowany. Jest oczywistym, iż chodzi o badania kinetyczne zaplanowane do wykonania w kolejnym zadaniu.

Rozdział trzeci, BADANIA WŁASNE (45 str.), to najistotniejszy rozdział dysertacji, który został poświęcony opisowi wykonanych badań eksperymentalnych oraz analizie i dyskusji wyników. Rozdział ten w sposób logiczny i szczegółowy opisuje rozważnie zaplanowane i przeprowadzone eksperymenty, a sposób ich opisanie pozwoli na ich powtórzenie przez innych badaczy. W moim odczuciu zbędne w tej części pracy jest powielanie opisu preparatyki i pomiarów ponieważ procedury opisane, odpowiednio, w podrozdziałach: 1.1., 1.10. i 2.2. (synteza chemiczna, odszczepienie peptydów od nośnika i ich przygotowanie do oczyszczania), 1.2. i 2.3. (analiza otrzymanych peptydów), 1.3. i 2.3. (oczyszczanie surowych peptydów), 1.4., 1.11. i 2.4. (analiza oczyszczonych peptydów) oraz 1.6., 1.12. i 2.5 (badania kinetyczne) są takie same.

Wyniki badań zostały zaprezentowane w formie przykładowych chromatografów (w liczbie 2), histogramów (w liczbie 6) i tabel (w liczbie 11) podających charakterystykę fizykochemiczną zsyntezowanych analogów inhibitora *Ac-RARRRKKRT-NH<sub>2</sub>* furyny lub wyznaczone wartości stałej inhibicji furyny. Szkoda, że w tabelach 4, 7, 10 i 13 nie została wprowadzona dodatkowo wartość parametru IC<sub>50</sub>, z której biolodzy i biochemicy często korzystają. Na stronach 61 – 71 dysertacji została zamieszczona obszerna Tabela 3 przedstawiająca charakterystykę fizykochemiczną zsyntezowanych analogów inhibitora *Ac-RARRRKKRT-NH<sub>2</sub>* furyny wraz z ich oznaczeniem i wzorami sumarycznymi. Tabela ta zawiera również czterokrotnie powieloną strukturę inhibitora *Ac-RARRRKKRT-NH<sub>2</sub>* furyny z zaznaczonym każdorazowo innym miejscem modyfikacji. Tabela ta byłaby bardziej przejrzysta w formie czterech mniejszych Tabel z jedną strukturą inhibitora przedstawiającą wszystkie miejsca modyfikacji.

Przeprowadzona rzeczowa analiza wyników eksperymentalnych zasługuje na podkreślenie.

Mam jedynie drobne uwagi/zapytania, które pojawiły się w trakcie czytania dysertacji.

1. Czy obecnie nie jest zalecane używanie terminu „protonowana cząsteczka” lub zdeprotonowana cząsteczka” w miejsce określenia „jon pseudomolekularny”?
2. Czy w Tabeli 3 nie powinna pojawić się jednostka m/z zamiast M?
3. Brak jest podanej jednostki stałej  $K_i$  w Tabeli 4.
4. W podrozdziale 2.7., Projektowanie analogów, Doktorantka zaprojektowała cztery analogi inhibitora *Ac-RARRRKKRT-NH2* furyny zawierające w pozycji 5 sekwencji aminokwasowej łańcucha niekodowaną resztę kwasu L-2-aminomasłowego, a w pozycji 8 enancjomery seryny lub proliny. W celu określenia tych analogów zostały użyte te same oznaczenia uniemożliwiające rozróżnienie analogów zawierających izomery L- i D- seryny lub proliny (Tabela 11 na str. 95), co utrudnia analizę wyników podanych w Tabelach 12 i 13 oraz na histogramach 4 i 5.
5. Jaka jest czystość odczynników użytych do syntezy, oczyszczania i analizy tytułowych analogów?

Rozdział PODSUMOWANIE WYNIKÓW (2 str.) pełni pożyteczną i porządkującą rolę.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Lewandowskiej-Goch reprezentuje wysoki poziom naukowy i zawiera elementy nowości naukowej, a równocześnie świadczy o zdobytych przez Doktorantkę umiejętnościach i wiedzy, którymi powinien charakteryzować się doktor nauk chemicznych. Rozprawa niniejsza stanowi wartościowy wkład do chemii i biologii konwertaz probiałkowych.

W świetle powyższego uważam, że **praca doktorska Pani mgr Moniki Lewandowskiej-Goch spełnia wszystkie wymagania ustawowe określone w art. 13 Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 wraz z późniejszymi poprawkami z 2014 r.**

**(Dz. U. Poz. 1852) i tym samym stanowi podstawę nadania Jej stopnia naukowego doktora.** Jednocześnie, zwracam się do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Moniki Lewandowskiej-Goch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Andrzej Mielniczak*