



**POLITECHNIKA ŁÓDZKA**  
**INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ**

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,  
dr hab. Beata Kolesińska, prof. PŁ,  
tel: 42-631-31-49; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

**Recenzja**

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Katarzyny Sobocińskiej

Magister Małgorzata Katarzyna Sobocińska swoją rozprawę doktorską zatytułowaną „Synteza i badania biologiczne endogennych inhibitorów enkefalinaz i ich analogów jako potencjalnych substancji leczniczych w terapii nieswoistych chorób zapalnych jelit i bólu trzewnego” wykonała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Pracowni Chemii Makromolekuł Biologicznych, pod opieką dr hab. Elżbiety Kamysz, profesor UG.

Przedstawiona do recenzji praca posiada złożoną, wielopoziomową strukturę, poprawnie dostosowaną do osiągnięcia nadrzędnego celu badań realizowanych w grupie badawczej, który można określić jako projektowanie, synteza i badanie nowych peptydów/peptydomimetyków bądź ich koniugatów jako substancji o zróżnicowanej lub poprawionej względem natywnych odpowiedników aktywności biologicznej. Szczególnie intensywnie badaną grupą peptydów i ich analogów są peptydy opioidowe będące endogennymi ligandami receptorów opioidowych wiążących egzogenną morfinę. Do grupy peptydów opioidowych należą enkefaliny,  $\beta$ -endorfiny, dynorfiny oraz nocycetyna. Receptory opioidowe biorą udział w kaskadach sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za odczuwanie bólu, regulację funkcji motorycznych i psychofizycznych, modulację wydzielania noradrenaliny, wazopresyny, dynorfiny, dopaminy, hamowaniu wydzielania acetylocholin, kurczeniu się naczyń krwionośnych, hamowaniu relaksowania dolnego zwieracza przełyku, regulacji tempa pasażu treści pokarmowej, transportu płynów i elektrolitów, procesów zapalnych. Ponadto ekspresja receptorów opioidowych w komórkach naskórka oraz tkanki łącznej pełni rolę w różnicowaniu, namnażaniu i migracji komórek w procesie gojenia się ran. Receptory opioidowe zaangażowane są również w regulację: proliferacji, chemotaksji, apoptozy komórek odpornościowych (hamują produkcję przeciwciał oraz proliferację limfocytów B). Peptydy opioidowe są ważnym ogniwem pomiędzy układem neuroendokrynnym a immunologicznym. Z pełnym przekonaniem można więc wyrazić opinię o aktualności i o wysokiej randze tematyki podjętej w rozprawie.

Uzyskane wyniki badań zostały opisane w pracy liczącej 217 stron. Układ pracy, dostosowany do celu badawczego, jest standardowy i obejmuje osiem głównych rozdziałów: Przegląd literaturowy, Cel Pracy, Badania Własne, które zostały podzielone na Metodologię oraz Wyniki, Podsumowanie, Bibliografię, Spis Tabel oraz Spis Ilustracji. Wydaje mi się, że korzystne byłoby uzupełnienie rozprawy o Streszczenie pracy oraz Wykaz Dorobku Naukowego Doktorantki.

Część literaturową pracy stanowi 43 stronicowy zbiór krótkich opracowań przeglądów literaturowych, które stanowią wprowadzenia do kolejnych tematów badawczych rozwijanych w rozprawie, pozwalając na przybliżenie czytelnikowi meritum podjętych zagadnień badawczych. Obejmują one zagadnienia dotyczące:

- Charakterystyki i funkcji receptorów opioidowych,
- Endogennych peptydów opioidowych,
- Charakterystyce enzymów degradujących endogenne peptydy opioidowe,
- Endogennych inhibitorów enzymów rozkładających enkefalinę,
- Nieswoistych chorób zapalnych jelit, wraz z omówieniem, ich patogenyzy i strategii leczenia
- Bólowi, z uwzględnieniem funkcji bólu, jego fizjologii oraz przedstawieniem bólu trzewnego.

Dobór materiału literaturowego obejmuje aż 432 pozycje. Jest on głęboko przemyślany i prezentuje wszystkie najważniejsze publikacje, co pozwoliło na rzetelną i dogłębną prezentację stanu wiedzy. Na wyróżnienie zasługuje precyzja wyboru referowanych tekstów i zwięzłość wywodu, które pozwoliły na stworzenie wysoce przydatnych, skoncentrowanych opracowań multi-dyscyplinarnych. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymana jest spójność narracji dzięki starannemu doborowi referowanych publikacji i konsekwentnemu podporządkowaniu wszystkich części składowych nadrzędnemu celowi pracy. Pozwala to na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy. W przeglądzie literaturowym zabrakło mi informacji na temat danych literaturowych przedstawiających prace nad poszukiwaniem analogów inhibitorów enzymów rozkładających endogenne peptydy opioidowe. Proszę o ustosunkowanie się do tego zagadnienia w trakcie obrony.

Cel pracy został przedstawiony po wprowadzeniu literaturowym, co dodatkowo podkreśliło uzasadnienie dla wszystkich jego elementów składowych na tle współczesnego stanu badań. Podjęte zadanie badawcze obejmowały:

- synteza Leu- o Met-enkefalin, peptydowych endogennych inhibitorów enkefalinaz: sialorfiny, opiorfiny, spinorfiny oraz zaprojektowanie i otrzymanie puli nowych analogów inhibitorów enkefalin o zróżnicowanej długości i strukturze,
- zbadanie w warunkach *in vitro* wpływu sialorfiny, opiorfiny, spinorfiny oraz wszystkich otrzymanych analogów na degradację enkefalin zachodzącą pod wpływem enzymów degradujących enkefalinę (aminopeptydaza N, APN; neutralna endopeptydaza, NEP),
- ocena podatności wyselekcjonowanych peptydowych inhibitorów enkefalinaz na degradację w ludzkim osoczu i pod działaniem NEP w warunkach *in vitro*,
- modelowanie molekularne *in silico*, które powinno pozwolić na wyjaśnienie przyczyn aktywności inhibitorowej peptydowych inhibitorów enkefalinaz,
- ocenę użyteczności wyselekcjonowanych inhibitorów enkefalinaz w warunkach *in vivo* (badania na modelach zwierzęcych) w celu oceny możliwości ich zastosowania w leczeniu nieswoistych chorób zapalnych jelit (NChZJ) oraz bólu trzewnym.

W badaniach *in vivo* zarówno endogenne inhibitory enkefalinaz jak i ich syntetyczne analogii zostały przebadane pod kątem właściwości przeciwzapalnych w dwóch modelach zwierzęcych NChZJ: model TNBS, który pod względem objawów klinicznych oraz podłoża patologicznego zbliżony jest do choroby Leśnikowskiego-Crohna (ChL-C) u ludzi oraz model DSS, który pod względem objawów klinicznych oraz patogenezы odzwierciedla wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) u ludzi. W badaniach na myszach wykonano ocenę makroskopową stanu zapalnego dla obu modeli, ocenę mikroskopową w modelu ChL-C, oznaczenie aktywności mieloperosydazy tkankowej. Przeprowadzono również badania oceny poziomu ekspresji dwóch enzymów degradujących enkefalinę APN i NEP w próbkach biopsyjnych i surowicy pacjentów z ChL-C, WZJG oraz grupy kontrolnej, wyznaczając poziom mRNA obydwu białek oraz ich detekcję (technika western blot) i oznaczenie poziomu APN i NEP z wykorzystaniem testu ELISA.

W pierwszym etapie badań Doktorantka otrzymała enkefalinę leucynową, enkefalinę metioninową oraz endogenne inhibitory enkefalinaz sialorfinę, opiorfinę, spinorfinę. Zbadała wpływ endogennych inhibitorów na rozkład enkefalin przez dwie enkefalinazy: APN oraz NEP i stwierdziła, że we wszystkich przypadkach dodatek endogennego inhibitora enkefalinaz znacząco hamuje aktywność APN i NEP wydłużając czas rozkładu enkefalin. Zbadała również trwałość endogennych inhibitorów enkefalinaz w ludzkim osoczu, co pozwoliło wykazać, że spinorfina i sialorfina są znacznie bardziej odporne na działanie

enzymów osocza w porównaniu do opiorfiny. Na wysoką ocenę zasługują badania degradacji endogennych inhibitorów enkefalinaz za pomocą metody MALDI-TOF MS, dzięki czemu Doktorantka, była w stanie scharakteryzować główne produkty degradacji. Wybrane z zsyntezowanych endogennych peptydów (zarówno enkefaliny jak i sialorfina) wykorzystane zostały również w badaniach działania przeciwzapalnego w modelu ChL-C. Sialorfina przebadana została również w mysim modelu WZJG. Wszystkie zsyntezowane endogenne peptydy przetestowano również pod względem ich działania przeciwbólowego w mysim modelu bólu trzewnego metodą elektromiograficzną. Kolejne etapy badań obejmowały projektowanie, syntezę oraz badanie aktywności inhibitorowych względem APN i NEP puli analogów endogennych inhibitorów enkefalinaz. Pierwsza podgrupa nowych inhibitorów enkefalinaz stanowiła analogi endogennych inhibitorów enkefalinaz modyfikowane na drodze acetylowania *N*-końcowych reszt aminokwasowych i/lub amidowania *C*-końcowego aminokwasu oraz *N*-palmitynilowania z jednoczesnym dobudowywaniem dwóch reszt lizyny. W ramach tej podgrupy Doktorantka otrzymała 18 pochodnych endogennych inhibitorów enkefalinaz. Wybrane pochodne zostały wykorzystane w badaniach *in vivo* w mysim modelu ChL-C. Kolejną podgrupę analogów endogennych inhibitorów enkefalinaz stanowiły pochodne sialorfiny będące produktami skanu alaninowego (peptydy 19-23), pochodne stanowiące „odwrócone” sekwencje (tzw. retro peptydy) oraz układy hybrydowe powstałe w wyniku łączenia *N*- i *C*-końcowych fragmentów opiorfiny i sialorfiny (peptydy 24-30). Wszystkie otrzymane analogi przetestowane zostały pod kątem ich aktywności inhibitorowych względem APN i NEP. W kolejnym etapie badań Doktorantka zsyntezowała analogi sialorfiny o zmienionej budowie *N*-końcowej reszty aminokwasowej (pochodne 31-44). *N*-Terminalna reszta glutaminy natywnej sialorfiny została bądź usunięta bądź wymieniona na: piroglutaminian (pGlp), Asn, Thr, Phe, Ser, Tyr, His, Ile, Val, Lys, Leu, Arg, Orn. Peptydy 31-34 przetestowano pod kątem właściwości inhibitorowych enkefalinazy NEP. Do podgrupy tej zaliczyć również można analogi sialorfiny modyfikowane w pozycji pierwszej resztami aminokwasowymi o konfiguracji D (peptydy 45-50). Okazało się, że w przypadku peptydu 49 (D-Arg-His-Asn-Pro-Arg) zmiana konfiguracji z L na D zasadowej reszty *N*-terminalnej nie wpływa na aktywność inhibitorową. Otrzymany peptyd charakteryzował się nawet nieznacznie wyższą aktywnością w stosunku do natywnej sialorfiny. Obserwacja ta skłoniła Doktorantkę do otrzymania dwóch kolejnych pochodnych (peptydy 51 i 52), które są analogami sialorfiny zawierającymi na *N*- i/lub *C*-końcu resztę argininy o konfiguracji D. Kolejną grupę analogów natiwnych inhibitorów enkefalinaz stanowiły pochodne sialorfiny, spinorfiny i opiorfiny zawierające na *N*-końcu dodatkową

resztę cysteiny, co pozwoliło na otrzymanie puli homo-i heterodimerów (peptydy 53-68). Dimeryzacja peptydów pozwoliła na uzyskanie pochodnych bardzo aktywnych jako inhibitory enkefalinaz, które dodatkowo powodowały znaczący wzrost trwałości enkefalin. Wyselekcjonowany z tej puli peptyd 65 (heterodimer wywodzący się z sialorfiny oraz spinorfiny połączony mostkiem disulfidowym) został poddany badaniu stabilności w osoczu ludzkim oraz w badaniu *in vivo* w mysim modelu ChL-C. Ostatnią grupę analogów endogennej sialorfiny stanowiły pochodne zawierające zmienną ilość reszt lizyny na *N*-końcu oraz peptydy modyfikowane za pomocą kwasów tłuszczowych połączonych z natywnym peptydem poprzez dwie reszty lizyny (peptydy 69-74). Przeprowadzone badania nad aktywnością inhibitorową względem NEP pozwoliły na stwierdzenie, że większość z testowanych pochodnych wykazywała silniejszą aktywność inhibitorową w porównaniu do natywnej sialorfiny. Najbardziej aktywny peptyd 72 zawierający resztę kwasu sterynowego oraz dwie dodatkowe reszty lizyny zbadany został również w mysim modelu ChL-C.

Podsumowując, Doktorantka otrzymała 79 peptydów, które scharakteryzowała i poddała licznym testom z punktu sprawdzenia ich właściwości biologicznych, które obejmowały badania *in vitro*, *in vivo* oraz *in silico*. Dysertacja kończy się rozdziałem Podsumowanie, gdzie Doktorantka przedstawia w sposób spójny i czytelny wnioski płynące z wykonanych badań.

Lektura tekstu rozprawy uznaję za stymulującą do dalszej dyskusji i głębszych przemyśleń. Wśród pytań, które mi się nasunęły chciałabym postawić kilka następujących:

1. Jakie były przesłanki do stosowania testu chloranilowego do kontrolowania postępu sprzęgania oraz modyfikacji *N*-końcowych aminokwasów, w miejsce testu Kaisera lub TNBS, które to są zwykle rekomendowane dla amin pierwszorzędowych?
2. Jakie są zalety lub wady stosowania metody wyznaczania stopnia obsadzenie C-terminalnego aminokwasu w oparciu o różnice masy żywicy traktowanej pochodną aminokwasu? Dlaczego nie stosowano standardowej metody opartej o spektrofotometryczny pomiar ilości dibenzofulwenu, która jest rekomendowana metodą, czy Doktorantka nie obawiała się, że zastosowana przez nią metoda może być obarczona błędem w przypadku nie dokładnego odmycia żywicy (obecność depozytów).
3. Jaka była przesłanka do sprawdzenia warunków strącania białek z osocza dla badań nad peptydem 65? W tym przypadku Doktorantka przetestowała metodę z EtOH oraz 48% TFA.
4. Proszę o wyjaśnienie co to znaczy I i II partia NEP, czym różni się enzym?
5. Dlaczego nie wykonano badań nad wpływem ochronnym natywnych endogennych inhibitorów enkefalinaz na trwałość Met-enkefaliny w obecności APN?

Od strony edytorskiej rozprawa jest przygotowana bardzo starannie. Wszystkie rysunki i tabele zostały zredagowane jasno i czytelnie. W pracy nie ma w zasadzie literówek (strona 41 jest „pobuczenia” w miejsce pobudzenia, strona 47 jest „sferami skórnymi” a powinno być sferami skóry) oraz w kilku miejscach można znaleźć niepoprawny szyk zdania/zwrotu (strona 16 jest „niepodstawionego oligopeptydu amidu” powinno być niepodstawionego amidu oligopeptydu) czy też drobne błędy (strona 101, w górnej części rysunku jest TNBS, natomiast wszystkie schematy odnoszą się do modelu DSS). Autorka ustrzegła się stosowania sformułowań żargonowych oraz mało precyzyjnych określeń. Jedynym miejscem, który można byłoby poprawić, to unikanie powtórzeń. Dotyczy to każdorazowego omawiania procedury syntezy, oczyszczania oraz protokołów badań *in vivo* przy kolejno dyskutowanych grupach analogów natywnych inhibitorów enkefalinaz.

Powyższe fakty świadczą, że redakcja tekstu rozprawy znajduje się na poziomie powyżej progu wymagań standardowych. Dysertacja daje wyczerpujące i kompetentne odpowiedzi na szereg niezmiernie ważnych i aktualnych problemów badawczych. Dokumentuje w sposób bezsprzeczny, że racjonalne wprowadzanie zmian do cząsteczek natywnych biologicznie aktywnych peptydów pozwala na modulowanie właściwości biologicznych i rozszerzanie stanu wiedzy na temat danego problemu (badania zależności budowa - aktywność, SAR), ale również pozwala na uzyskanie znaczącej poprawy oczekiwanych właściwości obiektów, co skutkuje otwarciem drogi do zastosowań praktycznych. Niewątpliwie ważnym osiągnięciem było wykazanie, że sialorfina i opiorfina są silnymi inhibitorami APN oraz NEP, zaś spinorfina jest aktywna biologicznie wyłącznie względem APN. Skrupulatne i dogłębne badania natywnych inhibitorów enkefalinaz stanowiły swoiste sprawdzenie koncepcji badawczej nad swoistą ochroną enkefalin w obecności aktywnych inhibitorów enzymów degradujących peptydy opioidowe. Badania te pozwoliły na zaprojektowanie i otrzymanie puli analogów inhibitorów enkefalinaz o aktywności oraz użytkowych parametrach farmakologicznych przewyższających natywne peptydy. Do grupy wyselekcjonowanych inhibitorów enkefalinaz należą: Palm-Lys-Lys-Gln-His-Asn-Pro-Arg (peptyd 12), Palm-Lys-Lys-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg (peptyd 14), Lys-Lys-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg (peptyd 18), Ile-His-Asn-Pro-Arg (peptyd 39), Stear-Lys-Lys-Gln-His-Asn-Pro-Arg (peptyd 72), heterodimer 65 otrzymany z połączenia analogu sialorfiny oraz spinorfiny oraz heterodimer 67 otrzymany z analogu opiorfiny i spinorfiny. Dla wybranych analogów natywnych inhibitorów enkefalinaz wykonane zostały badania ich stabilności w ludzkim osoczu, Badania *in silico* natywnej sialorfiny oraz analogu opiorfiny (peptyd 18)

pozwoliły na wyselekcjonowanie pochodnych do badań *in vivo*. W grupie testowanych na myszach peptydów znalazły się peptydy 12, 14, 65 i 72.

Podsumowując, wysoko oceniam wybór ambitnego tematu badań, w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami prac o charakterze podstawowym jak i potencjale aplikacyjnym. Wysoce pozytywnie oceniam zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, trudny, interdyscyplinarny charakter wykonanych prac niezbędnych dla zrealizowania wszystkich zadań badawczych. Na szczególne uznanie zasługuje nie tak często spotykana biegłość zarówno w wykorzystywaniu szerokiego arsenału metod syntetycznych oraz sprawność w posługiwaniu się złożonymi, współczesnymi technikami analitycznymi, które to Doktorantka potrafiła zaimplementować w badaniach biologicznych. Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki. Wysoko oceniam postęp jaki recenzowana rozprawa wnosi w rozwój projektowania nowych pochodnych peptydowych celem poprawy ich właściwości biologicznych i użytkowych z punktu widzenia stosowania peptydów jako leków. Przeprowadzone badania dowiodły, że możliwe jest modulowanie poziomu endogennych enkefalin poprzez hamowanie aktywności enzymów odpowiedzialnych za ich degradację. Opracowane podejście może stanowić atrakcyjną alternatywę w stosunku do obecnie stosowanych terapii przeciwzapalnych. Ponadto wyniki badań wskazujące, że inhibitory enkefalinaz wykazują działanie przeciwbólowe sprawia, że możliwe staje się wykorzystanie enkefalinaz jako celu farmakologicznego. Uzyskane wyniki są niezwykle istotne zarówno w obszarze badań podstawowych ale też mogą stanowić punkt wyjścia do badań aplikacyjnych w odniesieniu do terapii chorób zapalnych oraz łagodzenia bólu.

Na podkreślenie zasługuje również dorobek publikacyjny mgr Małgorzaty Katarzyny Sobocińskiej. Obejmuje on 6 artykułów w czasopismach indeksowanych w JCR, dwóch artykułów przeglądowych. Wyniki prac badawczych Doktorantka prezentowała na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym (18 komunikatów).

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia z naddatkiem ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym z późn. zm. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Małgorzaty Katarzyny Sobocińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie dysertacji.

  
Beata Kolesińska