



Politechnika Łódzka



Instytut Chemii Organicznej

Łódź, dnia 12 maja 2015 r.

ul. Żeromskiego 116
90-924 Łódź 40, Polska
Tel: 42-631-31-51
e-mail: aleksandra.olma@p.lodz.pl
Prof. dr hab. inż. Aleksandra Olma,

RECENZJA

Pracy doktorskiej mgr Justyny Piekielnej

p.t. „ Synteza cyklicznych analogów endomorfiny-2 o potencjalnym działaniu przeciwbólowym”

wykonanej na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Od czasu odkrycia endogennych peptydów opioidowych, zsyntetyzowano tysiące ich analogów do badań zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną oraz poznania mechanizmu oddziaływania z receptorami opioidowymi. Ze względu na swoją rolę w różnych procesach biologicznych, receptory opioidowe pozostają przedmiotem rozległych badań farmakologicznych, które obejmują poszukiwanie nowych leków przeciwbólowych, przeciwdepresyjnych pozbawionych działań ubocznych. Agoniści receptorów μ -opiodowych są bardzo ważną grupą analgetyków stosowanych w bólach nocycetywnych i bólach neuropatycznych, ale ich użycie prowadzi do wielu efektów niepożądanych takich jak depresja oddechowa, zaparcia, tolerancja czy uzależnienie. Odkrycie w 1997 przez Zadinę i wsp dwóch endogennych tetrapeptydów opioidowych, endomorfiny-1 i endomorfiny-2 o wysokim powinowactwie do receptorów μ -opiodowych, wysokiej aktywności antynocycetywnej i słabszych efektach ubocznych dało nadzieję, na znalezienie nowych, bezpiecznych leków przeciwbólowych. Terapia bólu jest obecnie jednym z wyzwań nowoczesnej medycyny. Użycie naturalnych ligandów receptorów opioidowych w leczeniu jest niemożliwe z uwagi na ich szybką enzymatyczną degradację oraz brak zdolności do przenikania bariery krew mózg. Poszukiwania peptydomimetyków o wysokiej aktywności antynocycetywnej, obejmują różne modyfikacje łańcucha peptydowego. Jedną z metod zwiększania aktywności i/lub selektywności

peptydów bioaktywnych oraz podnoszenia odporności na hydrolizę enzymatyczną, jest wprowadzanie do ich struktury aminokwasów niekodowanych oraz elementów ograniczających swobodę konformacyjną, w tym również cyklizacji łańcucha peptydowego.

Badania pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną analogów peptydów opioidowych, szczególnie analogów endomorfyn, są od szeregu lat przedmiotem zainteresowań promotora pracy prof. dr hab. Anny Janeckiej. Jest ona niewątpliwie niekwestionowanym ekspertem w tej dziedzinie. Mgr Piekielna włączyła się do tematyki dobrze ugruntowanej i podjęła próbę twórczego rozwinięcia tych badań, czego wynikiem jest zarówno praca doktorska jak również bardzo bogaty dorobek publikacyjny. Całość badań doktorantki została opublikowana w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (*Cur. Drug Targets* – 3.597, *Peptides* – 2.614, *Org. Biomol. Chem.* – 3.487, *Bioorg. Med. Chem.* – 2.951, *Med. Chem. Letters* – 3.073). Recenzowana rozprawa doktorska zgodnie z regulaminem znowelizowanej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, ma formę spójnego tematycznie zbioru pięciu artykułów, w których mgr Piekielna jest pierwszym autorem. Dysertacja zawiera opis w języku polskim i angielskim. Ta forma rozprawy zwalnia mnie z obowiązku szczegółowej analizy osiągnięć opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych.

W pierwszej części dysertacji mgr Piekielna zamieszcza streszczenie artykułu przeglądowego *Cyclization in Opioid Peptides*, Piekielna J, Perlikowska R., Gach K., Janecka A. *Cur. Drug Targets*, 2013, 14: 798-816), w której dokonany został przegląd strategii cyklizacji peptydów, które wykorzystano do syntezy analogów peptydów opioidowych. W syntezach wykorzystano tworzenie wiązania pomiędzy C- lub N-końcem a łańcuchem bocznym, pomiędzy grupami funkcyjnymi łańcuchów bocznych oraz pomiędzy N-terminalną grupą aminową i C-terminalną grupą karboksylową. Omówione zostały cykliczne analogi peptydów opioidowych zawierające mostki mono- i disulfidowe, amidowe, ureidowe, guanidynowe oraz konsekwencje biologiczne przeprowadzonych modyfikacji. Praca przeglądowa oparta jest na wybranych 128 oryginalnych pracach obejmujących badania przeprowadzone od 1982 do początku 2013 roku. Szkoda, że doktorantka nie uzupełniła tego fragmentu rozprawy o najnowsze prace, które zostały opublikowane od drugiej połowy 2013 roku.

Założenia i cel pracy, fragment liczący 3 strony, prezentuje zaplanowane przez doktorantkę cykliczne analogi endomorfiny-2, zawierające mostek disulfidowy (dwa peptydy) oraz 21 analogów tetra-, penta- i heksapeptydów z mostkiem amidowym utworzonym pomiędzy resztą w pozycji 2, zawierającą dodatkową funkcję aminową w łańcuchu bocznym oraz resztą kwasu asparaginowego w pozycji C-terminalnej. Peptydy zostały tak zaprojektowane, że wbudowanie reszt D-Lys, D-Orn, D-Dab, *cis* lub *trans*-D-ACAla pozwoliło otrzymać cykliczne peptydy o różnej wielkości pierścienia. Dodatkową modyfikacją było zstąpienie reszt Phe³ lub Phe⁴ fluorowanymi fenyloalaninami (4-F-Phe,

2,4-F-Phe i 4-CF₃-Phe). Analogi zawierające mostek disulfidowy były nierozpuszczalne w wodzie co eliminowało je do użycia w badaniach biologicznych. Wszystkie liniowe prekursorzy zostały otrzymane na fazie stałej z użyciem żywicy MBHA Rink Amidowej według strategii Fmoc lub na żywicy MBHA z wykorzystaniem strategii Boc. Po odblokowaniu funkcji aminowej i karboksylowej w łańcuchu bocznym przeprowadzono cyklizację na fazie stałej. Mgr Pirkielna, we współpracy z dr Kluczyk, z Uniwersytetu Wrocławskiego przeprowadziła, wykorzystując spektrometrię mas (LC-MS i LC-MS/MS), analizę produktów i oznaczyła stosunek cyklicznych monomerów do dimerów. Lepszy stosunek cyklomonomeru do cyklodimeru obserwowano dla żywicy MBHA, co prawdopodobnie wynika z większej zawady przestrzennej grupy Boc. Można było przewidzieć, że jedyną drogą uzyskania czystego, cyklicznego monomeru jest cyklizacja w roztworze w dużym rozcieńczeniu, co zresztą doktorantka potwierdziła na dwóch przykładach. Otrzymane analogi zostały przebadane na wiązanie z receptorami opioidowymi, oraz dla wybranych cyklicznych peptydów przeprowadzono testy *in vivo* oraz oznaczono stabilność metaboliczną. Szkoda, że wnioski z tak obszernych badań zostały opisane na pół strony.

Najważniejszym osiągnięciem mgr Piekielej jest otrzymanie dwóch cyklicznych pentapeptydów, analogów endomorfiny-2 (Dmt-c[D-Lys-Phe-4-F-Phe-Asp]NH₂ i Dmt-c[D-Lys-Phe-2,4-F-Phe-Asp]NH₂) agonistów receptora MOP i KOP, które po podaniu domózgowym (*i.c.v.*) oraz obwodowym (*i.p.*) wykazywały aktywność przeciwbólową. Oznacza to, że otrzymane ligandy są zdolne do przekroczenia bariery krew-mózg.

Doktorantka, mimo tak krótkiego opracowania, nie uniknęła błędów redakcyjnych oraz kilku nomenklaturowych (np. mostek disiarczkowy zamiast disulfidowy, część teoretyczna zamiast literaturowa, związki drobnocząsteczkowe zamiast małowcząsteczkowe).

Kilka słów na temat warsztatu eksperymentalnego. Z opisu rozprawy wynika, że autorka bardzo dobrze panuje nad metodologią syntezy peptydów na fazie stałej, chromatograficznymi technikami oczyszczania, badaniami enzymatycznymi oraz testami biologicznymi, które wykonywała lub brała udział w ich wykonywaniu. Nie jest jednak łatwe do określenia udziału doktorantki w opublikowanych badaniach, zwłaszcza że wszystkie prace są wieloautorskie, a trzy z nich mają 9-12 autorów.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że doktorantka dobrze zaplanowała swoje badania i wykazała się bardzo dojrzałym podejściem do realizowanego tematu. Badania podjęte przez doktorantkę są z punktu widzenia naukowego i aplikacyjnego wysoce aktualne o czym świadczy duża ilość publikacji w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (średni IF = 3.144) jak również pozyskanie funduszy na ich realizację. Mgr Piekielej jest beneficjentką Grantu PRELUDIUM, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Badania były również finansowane z Funduszu Młodych Naukowców Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Wyniki przedstawione w rozprawie w sposób istotny poszerzają naszą wiedzę na temat zależności pomiędzy budową analogów endomorfina a ich aktywnością biologiczną i dają podstawy do kontynuowania badań. Analogi zdolne do pokonywania bariery krew-mózg mogą być strukturami wiodącymi w poszukiwaniu peptydowego leku przeciwbólowego.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja pt. „Synteza cyklicznych analogów endomorfina-2 o potencjalnym działaniu przeciwbólowym” spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Tytule Naukowym i Stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr farm. Justyny Piekielej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto w osobno zredagowanym piśmie wnoszę o wyróżnienie jej rozprawy.

Aleksander Olme