



INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski

01-224 Warszawa

ul. Kasprzaka 44/52

Tel. (22) 343 20 54

Fax.: (22) 632 66 81

E-mail: ryszard.ostaszewski@icho.edu.pl

Warszawa, 28.09. 2018

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Małgorzaty Katarzyny Sobocińskiej

z tytułu

„Synteza i badanie biologiczne endogennych inhibitorów enkefalinaz i ich analogów jako potencjalnych substancji leczniczych w terapii nieswoistych chorób zapalnych jelit i bólu trzewnego”

Poszukiwanie nowych substancji chemicznych posiadających wysoki potencjał terapeutyczny w terapii poszczególnych typów chorób jest celem naukowym o istotnym znaczeniu społecznym. Nowe metody diagnostyki medycznej, poszukiwanie nowych substancji leczniczych, tworzenie nowych lub implementacja znanych metod syntezy prowadzące do uzyskiwania związków o wysokiej aktywności biologicznej, staje się celem wielu projektów naukowych. I w tym nurcie badań znajduje się przesłana do recenzji praca doktorska mgr Małgorzaty Katarzyny Sobocińskiej.

Jako cel swojej pracy mgr Sobocińska stawia syntezę nowych peptydowych inhibitorów enkefalinaz jako analogów naturalnych inhibitorów aminopeptydazy N oraz neutralnej endopeptydazy. Jej badania mają obejmować także syntezę dwóch pochodnych enkefalin; syntezę sialorfiny, opiorfiny i spinorfiny. Stabilność tych peptydów miała być sprawdzona w warunkach *in vitro* wraz z oceną ich przydatności jako inhibitorów enzymów degradujących enkefaliny. Synteza nowych inhibitorów enkefalinaz miała być wspomagana metodami modelowania molekularnego. Ponadto mgr Sobocińska postanowiła wytypować związki o najlepszym profilu farmakologicznym do badań na modelach zwierzęcych w celu oceny możliwości ich zastosowania jako nowej strategii terapeutycznej w leczeniu nieswoistych chorób zapalnych oraz bólu otrzewnego. Badania zamierzała także wzbogacić o scharakteryzowanie poziomu ekspresji enkefalinaz u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodzącym zapaleniem jelita grubego. Tak postawiony cel jest logiczną kontynuacją i rozwinięciem tematyki badawczej realizowanej w zespole dr hab. Elżbiety Kamysz, która jest promotorem wymienionej dysertacji.

Dysertacja jest opracowaniem, podzielonym formalnie na następujące rozdziały: trzystronicowy „Wykaz stosowanych skrótów” po którym znajdujemy liczący 44 strony „Przegląd literaturowy”, dwustronicowy „Cel pracy”, po którym następuje część „Badania własne - metodologia” licząca 19 stron. Następnie znajdujemy rozdział „Badania własne - wyniki” liczący aż 105 stron i rozdział „Podsumowanie” liczący 5 stron. Po tej części następuje rozdział „Bibliografia” liczący 32 strony i wymieniający aż 432 pozycje literaturowe. Praca jest bardzo obszerna i zawiera aż strony tekstu. Całość pracy została przygotowana starannie, poszczególne schematy oraz rysunki podane są czytelnie.

Część „Przegląd literaturowy” rozpoczyna opis charakterystyki oraz funkcji receptorów opioidowych. Połączony jest z opisem endogennych peptydów opioidowych, których sekwencje oraz powinowactwo do receptorów zostało zestawione w Tabeli 1. Następnym rozdział 1.2.1 zatytułowany

„Enkefalin” opisuje prekursory tych peptydów, miejsca ich formowania w organizmie, obecność w poszczególnych tkankach, funkcje oraz ich efekty fizjologiczne i funkcje w organizmach. Ponadto przedstawia wyniki badań klinicznych oraz wybranych badań medycznych. Szkoda, że autorka dysertacji nie zamieściła definicji tych peptydów co znacznie ułatwiło by czytanie tego rozdziału. Kolejny rozdział zatytułowany „Enzymy rozkładające enkefalin” opisuje enzymy degradujące te pentapeptydy w komórkach. Szkoda tylko, że pokazana na Rysunku 3 struktura Met-enkefaliny narysowana jest niepoprawnie. Rozdział 1.4 zatytułowany „Endogenne inhibitory enzymów rozkładających enkefalin” opisuje trzy wybrane peptydowe inhibitory: sialorfinę, opiorfinę, oraz spinorfinę, które zostały później wykorzystane do realizacji celu pracy. Kolejny rozdział zatytułowany „Nieswoiste choroby zapalne jelit” opisuje epidemiologię, patogenezę, wpływ czynników środowiskowych i czynników genetycznych, czynników immunologicznych na tę grupę chorób.

Z dużym zainteresowaniem przeczytałem kolejny rozdział zatytułowany „Objawy i przebieg nieswoistych chorób zapalnych jelit”, który przedstawia opis wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, chorobę Leśniewskiego-Crohna oraz strategię leczenia tych chorób. Opis ten wyraźnie wzbogacił wiedzę recenzenta o tej grupie chorób chociaż opis aminosalicylanów, które stosowane są w leczeniu, a także antybiotyków, kortykosteroidów, leków immunosupresyjnych i leków biologicznych wiąże się dosyć luźno z tematem dysertacji. Doktorantka postanowiła także opisać fenomen bólu, jego funkcje, podział i fizjologię. Lektura tej części dysertacji dotyczy wiedzy czysto medycznej pozostawiając pewien niedosyt w obszarze tematyki pracy doktorskiej.

Kolejnym rozdziałem, który określił obszar badań ujęty w dysertacji jest rozdział zatytułowany „Cel pracy”. Doktorantka postanawia zająć się nieswoistymi chorobami zapalenia jelit (NChZJ), a szczególnie ich leczeniem oraz złagodzeniem ich objawów klinicznych takich jak ból brzucha. W związku z tym celem syntetycznym badań miało być wykonanie syntezy szeregu nowych analogów inhibitorów enkefalinaz o różnej długości i sekwencji. Następnie określenie ich wpływ na degradację enkefalin oraz stabilność w ludzkim osoczu i wobec neutralnej endopeptydazy w warunkach *in vitro*. Celem tego etapu badań miało być wytypowanie związków o najlepszym profilu farmakologicznym do badań na modelach zwierzęcych. Realizacja tak obszernego projektu wymagała niewątpliwie wsparcia ze strony specjalistów z innych dziedzin wiedzy, co Doktorantka wyraźnie definiuje w tym rozdziale. Aby wykonane badania bardziej uwiarygodnić postanawia scharakteryzowanie poziomu ekspresji enkefalinaz u wybranych chorych pacjentów. Podany cel pracy jest niewątpliwie bardzo obszerny i stanowi bardzo niestandardowe podejście do realizacji pracy doktorskiej z dziedziny chemii.

Kolejny rozdział dysertacji zatytułowany jest „Badania własne – metodologia”. Doktorantka podaje tu wykaz aparatury jaką wykorzystywała podczas wykonywania badań, opisuje zastosowaną metodologię syntezy peptydów oraz sposób ich oczyszczania. Zgodnie z wymaganiami dotyczącymi syntezy tej klasy związków opisuje sposób ich analizy wykorzystujący wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) oraz jedną z technik spektrometrii mas MALDI-TOF, którą stosowała do potwierdzania ich struktury. Następnie podaje metodę badań *in vitro* zastosowaną dla zsyntetyzowanych peptydów, oznaczania ich aktywności względem APN i NEP oraz inne metody niezbędne do uzyskania założonego celu badań. Warto zauważyć, że wiele z zastosowanych metod badawczych takich jak np. oznaczenie poziomu mRNA w APN i NEP w tkankach (rozdział 3.4.2.7) czy też detekcja białek przy użyciu techniki western blot czy też ELISA (rozdział 3.4.2.8 i 3.4.2.9) wykracza znacznie poza obszar nawet szeroko rozumianej chemii organicznej. Budzi to duży szacunek recenzenta, ponieważ wykonanie takich badań wymagało wykonania tytanicznej pracy znacznie przekraczającej standardowe wymagania jakie stawiane są w doktoratach z chemii organicznej.

Po opisanii metodologii wykonanych badań, Doktorantka opisuje uzyskane wyniki w rozdziale 4 zatytułowanym „Badania własne – wyniki”. Rozpoczyna badania wykonaniem syntezy pięciu peptydów referencyjnych, których dane fizykochemiczne umieszczone są w Tabeli 4. Dodatkowo zamieszcza chromatogramy HPLC oraz widma MS trzech z zsyntezowanych peptydów: sialorfiny, opiorfiny i spinorfiny, które dokumentują ich wysoką czystość oraz potwierdzają strukturę. Te właśnie peptydy poddaje badaniom pod kątem określenia ich aktywności inhibitorowej względem aminopeptydazy N (APN) oraz neutralnej endopeptydazy (NEP), określając wzrost aktywności inhibitorowej. Następnie wykonuje badania nad określeniem ich trwałości w ludzkim osoczu co dokumentuje odpowiednimi widmami MS pokazanymi na rysunkach od 16 do 20. Badania te pozostawiają pewien niedosyt ponieważ

nie pokazują zachowania samych próbek bez tych peptydów, co znacznie by ułatwiło i uwiarygodniło uzyskane wyniki. Następnie te same peptydy bada pod kątem działania przeciwzapalnego na myszach. Ten wątek badań wykonany jest niezwykle starannie i pokazuje dużą sprawność Doktorantki w pracy na modelach zwierzęcych wybranych chorób. Badania dodatkowo poszerza o oznaczenie poziomu APN i NEP u pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit. Aby oznaczyć działanie przeciwbólowe zsyntezowanych peptydów którymi była: Leu-enkefalina, Met-enkefalina, sialorfina, opiorfina i spinorfina, wykonuje badania na mysim modelu bólu trzewnego wywołanym przez rozciągnięcie ściany jelita grubego, których wyniki zostały opisane w rozdziale 4.1.7. Umiejętnie interpretuje uzyskane wyniki badań odnosząc je do danych literaturowych. Ponieważ inhibitory enkefalinaz nie są odporne na degradację enzymatyczną projektuje 11 analogów tych peptydów o sekwencjach pokazanych w Tabeli 8, aby oznaczyć ich właściwości jako inhibitorową względem APN i NEP. Okazało się jednak, że acylowanie *N*-końca peptydu kwasem palmitynowym daje związki słabo rozpuszczalne w wodzie a ich obecność zmniejsza czas półtrwania enkefalin czyli obniża aktywność inhibitorową. Podwójna modyfikacja struktury peptydów polegająca na acetylowaniu *N*-końcowej grupy aminowej i amidowaniu *C*-końcowej grupy karboksylowej sialorfiny, opiorfiny, spinorfiny zmniejszyła znacznie ich aktywność inhibitorową względem NEP i APN.

Aby uzyskać peptydy lepiej rozpuszczalne w wodzie Doktorantka zaprojektowała i wykonała syntezę kolejnych siedmiu peptydów w których na *N*-końcu znalazły się dwie lizyny *N*-acylowane kwasem palmitynowym. Umieszczone w Tabeli 11 dane potwierdzają ich strukturę, ale należy traktować je z pewną ostrożnością. Chodzi mianowicie o dane uzyskane metodą spektrometrii mas, w których masy protonowanych jonów molekularnych peptydów $[M+H]^+$ różnią się od jonów molekularnych od 0.6 dla peptydu 12 do 1.4 jednostek masy dla peptydu 17. Tak duża rozbieżność nie powinna mieć miejsca i należało się jej dokładnie przyjrzeć. Oczekuję od Doktorantki dokładniejszego wyjaśnienia tego fenomenu.

Peptydy były podane badaniom nad określeniem ich wpływu na degradację enkefalin względem APN i NEP. Peptydy oznaczone numerami 12, 14 i 18 okazały się być silnymi inhibitorami co prowadziło do znacznego wzrostu trwałości enkefalin. Do kolejnych badań Doktorantka wybrała sialorfina i peptyd 12 o sekwencji Palm-Lys-Lys-Gln-His-Asn-Pro-Arg dla których oznaczyła zmianę ich stężenia w funkcji czasu w czasie inkubacji z i bez neutralnej endopeptydazy.

Aby lepiej zinterpretować uzyskane wyniki i wyjaśnić różną aktywność inhibitorową uzyskanych peptydów Doktorantka wykonała modelowanie molekularne oddziaływań aminopeptydazy *N* i neutralnej endopeptydazy z peptydem 18 (Lys-Lys-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg). Wyniki tego modelowania udokumentowały oddziaływanie mostkiem solnym pomiędzy peptydem 18 z aminopeptydazą *N*. Tym samym modyfikacja grupy karboksylowej *C*-końca peptydu na grupę amidową, powodująca zmianę mostka solnego na wiązanie wodorowe, będzie prowadziła do obniżenia aktywności co dobrze udokumentowały uzyskane wyniki.

Dwa z uzyskanych i zbadanych peptydów; a mianowicie peptyd 12 (Palm-Lys-Lys-Gln-His-Asn-Pro-Arg) oraz peptyd 14 (Palm-Lys-Lys-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg) zostały przekazane do badań *in vivo* w mysim ostrym modelu choroby Leśniowskiego-Crohna. W badaniu zaobserwowano, że peptyd 12 znacząco hamuje rozwój stanu zapalnego po podaniu dootrzewnowym, podczas gdy peptyd 14 nie ma takiego wpływu. Korzystny profil farmakologiczny tej pochodnej sialorfiny oceniony na podstawie badań *in vitro* i *in vivo* daje nadzieję, że peptyd 12 może stać się substancją leczniczą oraz wzorcem do projektowania nowych skutecznych terapeutyków w terapii NCHZJ.

Aby dokładniej określić, które fragmenty tego peptydu są kluczowe dla jego aktywności biologicznej Doktorantka wykonała syntezę analogów sialorfiny w których strukturze zmieniała poszczególne aminokwasy na alaninę (skan alaninowy). Sekwencje pięciu zaprojektowanych analogów znajdujemy w Tabeli 14. Wyniki badań nad określeniem wpływ każdego z tych peptydów na degradację Met-enkefaliny względem NEP zestawiono w Tabeli 16. Okazało się, że zamiana reszty asparaginy na resztę alaniny w pozycji P3 (peptyd 21) cząsteczki sialorfiny spowodowała 1,4-krotny wzrost aktywności inhibitorowej otrzymanego związku w stosunku do NEP, porównując do struktury macierzystej. Zamiany pozostałych aminokwasów nie miały tak zasadniczego znaczenia. Ten fragment badań w którym Doktorantka pokazała, że umie projektować, wykonywać oznaczenia enzymatyczne i poprawnie interpretować ich wyniki pokazuje jej dużą dojrzałość naukową.

Kontynuując badania nad określeniem zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną, w kolejnym etapie pracy doktorskiej Doktorantka zaprojektowała strukturę siedmiu analogów sialorfiny, opiorfiny i spinorfiny o „odwróconej” sekwencji, co pokazuje Tabela 17 dysertacji. Wykonała syntezę tych związków i określa ich wpływ a degradację enkefalin względem neutralnej endopeptydazy (NEP). Wyniki tych badań, zestawione w Tabeli 19, pokazały, że największą aktywność posiadał peptyd 30 o budowie Gln-Arg-Phe-Pro-Arg.

Kolejne modelowanie molekularne, wykonane przez Doktorantkę, oddziaływań kompleksów białka NEP z uzyskanymi peptydami pokazało kluczową rolę bocznych reszt aminokwasowych sialorfiny na ich zdolność do inhibicji NEP.

W kolejnym etapie badań doktorantka postanowiła określić rolę reszty kwasu glutaminowego w cząsteczce sialorfiny w jej aktywności biologicznej poprzez usunięcie glutaminy lub jej wymianie na inne aminokwasy. Aby to wykonać zaprojektowała strukturę 14 peptydów, których syntezę wykonała, a uzyskane związki po oczyszczeniu poddała kolejnym badaniom. Dane fizykochemiczne tychże peptydów umieściła w Tabeli 21.

Zgodnie z opracowaną metodologią oznaczyła degradację Met-enkefaliny względem NEP stosując chromatografię HPLC i wyznaczając czas półtrwania oraz szybkość reakcji w obecności poszczególnych peptydów. Spośród otrzymanych peptydów najlepszym inhibitorem okazał się związek 39, o strukturze Ile-His-Asn-Pro-Arg, zawierający w swojej strukturze resztę izoleucyny, którą z pośród pozostałych aminokwasów hydrofobowych oraz zasadowych wyróżnia fakt posiadania dodatkowego centrum stereogenicznego na atomie węgla.

Ponieważ uzyskane wyniki wskazywały na kluczową rolę aminokwasu znajdującego się w pozycji P1 na badaną aktywność biologiczną badanych pentapeptydów, doktorantka postanowiła dokładniej przejrzeć się dokładniej temu zagadnieniu. Zaprojektowała i wykonała syntezę 6 pentapeptydów w których strukturze zmieniała tylko pierwszy aminokwas na izoleucynę, leucynę, walinę, lizynę i argininę o konfiguracjach *D*. Kolejne badania nad degradacją Met-enkefaliny względem NEP stosując chromatografię HPLC i wyznaczając czas półtrwania oraz szybkość reakcji w obecności poszczególnych pentapeptydów pokazały, że tylko peptyd 49 wykazywał aktywność inhibitorową wobec NEP.

Modyfikacja struktury sialorfiny na C-końcu oraz na N- i C-końcu resztą argininy o konfiguracji *D* opisana w kolejnym rozdziale dała peptydy 51 – 52 o praktycznie takiej samej aktywności jak wyjściowy pentapeptyd (Tabela 28) .

Trwałość dwóch z uzyskanych peptydów, oznaczonych numerami 39 i 49, posiadających najwyższą aktywność biologiczną, została sprawdzona przez Doktorantkę w ludzkim osoczu. Uzyskane wyniki pokazały, że oba peptydy wykazują dużo większą trwałość w osoczu od sialorfiny. Stężenie peptydu 49 w ludzkim osoczu zmieniło się tylko o 55% w ciągu 48 godzin. W tym czasie peptyd 39 i sialorfina uległy całkowitemu rozpadowi. Widma spektrometrii mas odpowiednich mieszanin pokazane na rysunkach 53, 54, 55 dobrze dokumentują ten fenomen.

W kolejnym etapie pracy Doktorantka zaprojektowała strukturę endogennych inhibitorów enkefalinaz modyfikowane na *N*-końcu cysteiną. Tabela 29 pokazuje strukturę 6 nowych heksapeptydów, ich sześciu homo- dimerów oraz strukturę czterech heterodimerów. Proste heksapeptydy 53 – 68 były syntezowane na stałym nośniku metodą Fmoc/*t*Bu. Synteza homo- i heterodimerów była o wiele bardziej wymagająca ale jej opis zawarty w części eksperymentalnej jest niezwykle lakoniczny. Synteza heterodimerów tiopeptydów jest niezwykle wymagająca od eksperymentatora i, zdaniem recenzenta, powinna być o wiele dokładniej opisana aby było możliwe jej powtórzenie lub odtworzenie.

Uzyskane peptydy były poddane badaniom nad hamowania aktywności enzymatycznej względem NEP, zgodnie z przyjętą przez doktorantkę procedurą. Modyfikacja opiorfiny resztą cysteiny w peptydzie 55 dała 2-krotny wzrost aktywności inhibitorowej. Dimeryzacja peptydów 53, 55 i 57 będących analogami sialorfiny, opiorfiny oraz spinorfiny doprowadziła do uzyskania bardzo silnych inhibitorów (peptydy 59, 61, 65 i 67) NEP. Jeden z uzyskanych heterodimerów powstały z połączenia analogu sialorfiny i spinorfiny (peptyd 65) Doktorantka zbadła pod kątem stabilności metabolicznej w ludzkim osoczu. Wykazała metodami chromatografii HPLC i spektrometrii mas MALDI-TOF, że taki heterodimer jest bardzo stabilny metabolicznie. Związek ten został użyty w badaniu przeciwzapalnym *in vivo* w modelu zwierzęcym. Wykazał porównywalną do peptydu 12 aktywność przeciwzapalną w mysim ostrym modelu choroby Leśniowskiego-Crohna odnośnie oceny makroskopowej oraz aktywności mieloperoksydazowej.

Duża motywacja Doktorantki do uzyskania peptydu o wysokiej aktywności biologicznej dobrze udokumentowana jest w rozdziale 4.6 dysertacji w którym postanowiła sprawdzić jak ilość reszt lizyny oraz rodzaj kwasu tłuszczowego przyłączonych do *N*-końca cząsteczki sialorfiny wpłynie na jej zdolność do degradacji enkefalinaz. Zaprojektowała i wykonała syntezę 6 analogów sialorfiny modyfikowanych na *N*-końcu jedną, dwiema i trzema resztami lizyny oraz różnymi lipopeptydami (Tabela 33 i 34). Badanie tych peptydów kątem aktywności inhibitorowej względem NEP zgodnie z opisaną metodologią pokazało, że tylko jeden z zaprojektowanych peptydów o numerze 72 o strukturze Mir-Lys-Lys-Gln-His-Asn-Pro-Arg, wykazuje wysoką aktywność. Badanie stabilności metabolicznej tego peptydu wraz z peptydem 12 w ludzkim osoczu pokazały ich wysoką i porównywalną stabilność metaboliczną. Doktorantka wykorzystowała także spektrometrię mas MALDI-TOF do analizy osocza zawierającego peptydy aby pokazać, które z wiązań peptydowych badanych związków ulega hydrolizie. Dodatkowo, doktorantka wykonała badanie nad działaniem przeciwzapalnym w mysim modelu choroby Leśniowskiego-Crohna tegoż peptydu. Okazało się, że łagodzenie stanu zapalnego okrężnicy u myszy przez ten peptyd na tle peptydów 12 i 65 było znacznie słabsze.

Dysertację kończy pięciostronicowe podsumowanie, w którym Doktorantka formułuje szereg wniosków z przeprowadzonych przez siebie badań. Trudno jednak zgodzić się z twierdzeniem umieszczonym na stronie 180 dysertacji w którym stwierdza, że: „Podsumowując w trakcie realizacji pracy doktorskiej udało się osiągnąć kilka celów, z których dwa są kluczowe dla dalszego rozwoju nauki”. Niewątpliwie modulacja poziomu enkefalin poprzez hamowanie aktywności enzymów zaangażowanych w ich degradację może być alternatywą dla obecnie stosowanych leków przeciwzapalnych. Możliwe jest także zastosowanie kliniczne tego typu związków na choroby czynnościowe przewodu pokarmowego ale wymaga to wykonania bardzo wielu dodatkowych badań. Nie umniejsza to jednak rangi wykonanych badań chociaż ich translacja w kierunku przemysłu farmaceutycznego i systemów opieki zdrowia, o której wspomina doktorantka jest mało prawdopodobna.

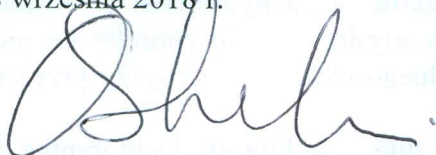
Oceniając uzyskane przez Doktorantkę wyniki należy podkreślić ich wartość merytoryczną czego dowodem może być fakt, iż część z nich stała się już przedmiotem pięciu publikacji zamieszczonych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz dwóch prac przeglądowych opublikowanych w języku polskim. Ponadto wyniki wykonanych badań zaprezentowała jako 18 komunikatów na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Pracy nie czyta się łatwo. Strona edytorsko-redakcyjna rozprawy jest bardzo dobra. Opis przepisów preparatywnych pozostawia pewien niedosyt. Jednak z obowiązku recenzenta wymieniam jeszcze kilka zauważonych niedociągnięć:

1. Na stronach 50, 72, 117 dysertacji Doktorantka pisze o „jednorodności otrzymanych peptydów”, dla recenzenta nie jest jasne to określenie.
2. Określenie grupy Fmoc jako „osłona” na stronie 51, wymaga wyjaśnienia.
3. Deskryptory *L* i *D* piszemy kursywą, strony 149, 178.
4. Peptydy poddawane były reakcji acetylowania i/lub acetylacji na stronie 116, która z tych określeń powinno być stosowane?
5. O ile reakcje acylowania peptydu można kontrolować testem chloranilowym, strona 53, to dla recenzenta nie jest jasne jak ten test można wykorzystać do kontroli reakcji odbezpieczania grup aminowych peptydów.
6. Wykonywanie analizy statystycznej po trzech powtórzeniach eksperymentu opisane na stronie 59, lub dwóch opisane na stronie 64, jest merytorycznie błędne.
7. Do badań trwałości peptydów w osoczu metodą spektrometrii mas należałoby dodać wyniki dla układu badanego bez peptydów aby wykluczyć jony pochodzące z matrycy, strony 86, 87 88, 153, 154, 162, 163, 171, 172.
8. Oznaczenia jonów molekularnych szeregu peptydów wyraźnie się różnią od tych obliczonych co szczególnie widać w Tabeli 11 na stronie 118 dysertacji. Czy tak powinno być i jakie badania uzupełniające powinny być wykonane?
9. Trudno się zgodzić z twierdzeniem ze strony 121 mówiącym o tym, że „Formy analogów 12 i 14 w postaci amidów (peptydy 13 i 15) wykazywały....”.
10. Określenie użyte na stronie 145 „....pozycji P1 enancjomerami reszt aminokwasowych” jest niejasne i wymaga wyjaśnienia.

Powyższe uwagi w niczym nie umniejszają mojej bardzo pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej Małgorzaty Sobocińskiej. Doktorantka wykazała się biegłością w planowaniu, wykonywaniu i interpretacji wyników eksperymentów.

W związku z powyższym uważam, że recenzowana praca doktorska spełnia wszelkie wymagania stawiane tego typu rozprawom przez Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym, oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 roku i niniejszym występuję z wnioskiem do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Sobocińskiej dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa 28 września 2018 r.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Shuh', written in a cursive style.