



Prof. dr hab. Aleksander Bilewicz
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16; 03-195 Warszawa
Tel.: (+48.22)504 13 57
Fax: (+48.22)811.15.32
E-mail: a.bilewicz@ichtj.waw.pl

Warszawa 15.05.2015

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Piekielej, „Synteza cyklicznych analogów endomorfiny-2 o potencjalnym działaniu przeciwbólowym” wykonanej w Zakładzie Chemii Biomolekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Janeckiej.

Mimo niezwykłego postępu biologii molekularnej oraz syntezy chemicznej nie zostały jeszcze opracowane satysfakcjonujące sposoby terapii wielu chorób, między innymi leczenia bólu. Walką z bólem i metodami jego łagodzenia ludzkość zajmuje się od wielu wieków. Pierwsze zapiski o środkach przeciwbólowych pochodzą sprzed 3000 lat. Już wtedy opium, czyli wysuszony sok z niedojrzałych makówek, było lekiem stosowanym do uśmierzania silnego bólu i poprawy samopoczucia. Na początku XIX wieku wyizolowano z opium jego główny składnik - morfinę, a 120 lat później ustalono jej strukturę.

Dużym krokiem w leczeniu bólu było odkrycie endomorfina, które dało początek intensywnym badaniom, mającym na celu znalezienie nowych efektywnych i niezależających leków przeciwbólowych. Badano także zależności pomiędzy ich strukturą a aktywnością biologiczną. W celu zwiększenia stabilności endomorfina modyfikowano je przez wprowadzanie aminokwasów z szeregu D oraz aminokwasów nienaturalnych. Wprowadzenie do sekwencji peptydu D-aminokwasu zwiększa jego stabilność ponieważ większość enzymów proteolitycznych nie hydrolizuje wiązań peptydowych powstałych z udziałem aminokwasów o konfiguracji D. Jednak D-aminokwas może wymuszać inną konformację łańcucha peptydowego, powodując utratę powinowactwa peptydu do receptora. W przypadku endomorfina kolejne zastępowanie reszt aminokwasowych ich D-izomerami nie dało aktywnych analogów. Inną metodą zwiększenia odporności na działanie peptydaz jest cyklizacja liniowych sekwencji. Pozwala ona na ograniczenie swobody konformacyjnej cząsteczki i często przez to zwiększa powinowactwo względem danego typu receptora. Dodatkowo cyklizacja może zwiększyć lipofilowość peptydu co umożliwia jego łatwiejsze przekroczenie bariery krew-mózg. Tym zagadnieniem zajęła się mgr Justyna Piekielejna w swojej pracy doktorskiej.

Celem przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej było znalezienie nowych cyklicznych analogów endomorfiny EM-2 o potencjalnych właściwościach przeciwbólowych.

Praca ma układ pięciu zebranych publikacji poprzedzonych 25 stronicowym wstępem. We wszystkich pięciu pracach mgr Piekielna jest pierwszym autorem i zostały one opublikowane w bardzo dobrych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Pierwsza z załączonych publikacji ma charakter pracy przeglądowej. Warto także dodać, jak znalazłem w Bazie Web of Science, że mgr Piekielna jest w sumie współautorką 11 publikacji, co jak dla doktoranta jest wynikiem imponującym.

W krótkim wstępie autorka zamieściła na początku część teoretyczną, którą poświęciła metodom cyklizacji analogów peptydów opioidowych. Opisała ona krytycznie różne dotychczas stosowane metody cyklizacji. W zasadzie jest to skrót załączonej publikacji przeglądowej (nr. 1) W dalszej części zostały krótko omówione otrzymane wyniki i wnioski.

W pracy nr 2 i 3 opublikowanych w czasopismach Peptides i Org. Biol. Chem. Autorka zajęła się badaniem procesu cyklizacji analogów endomorfiny-2 poprzez wiązanie amidowe lub poprzez mostek disiarczkowy. W czasie cyklizacji poprzez wiązanie amidowe obok monomerów mgr Piekielna obserwowała powstawanie znacznych ilości cyklicznych dimerów. W przypadku związków cyklizowanych poprzez mostek disiarczkowy powstawania dimerów nie obserwowała, gdy reakcja cyklizacji prowadzona była nie na żywicy lecz w roztworze.

W dalszych badaniach Autorka badała wpływ wielkości pierścienia na stosunek powstających struktur dimerycznych do monomerycznych. Stwierdziła także, że wprowadzenie reszty Dmt zamiast Tyr zmniejszało proces dimeryzacji poprzez zawadę przestrzenną wynikającą z obecności dwóch grup metylowych. Kluczowe dla otrzymania wyłącznie czystego monomeru okazało się zastosowanie do syntezy innej żywicy MBHA Amide,

W dalszej kolejności mgr Piekielna zajęła się badaniem właściwości farmakologicznych otrzymanych analogów. Cykliczne peptydy zawierające mostek disiarczkowy okazały się trudno rozpuszczalne w wodzie i z tego powodu nie były dalej badane. Badania otrzymanych przez autorkę peptydów o różnej wielkości pierścienia, cyklizowanych przez wiązanie amidowe wykazały, że peptyd zawierający 14-członowy pierścień jest całkowicie selektywny do receptora MOP i ma subnanomolowe powinowactwo do tego receptora. Tę część pracy oceniam bardzo wysoko. Autorce dzięki pracochłonnym badaniom różnych parametrów syntezy udało się zsyntezować monomeryczny peptyd cykliczny o dużym powinowactwie do receptora MOP i ustalić zależność powinowactwa receptorowego od wielkości pierścienia. Sądzę, że wyniki przeprowadzonych badań będą mogły przyczynić się do projektowania w przyszłości peptydomimetyków o jeszcze lepszych właściwościach farmakologicznych.

W kolejnej pracy mgr Piekielna zajęła się syntezą i badaniem analogów peptydu Tyr/Dmt-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH₂, którego sztywność zwiększono poprzez zastąpienie lizyny przez cis lub trans 4-aminodicykloheksyloalaninę. Podobnie jak w przypadku poprzednich badań dotyczących cyklizacji przez tworzenie mostków disiarczkowych, monomeryczne formy udało się autorce otrzymać poprzez syntezę w roztworze. Otrzymane peptydy badane były pod kątem ich powinowactwa do receptorów opioidowych. Autorka stwierdziła, że analog zawierający izomer cis-ACAla wiąże się jedynie z receptorem MOP, podczas gdy peptyd z izomerem trans wykazuje powinowactwo zarówno do receptora MOP jak i DOP.

W ostatniej z załączonych prac mgr Piekielna zsyntezowała analogi peptydu Tyr/Dmt-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH₂, gdzie zamiast fenyloalaniny w pozycji 3 i 4 wprowadziła fluorowane pochodne tego aminokwasu. Autorka spodziewała się uzyskać zwiększenie trwałości oraz lipofilowości peptydu. Spośród zsyntezowanych peptydów wybrała do badań *in vivo* w teście przeciwbólowym dwa analogi o najwyższym powinowactwie do receptorów MOP i KOP, Dmt-c[D-Lys-Phe-4-F-Phe-Asp]NH₂ i Dmt-c[D-Lys-Phe-2,4-F-Phe-Asp]NH₂. Wyniki badań potwierdziły założenia autorki. Oba peptydy działały silniej przeciwbólowo niż endomorfina-2. Wprowadzenie fluorowanych aminokwasów spowodowało także zwiększenie lipofilowości, ponieważ peptydy te były zdolne do przejścia przez barierę krew-mózg. Na podstawie przeprowadzonych badań mgr Piekielna wysunęła ogólną koncepcję, że cząsteczki peptydów o mieszanym powinowactwie do receptorów MOP i KOP wywołują silniejszy efekt przeciwbólowy i mniej efektów ubocznych niż peptydy selektywnie łączące się z receptorem MOP.

Ostatecznie autorka sformułowała 6 wniosków, które bezpośrednio wynikają z uzyskanych wyników i są odpowiedzią na postawiony cel pracy.

Przedstawiona do recenzji praca zawiera bardzo dużą ilość materiału eksperymentalnego. Przeprowadzono szereg syntez i wszechstronnych badań. Ponieważ wszystkie wyniki zamieszczone w pracy zostały opublikowane w dobrych czasopismach poprawność stosowanej metodyki została już zweryfikowana przez recenzentów. Ponieważ jednak publikacje są wieloautorskie i uczestniczyły w nich parę ośrodków brakuje mi we wstępie informacji jakie badania zostały przeprowadzone przez autorkę, a jakie zostały wykonane przez współautorów. W klasycznej pracy doktorskiej zazwyczaj jest to jasno wyodrębnione i pozwala na łatwiejszą ocenę. Myślę, że w trakcie obrony pracy doktorskiej zostanie to wyjaśnione.

Moja uwaga dotyczy także braku wyników badań dotyczących lipofilowości zsyntezowanych i badanych peptydów. Jak słusznie zaznacza autorka lipofilowość jest jednym z głównych parametrów odpowiadających za skuteczność przeciwbólową otrzymanych związków ponieważ istotnie wpływa na możliwość przekroczenia bariery krew/mózg. Jednak w załączonych publikacjach ani we wstępie nie znalazłem żadnych danych ilościowych dotyczących badań lipofilowości. Porównanie lipofilowości otrzymanych peptydów mogłoby także pomóc zinterpretować wyniki skuteczności zsyntezowanych peptydów.

Brakuje mi także we wstępie szerszego podsumowania otrzymanych wyników. Wstęp kończy sześć krótkich wniosków odnoszących się do każdej pracy. Sądzę, że można by się pokusić na porównanie własności zsyntezowanych w czterech pracach analogach i porównać jaka zaproponowana metoda cyklizacji i podstawiania aminokwasów prowadzi do syntezy najbardziej trwałych i selektywnych analogów.

W podsumowaniu stwierdzam, że tematyka pracy doktorskiej mgr Justyny Piekielej z punktu widzenia naukowego i aplikacyjnego jest bardzo aktualna i nowatorska. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością dziedziny, której dotyczy praca. Wyniki przedstawione w rozprawie w sposób istotny poszerzają wiedzę na temat możliwości otrzymywania i wykorzystania nowych analogów endomorfina w terapii przeciwbólowej.

Dlatego z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Justyny Piekielej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się z propozycją wyróżnienia rozprawy ze względu na jej innowacyjny charakter, otrzymanie bardzo wartościowych wyników i możliwość zastosowania uzyskanych wyników w projektowaniu i otrzymaniu nowych efektywnych leków przeciwbólowych.

A. Milewicz