



Prof. dr hab. Grzegorz Schroeder

Poznań, 10.04.2019 r.

R E C E N Z J A

pracy doktorskiej mgr Justyny Sawickiej pt. „Projektowanie i synteza rusztowań peptydowych o potencjalnym działaniu pro-regeneracyjnym”

Tematyka rozprawy doktorskiej mieści się w jednym z najprężniej rozwijających się współczesnych nurtów badań medycznych, dotyczących zastosowań nowych materiałów w medycynie regeneracyjnej. Celem medycyny regeneracyjnej jest naprawa, odtworzenie, regeneracja tkanek i narządów, które uległy uszkodzeniu w wyniku choroby, urazu czy procesu starzenia się organizmu. W medycynie regeneracyjnej wykorzystuje się szeroki wachlarz związków, które można zaliczyć do trzech grup: polisacharydów, peptydów/białek i poliestrów. Związki te bada się nie tylko z powodu ich właściwości, ale również ze względu na bioakceptowalność i znane mechanizmy degradacji. Otrzymanie nowego produktu do regeneracji tkanek każdorazowo rozpoczyna się od badań chemicznych. Chemik dostarcza materiał, który musi następnie być przebadany przez wielu specjalistów, w tym z zakresu inżynierii tkankowej i biologii molekularnej. Medycyna regeneracyjna to interdyscyplinarna dziedzina nauki łącząca wiedzę chemiczną, medyczną i biologiczną, która ma na celu wspomaganie procesu gojenia, regeneracji i naprawy uszkodzonych komórek, tkanek i narządów przy użyciu przeszczepów, terapii genowej czy czynników wzrostu.

Przedłożona praca doktorska pani mgr Justyny Sawickiej pt. „Projektowanie i synteza rusztowań peptydowych o potencjalnym działaniu pro-regeneracyjnym” doskonale wpisuje się w nurt badań nad zastosowaniem nowych materiałów w medycynie regeneracyjnej. Praca została wykonana pod kierunkiem prof. PG dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

ul. Umultowska 89b, 60-780 Poznań
Tel. 604-817-938
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
wchem@amu.edu.pl

www.chemia.amu.edu.pl

Praca doktorska została przygotowana w tradycyjnej formie, liczy 171 stron maszynopisu i jest podzielona na klasyczne rozdziały. We wprowadzeniu Doktorantka przedstawiła szeroki wachlarz zagadnień istotnych w medycynie regeneracyjnej, skupiając się przede wszystkim na materiałach peptydowych. Opracowane zagadnienia dotyczące zastosowania peptydów sygnalizacyjnych (RDKVYR i GHK) i materiałów peptydowych do otrzymywania konstrukcji rusztowań w inżynierii tkankowej pozwalają czytelnikowi nie tylko zapoznać się z tą tematyką, ale również wykazują wieloaspektowość czy interdyscyplinarność tego typu badań. Aby osiągnąć zamierzony cel, praca w laboratorium chemicznym musi zostać poszerzona o badania biologiczne na liniach komórkowych czy modelach zwierzęcych. Rozdział wprowadzający w tematykę rozprawy doktorskiej jest przygotowany bardzo profesjonalnie w oparciu o 227 prac przeglądowych i oryginalnych, obejmujących najważniejsze doniesienia naukowe z tego zakresu.

Cel pracy został zdefiniowany w kolejnym pięciostronicowym rozdziale dysertacji. Celem pracy doktorskiej było:

1. zbadanie właściwości fizyko-chemicznych oraz pro-regeneracyjnych peptydu o sekwencji RDKVYR (peptyd IM) oraz peptydów o zwielokrotnionych sekwencjach IM, GHK i KGHK. Wybór tych peptydów do badań wynikał z faktu, że peptyd IM znany jest, jako środek wspomagający pracę układu odpornościowego organizmu oraz był stosowany podczas terapii wspomagających leczenie różnych stadiów chorób nowotworowych.
2. opracowanie nowych rusztowań peptydowych, na bazie trzech połączonych ze sobą sekwencji peptydowych posiadających odmienne działanie i funkcję: samoorganizującą, wrażliwą na działanie elastazy i sekwencję aktywną (RDKVYR, KGHK, GHK) oraz zbadanie ich właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych w zakresie regeneracji ran

Kolejny rozdział rozprawy doktorskiej dotyczy metodologii badań. W tym 18 stronnicowym rozdziale przedstawione zostały metody syntezy zaplanowanych w badaniach peptydów na nośniku stałym. Przedyskutowano zasady doboru nośnika stałego w syntezie peptydów, procedurę przyłączenia pierwszego aminokwasu oraz odszczepienia peptydu od nośnika. Przedstawiono metody badawcze stosowane w analizie peptydów, metody badania stabilności chemicznej i enzymatycznej w różnych matrycach, oraz metody badania aktywności biologicznej i oceny bezpieczeństwa immunologicznego otrzymanych peptydów. Opisy metod i procedur badawczych są precyzyjne i pozwalają na powtórzenie eksperymentów. Do oceny informacji uzyskanych w wyniku przeprowadzonych badań stosowano metody statyczne.

Omówienie wyników badań to 71 stronicowe opracowanie przedstawiające rezultaty badań zgodnie z celami zdefiniowanymi w założeniach pracy. Omówienie wyników badań podzielono na kilka podrozdziałów, w których przedstawiono poszczególne zagadnienia z realizacji badań, zakończone krytycznym podsumowaniem. Z pierwszego podsumowania wynika, że na podstawie przeprowadzonych badań dotyczących peptydu IM „w odtworzonych tkankach stymulowanych peptydem IM proces wypełniania otworu zregenerowaną tkanką rozpoczyna się wcześniej w porównaniu z próbą kontrolną. Powstała tkanka ma cechy tkanki młodszej, o większym potencjale regeneracyjnym. IM hamuje różnicowanie keratynocytów i opóźnia zamknięcie bariery nabłonkowej, co może sprzyjać tworzeniu blastemy i przyspieszać regenerację skóry.” Z rozdziału dotyczącego badań peptydów polisynałowych GHK-GHK, KGHK-KGHK, IM-IM dowiadujemy się, że „przedstawione wyniki potwierdzają, że powielenie sekwencji aktywnej w przypadku przedstawionych sekwencji wykazało istotny efekt w badaniach na liniach komórkowych unieśmiertelnionych fibroblastów i keratynocytów. Zaprezentowany model peptydów z powieloną sekwencją może stanowić wstęp do badań nad nową grupą związków aktywnych.”

W rozdziale dotyczącym zastosowania, jako rusztowania w inżynierii tkankowej peptydów o sekwencji mieszanej fibrylogennej (QAGIVV), enzymatycznej (AAPV) oraz aktywnej (RDKVYR, GHK, KGHK) w przeprowadzonych badaniach sekwencja peptydów wykazywała się potencjałem do formowania fibryli peptydowych. Uzyskane wyniki pokazały, że wprowadzenie sekwencji GHK oraz KGHK zwiększyło stabilność peptydów w osoczu w porównaniu do bazowej sekwencji peptydu FC lub do analogu zawierającego sekwencję peptydu IM. „Badania cytotoksyczności jednoznacznie potwierdziły, że badane związki nie są toksyczne wobec komórek skórnych tj. fibroblastów 46BR.1N oraz keratynocytów HaCaT w całym badanym zakresie stężeń tj. 0,01-25 µg/ml. Wszystkie peptydy wykazały zwiększony efekt proliferacyjny w porównaniu do peptydu bazowego FC. Efekt ten utrzymywał się na poziomie od 20 do 60%.” W rozdziale dotyczącym peptydów hydrożelowych jako rusztowania w inżynierii tkankowej stwierdzono, że ” Peptydy RADA-IM, RADA-GHK oraz RADA-KGHK stanowiące hybrydę peptydów o sekwencji samoorganizującej (RADA16-I), enzymatycznej (AAPV) oraz aktywnej (RDKVYR, GHK, KGHK) tworzą hydrożele peptydowe (rusztowania). Wszystkie prezentowane peptydy charakteryzują się wysoką stabilnością chemiczną w roztworze wodnym.” oraz że: „Wszystkie peptydy RADA wykazują aktywność biologiczną w stosunku do unieśmiertelnionych linii fibroblastów 46BR.1N i keratynocytów HaCaT, stymulując ich proliferację od 20 do 45 % względem kontroli. Są one także bezpieczne w zastosowanych stężeniach i nie powodują istotnego zahamowania proliferacji. Wizualna obserwacja preparatów histologicznych dowiodła, że w grupie kontrolnej (sól fizjologiczna) nie zaobserwowano

powstawania przydawek skóry w obszarze rany, podczas gdy w tkankach traktowanych peptydami RADA widoczne były powstające mieszkki włosowe na skraju rany. Przyspieszenie zamykania rany w przypadku peptydów RADA-GHK oraz RADA-KGHK korzystnie wpłynęły na proces gojenia poprzez szybkie utworzenie warstwy naskórka, powodując tym samym odizolowanie skóry właściwej od środowiska zewnętrznego.”

Rozdział „Dyskusja wyników”, obejmuje dziewięć stron maszynopisu. W tej części pracy przedstawiono w sposób systematyczny podsumowanie wyników wykonanych pomiarów w zakresie:

1. zastosowania peptydu IM o potencjalnym działaniu pro-regenerującym w inżynierii tkankowej. Peptyd IM nie ma wpływu na migrację i chemotaksję komórek skórnych. Jest jednocześnie peptydem bardzo bezpiecznym pod względem immunologicznym i nie wykazuje potencjału do wywoływania alergii. Peptyd IM wykazuje efekt pro-regeneracyjny. Iniekcja peptydu w grupie badanych myszy spowodowała zmniejszenie powierzchni otworów w uszach o ok 50% w porównaniu do układu kontrolnego;
2. zastosowania peptydów IM-IM, GHK-GHK oraz KGHK-KGHK zawierających zduplikowaną sekwencję do inżynierii tkankowej. Ustalono, że w przypadku braku efektu cytotoksycznego, a jednocześnie obserwowanego istotnego efektu proliferacyjnego podczas stosowania peptydów, istnieje możliwość zastosowania tych peptydów w terapii, jako molekularnych dozowników powoli uwalniających aktywne peptydy tak istotne w regeneracji tkanek.
3. zastosowania peptydów o sekwencji fibrylogenowej QAGIVV (FC), o sekwencji specyficznej dla elastazy neutrofilowej (peptyd AAPV) i o sekwencji aktywnej: RDKVYR lub GHK lub KGHK w tworzeniu rusztowań tkankowych. Przeprowadzone badania pokazały, że wszystkie peptydy ulegają trawieniu pod wpływem elastazy, a trawienie enzymatyczne przebiega w molekułe po sekwencji enzymatycznej tj. AAPV. W wyniku działania enzymu uwolniony w przypadku wszystkich peptydów został fragment NH₂-GGGQAGIVV-NH₂ odpowiedzialny za samoorganizację oraz drugi, zawierający sekwencję aktywną (GHK lub KGHK lub RDKVYR).
4. zastosowania peptydów z grupy RADA zaprojektowanych poprzez połączenie 3 sekwencji o odmiennej funkcjonalności: fragmentu o właściwościach do samoorganizacji (RADA16-I), sekwencji specyficznej na działanie elastazy (AAPV) a także sekwencji aktywnej (RDKVYR, GHK, KGHK) do konstrukcji rusztowania jako peptydów żelujących. Dla wszystkich peptydów należących do tej grupy związków zostały wykonane badania *in vivo* w modelu uszkodzenia skóry grzbietowej myszy. Uzyskane wyniki pokazały, że w przypadku peptydów RADA-GHK oraz RADA-KGHK następuje

szybsze zamknięcie rany w porównaniu do pozostałych hydrożeli. Analiza preparatów histologicznych pobranych ze skóry grzbietu po zakończeniu eksperymentu wykazała, że odbudowana skóra posiadała prawidłową strukturę. Uzyskane wyniki dla peptydów RADA zostały objęte polskim zgłoszeniem patentowym „Nowe związki peptydowe jako czynniki stymulujące gojenia ran i rekonstrukcji skóry” o numerze P.425597.

W rozdziale „Dyskusja wyników” autorka dysertacji przedstawiała nie tylko wyniki swoich badań, ale również odniosła się do danych literaturowych obejmujących tą tematykę. Rozdział ten nie tylko wykazał, że Doktorantka umiejętnie posługuje się różnymi technikami badawczymi, potrafi prawidłowo interpretować uzyskane wyniki, ale również współpracować z innymi naukowcami w celu wszechstronnego zbadania problemu naukowego.

W trakcie analizy tej części pracy nasuwają się następujące pytania, które pragnę przedyskutować z autorką pracy w trakcie publicznej obrony:

1. dotyczące opisu, a w zasadzie interpretacji wyników (widm) uzyskanych w spektrometrii mas. W tej technice rejestruje się sygnały nie od cząsteczki [M], ale sygnały jonów np. $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+Na]^+$ Jak zatem interpretować opisy zawarte na widmach i w tabelach, w tym zakresie w dysertacji?
2. jaki jest wymagany zakres metod badawczych i jaki musi być ich wynik, aby uznać, że nowy materiał/związek chemiczny może znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej?
3. czy można zaprojektować na podstawie dotychczasowej wiedzy naukowej i prowadzonych przez Panią badań optymalny materiał regeneracyjny stosowany w inżynierii tkankowej?
4. czy otrzymane materiały peptydowe osadzone na nośnikach nieorganicznych (nano układy hybrydowe) mogą znaleźć zastosowanie, jako skuteczniejsze materiały w regeneracji tkanek?

Praca doktorska napisana jest poprawnym językiem uwzględniającym fachowe słownictwo chemiczne. Praca doktorska edytorsko przygotowana jest bardzo starannie i zawiera wiele bardzo dobrze udokumentowanych wyników badań. Badania mają charakter interdyscyplinarny, a wyniki pracy i przedstawione wnioski uzyskano stosując szeroką gamę metod badawczych. Rezultaty pracy doktorskiej wskazują, że cele pracy postawione we wstępie rozprawy zostały w pełni zrealizowane, a uzyskane wyniki znacznie poszerzają wiedzę z zakresu chemii materiałów o zastosowaniu biomedycznym. Praca doktorska jest zakończona bibliografią zawierającą 262 pozycje literaturowe, obejmujące najważniejsze prace dotyczące tematyki rozprawy doktorskiej.

Dorobek naukowy pani mgr Justyny Sawickiej składa się z: dwóch prac oryginalnych, czterech zgłoszeń patentowych oraz 23 komunikatów na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Praca doktorska pani mgr Justyny Sawickiej była finansowana w ramach pięciu projektów badawczych „Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich” oraz w ramach dwóch projektów STRATEGMED (NCBR).

Przedstawiona rozprawa doktorska, przedłożona w postępowaniu o nadaniu stopnia doktora w zakresie nauk chemicznych udowodniła, że Doktorantka posiadała umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej w tym obszarze nauki oraz interpretacji uzyskanych wyników zaplanowanych i wykonanych różnymi metodami badawczymi. Uzyskane wyniki badań wniosły istotny wkład w rozwój wiedzy z zakresu chemii peptydów i mogą być inspiracją do dalszych badań jak i ich komercjalizacji.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Justyny Sawickiej pt. „Projektowanie i synteza rusztowań peptydowych o potencjalnym działaniu pro-regeneracyjnym” spełnia zwyczajowe i prawne wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z przepisami ustawy z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii, Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. G. Schroeder