



**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](mailto:a.bilewicz@ichtj.waw.pl)

Warszawa 09.05.2023

---

---

**Ocena rozprawy doktorskiej mgra Karola Wtorka „Synteza i charakterystyka farmakologiczna nowych analogów o mieszanym powinowactwie do receptorów odpowiedzialnych za modulację efektów bólowych” wykonanej w Zakładzie Chemii Biomolekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Janeckiej.**

Mimo niezwyklego 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 przed 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. Morfina oddziałuje bardzo silnie na zlokalizowane w mózgu receptory opioidowe. Jednak przy podawaniu morfiny występują niepożądane efekty uboczne, takie jak mdłości, wymioty, zahamowanie perystaltyki jelit, depresja oddechowa, a przy jej dłuższym stosowaniu silne uzależnienie fizyczne oraz rozwój tolerancji. Dlatego po poznaniu struktury morfiny i opracowaniu jej syntezy chemicznej zajęto się syntezą jej analogów, które mogłyby powodować mniej efektów ubocznych w tym szczególnie uzależnienia i tolerancji. Jednakże tą drogą nie uzyskano przełomowych efektów.

Innym obiecującym kierunkiem są związki peptydowe aktywujące receptory opioidowe. Występujące w organizmie endogenne peptydy charakteryzowały się zazwyczaj niezbyt dużym powinowactwem receptorowym oraz selektywnością, pozwoliły jednak na rozpoczęcie poszukiwań ich analogów o większym powinowactwie i aktywności. Zaobserwowano również, że podawanie mieszaniny leków i tym samym aktywacja dwóch receptorów opioidowych jednocześnie jest bardziej korzystna niż tylko jednego receptora. Zapoczątkowało to badania nad projektowaniem i syntezą ligandów, które w jednej cząsteczce posiadają fragmenty aktywujące dwa różne receptory. Ponieważ receptory opioidowe nie są jedynymi zaangażowanymi w procesy bólowe zaprojektowano także tzw. ligandy biwalentne, aktywujące jednocześnie receptor opioidowy oraz inny, związany z przekazywaniem bólu. Otrzymane leki mogą aktywować różne mechanizmy transmisji bólu, powodując silniejsze

działanie i zmniejszenie efektów ubocznych. Takimi układami mogą być na przykład połączenia opioidu z antagonistą receptora NK1, który blokuje sygnały indukowane przez substancję P, która ma działanie pro-bólwe.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska miała dwa główne cele badawcze:

1. Synteza oraz określenie właściwości *in vitro* nowych analogów opioidowych zawierających niebiałkowe aminokwasy,
2. Otrzymanie peptydów hybrydowych o mieszanym powinowactwie do receptorów odpowiedzialnych za modulację efektów bólowych.

Praca ma układ sześciu zebranych publikacji poprzedzonych 30-stronicowym wstępem. We wszystkich sześciu pracach mgr Wtorek jest pierwszym autorem i zostały one opublikowane w dobrych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Dwie z załączonych publikacji mają charakter pracy przeglądowej. Warto także dodać, jak znalazłem w Bazie Web of Science, że mgr Wtorek jest współautorem w sumie 11 publikacji, co jak dla doktoranta jest wynikiem bardzo dobrym.

We wstępie autor zamieścił na początku część dotyczącą źródeł i metod leczenia bólu a następnie opisał poszczególne receptory opioidowe oraz ligandy tych receptorów, zarówno agonistów jak i antagonistów. W dalszej części opisane zostały receptory neurokininowe, oraz agoniści i antagoniści tych receptorów. Autor nie opisał szerzej receptorów NOP, ale ich opis oraz opis ligandów tych receptorów znalazł się w dołączonej pracy przeglądowej „Potential of nociceptin/orphanin FQ peptide analogs for drug development” Na końcu krótko zostały opisane dwufunkcyjne ligandy opioidowe oraz ligandy biwalentne. Tutaj także szerszy opis tych układów można znaleźć w załączonej pracy przeglądowej „The search for opioid analgesics with limited tolerance liability”. W dalszej części autor omówił poszczególne oryginalne prace załączone do pracy doktorskiej.

W załączonej pracy nr.1 „Endomorphin-2 analogs containing modified tyrosines: Biological and theoretical investigation of the influence on conformation and pharmacological profile” autor opisał syntezę i właściwości czterech nowych analogów endomorfiny-2 modyfikowanych w pozycji 1. Modyfikacje te polegały na otrzymaniu analogów zawierających Tyr z grupą OH w pozycji meta, Tyr podstawioną w pozycjach 3', 5' lub dodatkowo podstawioną chlorem w pierścieniu Dmt. Jeden z nowych analogów, [Dmt(3'-Cl)1]EM-2, miał większe powinowactwo do receptorów MOR oraz większą lipofilowość zmierzoną w układzie n-oktanol-woda, co powinno zwiększyć jego przenikanie przez barierę krew-mózg. Dokowanie tego peptydu do receptora MOR pokazało na oddziaływanie typu chloro- $\pi$  z indolem Trp293 i

imidazolem His297 receptora. Wyniki tej interesującej pracy otwierają drogę do otrzymywania nowych leków na bazie endomorfiny-2 o lepszych właściwościach przeciwbólowych.

W pracy nr 5 "Synthesis, Pharmacological Evaluation, and Computational Studies of Cyclic Opioid Peptidomimetics Containing  $\beta$  3-Lysine" opublikowanej w czasopiśmie *Molecules* autor zajął się modyfikacją poprzednio otrzymanego w zespole cyklicznego peptydu Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH<sub>2</sub> wykazującego duże powinowactwo do MOR i KOR. Związek ten wykazywał w testach *in vivo* silne działanie przeciwbólne u myszy. W ramach pracy doktorskiej mgr Wtorek zmodyfikował peptyd poprzez wprowadzenie  $\beta^3$ -Lys o konfiguracji R lub S i zbadał wpływ takiej modyfikacji na powinowactwo do receptorów opioidowych. Okazało się, że jedynie peptyd zawierający (R)- $\beta^3$ -Lys był w stanie selektywnie wiązać i aktywować MOR. W drugiej modyfikacji cyklopeptyd nie wykazywał powinowactwa do żadnego z receptorów opioidowych, co pokazało że powinowactwo tych cyklopeptydów do receptorów opioidowych zależy od konfiguracji użytego  $\beta$ -aminokwasu.

Następne dwie publikacje dotyczą badania powinowactwa receptorowego i działania przeciwbólowego peptydów hybrydowych, oddziaływujących jednocześnie z dwoma typami receptorów, MOR/NK1 oraz MOR/NOP. Inspiracją do tych prac była obserwacja, że aktywacja tylko jednego typu receptora nie wystarcza do uzyskania odpowiedniego efektu przeciwbólowego i zmniejszenia skutków obocznych. Logicznym rozwiązaniem tego problemu jest synteza związków hybrydowych, które mogą działać niezależnie na dwa receptory. W pierwszej pracy „Synthesis and pharmacological evaluation of hybrids targeting opioid and neurokinin receptors,„ opublikowanej w czasopiśmie *Molecules* autor zsyntezował hybrydowe analogi zawierające jako część opioidową cyklopeptyd Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH<sub>2</sub> o dużym powinowactwie do MOR i KOR oraz antagonistę receptora NK1, C-terminalny fragment spantidu II lub agonistę C-końcowy fragment substancji P o długości od 3 do 6 aminokwasów. Okazało się, że tylko hybrydy zawierające 6-cio członowe fragmenty spantidu II lub SP wykazywały wysokie powinowactwo do NK1. W dalszych badaniach *in-vivo* autor wykazał, że tylko dwa z badanych związków agonista opioidowy/antagonista NK1 oraz agonista opioidowy/agonista NK1 wykazywały właściwości przeciwbólne, przy czym efekt był zależny od dawki. Był to wynik zaskakujący gdyż można się spodziewać, że efekt przeciwbólowy będzie znacznie większy dla hybrydy zawierającej antagonistę receptora NK1 spantid II. Niestety autor nie przedyskutował tego zjawiska.

Ważną obserwacją był fakt, że oba badane *in vivo* analogi nie powodowały, w przeciwieństwie do referencyjnego cyklopeptydu Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH<sub>2</sub>, rozwoju tolerancji ani zaparc, które zazwyczaj towarzyszą stosowaniu opioidów.

W tej części pracy brakuje mi jednak badań trwałości hybryd z fragmentami substancji P w surowicy krwi. Wiadomo jest, że zarówno substancja P jak jej fragmenty nie są trwałe w organizmie ulegając rozpadowi enzymatycznemu. Z tego powodu w radiofarmacji, w dziedzinie w której pracuję, zamiast substancji P stosuje się jednak jej trwalsze zmodyfikowane analogi z zamienionymi aminokwasami w pozycji 8 (Phe na Thi) i 11 (Met na utl.Met).

Następna praca zatytułowana Biological activity and molecular docking of chimeric peptides targeting opioid and NOP receptors została opublikowana w International Journal of Molecular Science i dotyczyła hybryd wykazujących powinowactwo do receptorów opioidowych oraz do receptora NOP, przy czym fragmentem opioidowym, był ten sam jak w poprzedniej pracy cyklopeptyd, a fragmentem łączącym się z receptorem NOP był znany z literatury syntetyczny peptyd Ac-RYYRIK-NH<sub>2</sub>. Oba fragmenty zostały połączone bezpośrednio lub za pomocą sekwencji Gly-Gly-Gly. Obie hybrydy wykazywały powinowactwo do receptorów MOR i KOR, ale tylko hybryda bez łącznika aktywowała receptor NOP. Brak aktywacji receptora NOP wytłumaczono wynikami obliczeń dopasowania do receptora. Przeprowadzone badania *in-vivo* potwierdziły występowanie efektu przeciwbólowego w wyniku stosowania badanej hybrydy oraz, że w wywoływaniu efektu przeciwbólowego brały udział zarówno receptory opioidowe jak i NOP.

W podsumowaniu mgr Wtorek sformułował 14 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 a także wszechstronnych badań, w tym *in-vivo*. Ponieważ wszystkie wyniki zamieszczone w pracy zostały opublikowane w dobrych czasopiśmie poprawność stosowanej metodyki badań została już zweryfikowana przez recenzentów. Zamieszczone w rozprawie publikacje są wieloautorskie i zostały wykonane w paru ośrodkach. Brakuje mi jednak we wstępie informacji jakie badania zostały przeprowadzone przez autora, a jakie zostały wykonane przez współautorów. W klasycznej rozprawie doktorskiej zazwyczaj jest to jasno wyodrębnione i pozwala na łatwiejszą ocenę. Myślę, że w trakcie obrony pracy doktorskiej zostanie to wyjaśnione.

Brakuje mi także w załączonym wstępie szerszego podsumowania otrzymanych wyników. Wstęp kończą krótkie wnioski odnoszące się do poszczególnych przedstawionych publikacji. Sądzę, że na podstawie wszystkich publikacji można by się pokusić na sformułowanie szerszych ogólniejszych wniosków.

W podsumowaniu stwierdzam, że tematyka pracy doktorskiej mgra Karola Wtorka z punktu widzenia naukowego i aplikacyjnego jest bardzo aktualna i nowatorska. Doktorant

wykazał się dobrą znajomością dziedziny, której dotyczy praca. Wyniki przedstawione w rozprawie w sposób istotny poszerzają wiedzę na temat możliwości otrzymywania i wykorzystania nowych peptydowych analogów w terapii przeciwbólowej a także peptydów hybrydowych, oddziałujących jednocześnie z dwoma typami receptorów, MOR/NK1 oraz MOR/NOP. Trzeba także podkreślić, że praca jest napisana bardzo starannie, zrozumiale, dobrym i jasnym językiem. Nie znalazłem w zasadzie żadnych błędów językowych.

Wobec powyższego stwierdzam, że oceniana praca mgra Karola Wtorka „Synteza i charakterystyka farmakologiczna nowych analogów o mieszanym powinowactwie do receptorów odpowiedzialnych za modulację efektów bólowych” w pełni spełnia kryteria dla rozpraw doktorskich określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668) i z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgra Karola Wtorka 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.

