



**INSTITUTE OF
BIOCHEMISTRY
AND BIOPHYSICS**
POLISH ACADEMY
OF SCIENCES

Warszawa, 18. 04. 2019.

Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, Poland

Prof. dr hab. Wojciech Bal

Tel: +48-22-5922371 Fax: +48-22-6584636

e-mail: wbal@ibb.waw.pl

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Sawickiej

Pani mgr Justyna Sawicka przedstawiła do oceny rozprawę doktorską pod tytułem „Projektowanie i synteza rusztowań peptydowych o potencjalnym działaniu pro-regeneracyjnym”, wykonaną w Katedrze Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło, prof. UG. Rozprawa liczy 173 strony w tradycyjnym układzie, którego częściami są kolejno Wprowadzenie, Cel pracy, Metodologia, Omówienie Wyników, Dyskusja Wyników, Podsumowanie, Dorobek Naukowy, Wykaz Dorobku (nieujęty w spisie treści) i końcu Bibliografia. Dołączono również półtorastronicowe streszczenie w języku angielskim. Ten schemat rozprawy jest logiczny i klarowny. Rozprawa jest bardzo bogato zilustrowana, zawierając aż 97 rysunków, głównie w części opisującej wyniki.

W pierwszej części liczącego 40 stron Wprowadzenia Autorka przedstawia zwięzły opis budowy i funkcji skóry, opisuje procesy gojenia i regeneracja skóry i omawia modele zwierzęce, stosowane w badaniach procesów regeneracyjnych. Następnie prezentuje bieżący stan wiedzy w dziedzinie inżynierii tkankowej, skupiając się na peptydowych czynnikach sygnalizacyjnych. Szczegółowo omawia właściwości peptydów RDKVYR (IM), KGHK oraz GHK, użytych w jej badaniach. W kolejnej części Wprowadzenia przedstawione są rusztowania stosowane w inżynierii tkankowej, ze szczególnym uwzględnieniem fibryl i hydrożeli peptydowych, by zakończyć część wstępną kilkustronicowym opisem zastosowanych przez siebie fizykochemicznych metod badania włókien peptydowych. Ta część rozprawy napisana jest żywym i klarownym językiem. Uważam ten opis za wystarczający dla zrozumienia zagadnień ważnych dla idei i wyników rozprawy. Szczególnie satysfakcjonująca jest prezentacja na str. 30-34 rusztowań tkankowych, w przekonujący sposób uzasadniająca zastosowanie w rozprawie rusztowań peptydowych. Opis na str. 34-45

świadczy o dobrej orientacji Autorki w dziedzinie zastosowań biomedycznych fibryli i hydrożeli peptydowych.

Obowiązkiem recenzenta jest wskazanie pewnych usterek i nieścisłości, wykrytych w tej części rozprawy, od razu stwierdzając, że nie obniżają one znacząco jej wartości. Nie wyliczam tu okazjonalnych błędów stylistycznych i literowych, których jest niezbyt wiele, a także znacznych różnic opinii między mną i Doktorantką w kwestii stosowania przecinka.

Na str. 21/22 Rys. 8 przedstawia strukturę, a nie sekwencję tymopoetyny II. Na Rys. 11 (str. 27) brakuje czwartego wiązania w płaszczyźnie kompleksu miedziowego peptydu GHK, a wszystkie wartości stałych wiązania kompleksów miedziowych są błędne, co wynika z prób porównania stałych o różnych definicjach, a nawet jednostkach, a także po części z sięgnięcia do błędnych, nieaktualnych danych literaturowych. Z błędnych wartości wyciągnięto fałszywy wniosek, jakoby zdolność wiązania miedzi w kompleksach GH i GHK oraz albuminy i GGH były istotnie różne. W rzeczywistości te wartości są zbliżone ($\log K$ przy pH 7.4 = 12-13). Błędy te są jednak o tyle mało istotne, że Autorka nie korzysta z tych danych w dyskusji otrzymanych przez siebie wyników. Str. 44 - PEG (glikol polietylenowy) nie jest biopolimerem, tylko polimerem syntetycznym stosowanym często w aplikacjach biochemicznych.

Na str. 49-53 Doktorantka przedstawiła bardzo rozbudowany cel pracy. Ta część rozprawy jest w istocie jej streszczeniem, przedstawiając nie tylko zamierzenia badawcze, ale też syntetycznie omawia uzyskane wyniki. Uważam, że w sekcji Cel pracy należałoby przedstawić jedynie zastany stan wiedzy, hipotezę badawczą oraz uzasadnienie podejmowanych badań. Taki opis celu nie powinien przekraczać objętościowo jednej strony tekstu, a miejscem właściwszym dla omówienia zarysu wyników są konkluzje i streszczenie, co zresztą ma miejsce w omawianej rozprawie. Niemniej jednak cele rozprawy, czyli (i) „*sprawdzenie właściwości fizyko-chemicznych oraz pro-regeneracyjnych peptydu o sekwencji RDKVYR (peptyd IM) oraz peptydów o zwielokrotnionych sekwencjach IM, GHK i KGHK*” oraz (ii) „*opracowanie nowych rusztowań peptydowych oraz zbadanie ich właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych w zakresie regeneracji ran skóry*” są w tej części pracy w sposób jasny wyosobnione. Omawiany rozdział wypełnia więc koniec końców przypisaną sobie rolę.

Kolejna część rozprawy, zatytułowana „Metodologia”, obejmuje 23 strony. Autorka przedstawia zastosowane przez siebie metody badawcze, kolejno syntezę i oczyszczanie peptydów, eksperymenty poświęcone wyjaśnieniu struktur otrzymanych związków, badania ich, stabilności i eksperymenty biologiczne, wykonane na liniach komórkowych i myszach laboratoryjnych. Metody syntezy peptydów są opisane bardzo precyzyjnie i w sposób

praktyczny. Widać, że Doktorantka jest z nimi świetnie obeznana, a opis poszczególnych procedur przez nią wykonanych jest tak rzetelny i dokładny, że powtórzenie syntez na jego podstawie nie powinno nastręczać żadnych trudności. Opis metod spektroskopowych (CD, kolorymetria z tioflawiną T, NMR) i mikroskopowych (AFM, TEM, SEM, jest krótszy, ale zupełnie wystarczający. Pewne wątpliwości recenzenta budzą natomiast procedury zastosowane do badań stabilności peptydów w wodzie i osoczu, a także do oddziaływania z albuminą. Po pierwsze, dlaczego dla peptydów o istotnie różnej masie zastosowano kryterium eksperymentalne stężenia wagowego, a nie molowego? Należałoby oszacować różnicę warunków eksperymentalnych, wynikającą z różnicy mas molowych peptydów oraz różnej ilości przeciwjonów kwasowych. Po drugie, badania stabilności peptydów w wodzie wykonano dosłownie „w wodzie”, czyli w nieznanymi warunkach, bez znajomości pH roztworu i jego siły jonowej, które w tym wypadku nadaje peptyd wraz ze swoimi przeciwjonami. W związku z tym nie będę omawiać wyników tych eksperymentów w dalszych częściach recenzji. Następnie, test „powinowactwa do albumin”, czyli w przypadku faktycznych eksperymentów Doktorantki do BSA wykonywano za pomocą bardzo zawilej metody pośredniej, która w dodatku nie dostarcza żadnych danych, dotyczących powinowactwa. Jest to test jakościowy o nieustalonych warunkach oddziaływania BSA z poszczególnymi peptydami. Nie wiadomo zatem, czy oddziaływanie jest dostatecznie silne, żeby mogło zachodzić w warunkach naturalnych. Czy podjęto próbę bezpośredniego pomiaru oddziaływania np. za pomocą CD? Chciałbym prosić również o podanie uzasadnienia, dlaczego do analizy istotności statystycznej wyników biologicznych wybrano akurat test Manna-Witneya i dlaczego do testów gojenia ran wybrano te, a nie inne szczepy myszy i dlaczego badania prowadzono na samicach. Na szczęście skrytykowane powyżej zagadnienia eksperymentalne nie mają kluczowego znaczenia dla najistotniejszych wyników rozprawy.

Opis wyników badań eksperymentalnych stanowi główną część dysertacji, obejmując ponad 70 stron. Uporządkowany jest według obiektów badań, kolejno peptydu IM i jego analogów, powielonych peptydów sygnałowych, fibryl peptydowych i hydrożeli.

Opisując syntezę peptydów z grupy IM autorka wykazuje zdecydowaną wyższość syntezy w mikrofalach pod względem szybkości procesu, zużycia odczynników i czystości produktu. Ten sam motyw uzasadnionego zachwytu nad metodologią mikrofalową przejawia się również w opisach syntezy pozostałych peptydów. Recenzentowi pozostaje zgodzić się z Doktorantką, zwracając uwagę na wyczerpujący opis ilościowy wykonanych przez nią reakcji. Widma CD wykazały, zgodnie z oczekiwaniami, nieustrukturyzowanie badanych peptydów w roztworze. Według testów na cytotoksyczność i proliferację komórek,

wykonanych przez Doktorantkę, wszystkie peptydy zachowywały się dość podobnie – były mało toksyczne i miały niewielką, ale znamioną zdolność do stymulacji proliferacji badanych komórek. Przy braku wyraźnie korzystnych reakcji ze strony mutantów alaninowych, Doktorantka postanowiła kontynuować prace wyłącznie dla oryginalnej sekwencji IM. Według badań NMR, wykonanych z jej udziałem, peptyd ten nie przybiera samodzielnej struktury w roztworze. Jest też szybko rozkładany przez enzymy w osoczu krwi. W dalszych badaniach Autorka ustaliła, że peptyd IM ma niewielki wpływ na migrację i chemotaksję komórek skóry, nie jest immunogenny i nie ma zdolności alergizujących *in vitro*. Natomiast zastosowany na rany eksperymentalne u myszy stymulował proces regeneracji skóry, w porównaniu z grupą kontrolną.

Wyniki otrzymane dla peptydu IM zostały podsumowane w osobnym krótkim podrozdziale. Ten sposób rekapitulacji wyników, otrzymanych za pomocą całej gamy metod i podejść eksperymentalnych, jest bardzo użyteczny dla czytelnika, ułatwiając mu zrozumienie istotnych wyników badawczych.

Dane dla kolejnych obiektów badawczych zostały przedstawione według analogicznego schematu. W następnej części rozprawy przedstawione są, według określenia Doktorantki, peptydy o powielonej sekwencji aktywnej. W rzeczywistości, sekwencje trzech zbadanych peptydów odpowiadają schematowi XX-GGGAAPVGGG-XX, gdzie XX to peptyd sygnałowy, RDKVYR (IM), GHK lub KGHK. W tym kontekście recenzent prosi o wyjaśnienie, dlaczego peptydy GHK-GHK i KGHK-KGHK zostały zacylowane na N-końcu, gdy tymczasem aktywne biologicznie są peptydy nieacylowane i należy oczekiwać, że produkty ewentualnej proteolizy też nie będą zawierać grupy acetylowej. Ciekawe, że peptydy KGHK-KGHK i zwłaszcza GHK-GHK są dość odporne na proteolizę w osoczu. Autorka przypisuje ten fakt oddziaływaniom z albuminą. Tę supozycję warto będzie sprawdzić za pomocą odpowiednich metod badawczych. Nie zgadzam się natomiast z opinią, że fluktuacje stężenia wykrywanych peptydów w osoczu mogłyby być „związane z różną efektywnością tworzenia kompleksu z albuminą w różnych punktach czasowych”. Jakaż byłaby przyczyna molekularna takich niemonotonicznych różnic efektywności oddziaływania? Nie budzą natomiast wątpliwości wyniki testów komórkowych, które jasno wykazują, że żaden z badanych peptydów nie jest toksyczny, a wszystkie mają niewielkie, ale znamienne statystycznie zdolności proliferacyjne.

W trzeciej części wyników scharakteryzowano peptyd FC i jego koniugaty z trzema badanymi sekwencjami aktywnymi. Doktorantka rozpoczyna opis od słusznego, lecz zbędnego już przypomnienia zalet syntezy w mikrofalach (str. 99). Następnie bada oporność peptydów

na proteolizę w osoczu. Wyniki, jakościowo zbliżone do tych otrzymanych dla peptydów podwojonych, sugerują kluczową rolę reszt N- lub C-końcowych w hydrolizie - peptyd IM nie daje żadnej ochrony, a peptyd KGHK daje największą. Dane na temat trawienia enzymatycznego tych peptydów nie budzą wątpliwości. Natomiast interpretacja widm CD z supernatantu podczas zaawansowanego procesu fibrylizacji tych peptydów (str. 105-106) jest dla mnie wątpliwa, bo np. cząsteczka tworząca doskonale beta-kartkę i całkowicie przez to wytracona, może sprawiać wrażenie nieuporządkowanej strukturalnie, co może być wyłącznie efektem śladów nieuporządkowanych zanieczyszczeń peptydowych, w ilości np. 1 %. Sama autorka stwierdza taką możliwość dla peptydu FC. Badania fibryl za pomocą testu ThT i technik mikroskopowych są natomiast przekonujące i dobrze opisane, a założenia robocze Autorki co do ich zdolności do tworzenia fibryl ulegają potwierdzeniu. Może jedynie Rys. 66 (str. 107) byłby bardziej miarodajny, gdyby miał realną skalę czasową.

Również te peptydy są nietoksyczne dla komórek i wspomagają ich proliferację. Testowany pod względem funkcjonalnym peptyd GHK-FC wykazał się również zdolnościami regeneracji skóry myszy *in vivo*.

Ostatnią badaną przez Doktorantkę grupę związków stanowiły peptydy żelujące z rodziny RADA, rozszerzone na C-końcu o badane sekwencje aktywne. Doktorantka opisała pokonane przez siebie problemy techniczne z syntezą tych peptydów, a także podstawowe właściwości peptydów, zgodne z oczekiwaniami co do ich zdolności do odwracalnego tworzenia struktur hydrożeli na bazie beta-kartek. Kluczowe pod tym względem były wyniki badań mikroskopowych. Pewnym brakiem wydaje mi się w tym miejscu niezyskanie danych o kinetyce tworzenia żelu. Do oceny wyników mikroskopowych, przedstawionych na Rys. 86 przydatne byłoby podanie skali powiększenia poszczególnych obrazów Cryo-SEM. Aktywność tej grupy peptydów wobec linii komórkowych była podobna, jak dla poprzednich grup – brak toksyczności, umiarkowane zdolności do stymulacji proliferacji. Peptydy RADA-GHK i RADA-KGHK wykazały znaczną zdolność do regeneracji skóry. Ponadto, jak stwierdza Autorka, *„Do najciekawszych wyników badań należy obserwacja, że w grupie myszy otrzymujących hydrożel RADA-KGHK zaobserwowałam odtworzenie się błony mięśniowej w tkance skórnej”*.

Ostatnie osiem stron rozprawy zajmuje zwięzła dyskusja i podsumowanie wyników. Autorka rekapitułuje tutaj kluczowe wnioski ze swoich eksperymentów, ale także formułuje rozsądne dalsze plany badawcze, oparte na tych wynikach. Zgadzam się z tymi wnioskami i uważam, że Doktorantka uzyskała bardzo obiecujące nowe cząsteczki o zdolnościach regeneracji skóry, które zasługują na dalsze badania aplikacyjne w kierunku rozwoju leków.

Należy tu pochwalić próby uzyskania ochrony patentowej na poziomie krajowym dla części otrzymanych rozwiązań. Chciałbym w tym miejscu zapytać o ich ochronę międzynarodową.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że główny cel badań mgr Justyny Sawickiej, czyli uzyskanie nowych peptydów zdolnych do regeneracji uszkodzeń skóry, został zrealizowany. Oceniam przedłożoną rozprawę pozytywnie, doceniając ogrom systematycznej pracy syntetycznej, badań fizykochemicznych i zwłaszcza bardzo szeroko zakrojonych badań biologicznych. Sformułowane powyżej uwagi krytyczne wobec pewnych kwestii szczegółowych mają charakter drugorzędny i nie umniejszają tej pozytywnej oceny.

Pragnę zatem stwierdzić, że przedłożona do oceny praca p. mgr Justyny Sawickiej spełnia wymogi ustawowe, stawiane przed rozprawami doktorskimi i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uważam ponadto, że rozprawa jest zdecydowanie ponadprzeciętna i wnoszę do Wysokiej Rady o rozpatrzenie wniosku o jej wyróżnienie, o ile spełnione są odpowiednie wymogi formalne.

W. Bal