



POLITECHNIKA GDAŃSKA

dr hab. inż. Paweł Sachadyn, prof. PG
Laboratorium Biotechnologii Regeneracyjnej
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
email: psach@pg.edu.pl, tel. 58 347 2671

Gdańsk, 15 lipca 2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Kreczko-Kurzawy pt. „Rola wybranych inhibitorów enkefalinaz w biologii nowotworu jelita grubego. Projektowanie i synteza związków o charakterze przeciwnowotworowym w oparciu o strukturę sialorfiny”

Rozprawa doktorska Doktorskiej mgr Joanny Kreczko-Kurzawy zatytułowana „Rola wybranych inhibitorów enkefalinaz w biologii nowotworu jelita grubego. Projektowanie i synteza związków o charakterze przeciwnowotworowym w oparciu o strukturę sialorfiny” została wykonana w Katedrze Biotechnologii Molekularnej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Skowrona oraz poprzedniego promotora, śp. prof. dr hab. Zbigniewa Maćkiewicza, który przekazał doktorantce temat rozprawy. Dysertacja p. Kreczko-Kurzawy przedstawia wyniki prac obejmujących syntezę inhibitorów enkefalinaz, czyli enzymów degradujących peptydy opioidowe i badań w modelach komórkowych przeprowadzonych z zamiarem oceny ich potencjału przeciwnowotworowego.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Kreczko-Kurzawy liczy 229 stron, na które składają się: spis treści, wykaz skrótów, cel pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp teoretyczny (98 stron), materiały i metody (31 stron), rozdział z wynikami badań biologicznych (55 stron), dyskusja wyników i wnioski (5 stron), podsumowanie i bibliografię zawierającą 501 pozycji. W manuskrypcie umieszczono 59 wykresów, 17 tabel oraz 48 rysunków wykonanych przez Autorkę.

Doktorantka przygotowała bardzo starannie obszerny wstęp stanowiący wprowadzenie do tematyki leków opioidowych oraz endogennych i egzogennych peptydów i metaloproteaz, które regulują

ich aktywność w organizmie. Chociaż głównym zadaniem Doktorantki była synteza peptydów i ocena ich aktywności przeciwnowotworowej, w swoim wprowadzeniu przedstawia ona z ogromną wnikliwością nie tylko wiedzę o strukturze i biosyntezie peptydów opioidowych, enkefalinaz, głównie neprylizyny i aminopetydazy N oraz ich peptydowych inhibitorów, ale również aspekty neurologiczne, biochemiczne, fizjologiczne, farmakologiczne i behawioralne funkcjonowania układu opioidowego. Autorka opisuje przeciwbólowe aktywności opioidów i peptydów opioidowych, ale także ich działanie przeciwzapalne, przeciwdepresyjne, ich wpływ na zachowania seksualne, zaburzenia snu, regulację ciśnienia krwi. Autorka podkreśla, że peptydy opioidowe nie wykazują efektów toksycznych i nie powodują uzależnień, jednak z uwagi na szybką degradację proteolityczną uzyskanie efektu terapeutycznego wymaga zastosowania inhibitorów enzymów je degradujących. Rola peptydów opioidowych i enkefalinaz została najlepiej rozpoznana w układzie nerwowym, ale ponieważ zmiany ekspresji enkefalinaz obserwuje się w różnych nowotworach, Autorka zwraca uwagę na przeciwnowotworowy potencjał ich inhibitorów, głównie sialorfiny i opiorfiny, jednocześnie podkreślając potrzebę modyfikacji strukturalnych, które zwiększyłyby ich stabilność i biodostępność, w ten sposób objaśniając znaczenie swoich badań.

Rozdział „Materiały i metody” oprócz danych metodologicznych dotyczących przygotowania analogów sialorfiny i opiorfiny przedstawia także wyniki syntezy z uwzględnieniem uzyskanej wydajności i czystości. Doktorantka opisuje wyniki syntezy opiorfiny i jej siedmiu analogów oraz sialorfiny i jej 23 analogów, w których wykonała takie modyfikacje jak skan alaninowy, amidację, acetylację, dołączenie reszty kwasu liponowego, włączenie tioproliny, cyklizację N-końcowej glutaminy. Rozdział ten nie uwzględnia natomiast metodyki badań w modelach komórkowych. W mojej opinii ujęcie wyników syntez w części poświęconej wynikom lepiej oddałoby wysiłek eksperymentalny Doktorantki.

Istotna część rezultatów zawarta została w rozdziale zatytułowanym „Badania biologiczne”. Myślę, że trafniejszym rozwiązaniem byłoby nadanie tej części typowego w rozprawach doktorskich tytułu „Wyniki”. Przedstawione rezultaty badań obejmują ocenę właściwości przeciwdrobnoustrojowych, hemotoksyczności oraz działania sialorfiny i jej dziesięciu analogów na komórki nowotworowe. Badania aktywności przeciwnowotworowej obejmują testy wpływu na proliferację wykonane dla sześciu stężeń peptydów i kontroli na liniach komórek ostrej białaczki monocytarnej THP-1 i linii komórkowej pierwszego stadium ludzkiego raka jelita grubego HT-29 oraz testy wpływu na żywotność i proliferację przeprowadzone na linii komórkowej pierwotnego gruczolaka jelita grubego LS180 i linii komórkowej pochodzącej z przerzutu nowotworu raka jelita grubego do węzłów chłonnych SW620 przedstawione dla czterech stężeń peptydów w odniesieniu do kontroli. Jako komórki referencyjne zastosowano linię ludzkich fibroblastów HSF. Użyte linie komórkowe wykazują ekspresję neprylizyny (LS180, SW620, HT-29) lub aminopeptydazy N (THP-1). W testach aktywności hemolitycznej zastosowano jako dodatkowe odnośniki amfoterycynę B i TritonX-100, natomiast w testach żywotności, peptydomimetyk tiorfan, inhibitor neprylizyny. W rozdziale

tym Autorka odnotowała też wstępne wnioski: nie zaobserwowano istotnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej i hemolitycznej badanych peptydów, natomiast wykazano szereg różnic w działaniu na proliferację i żywotność komórek nowotworowych między testowanymi analogami sialorfiny. Wyniki przedstawiają bardzo szeroki zakres wykonanych badań i są pokazane w przejrzysty sposób. Jednak warto byłoby dodatkowo zestawzić aktywność antyproliferacyjną badanych analogów w odniesieniu do sialorfiny, a nie tylko porównywać z działaniem na komórki kontrolne. Nie znalazłem informacji, jak wykonano statystyczną analizę wyników. Różnic istotnych statystycznie nie zaznaczono na histogramach, a jedynie w tabelach zawierających wyniki. Autorka nie określa, w ilu powtórzeniach wykonano testy na komórkach, a także, czy powtórzenia polegały na wykonaniu kilku niezależnych eksperymentów hodowli, czy tylko na kilkakrotnie przeprowadzonych pomiarach na komórkach z tej samej hodowli. Poza tym Doktorantka niepotrzebnie podaje w opisie wyników naukowych wartość współczynnika wpływu (IF) czasopisma, w którym opublikowano część rezultatów - takie informacje należy umieścić w zestawieniu dorobku naukowego.

Przedstawione wyniki badań biologicznych Doktorantka wykonała we współpracy z zespołami naukowymi z Zakładu Wirusologii i Immunologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie (testy na liniach komórek nowotworowych) oraz z Katedry Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej (aktywność przeciwdrobnoustrojowa). Efektywne wykorzystanie możliwości współpracy naukowej ma podstawowe znaczenie dla sukcesu badań i uważam je za duży atut pracy p. Joanny Kreczko-Kurzawy.

Wyjątkowo obszerna bibliografia liczy 501 artykułów naukowych, a cytowania wykonane są prawidłowo. Poprawność językowa i terminologiczna oraz poziom edytorski rozprawy są w pełni zadowalające. Szczególnie chciałbym docenić niezwykle starannie przygotowaną liczącą 22 strony tabelę zawierającą opracowanie struktur i charakterystyk wybranych inhibitorów enkefalinaz. Podczas lektury rozprawy natknąłem się na stosunkowo nieliczne uchybienia edytorskie, za wyjątkiem niezgodności numeracji rozdziałów w spisie treści z numeracją w tekście począwszy od rozdziału 5.1.1. Ponadto, na s. 72 Autorka pisze „trzy peptydy pochodzenia naturalnego”, ale wymienia tylko dwa, opiorfinę i sialorfinę, a w tytule Tabeli 17 oprócz analogów sialorfiny wymienia tiorfan, chociaż Tabela 17 nie zawiera wyników dla tego inhibitora.

Na uznanie zasługuje bardzo obszerny i różnorodny dorobek naukowy p. Kreczko-Kurzawy, która jest współautorem siedmiu publikacji, w tym dwóch z listy filadelfijskiej, dwóch krajowych zgłoszeń patentowych i rozdziału w książce. P. Kreczko-Kurzawa była też współautorem 11 wystąpień ustnych i 26 posterów, głównym wykonawcą w dwóch projektach grantowych „OPUS” finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, kierownikiem dwóch grantów przyznanych w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich. Ponadto p. Kreczko-Kurzawa uzyskała szereg wyróżnień, w tym Nagrodę Marszałka Województwa Kujawsko-Pomorskiego w konkursie

na najlepszy komunikat naukowy ustny oraz pierwsze miejsce w konkursie na najlepszy naukowy komunikat posterowy w sekcji nauk chemicznych na V Kopernikańskim Seminarium Doktorantów w Toruniu, a także stypendium w ramach projektu kompleksowego programu rozwoju doktorantów, młodych doktorów i akademickiej kadry dydaktycznej UG „Kształcimy najlepszych”. Szczególnie podkreślić chciałbym wyjątkową aktywność p. Joanny Kreczko-Kurzawy w zakresie popularyzacji nauki i współpracy z przemysłem, czyli jej udział w jedenastu różnych inicjatywach, w tym np. pomysł i organizację konferencji dla studentów i doktorantów pt. „Człowiek Nauka Środowisko”, pomysł i organizację „Pomorskich Spotkań Piwowarów” oraz autorskie opracowanie pokazów doświadczeń chemicznych „Laboratorium alchemika”. Wprawdzie przedstawiony dorobek publikacyjny p. Joanny Kreczko-Kurzawy nie spełnia formalnych wymogów do postawienia wniosku o wyróżnienie doktoratu na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, ale nieprzeciętna aktywność Doktorantki zasługuje na szczególne uznanie.

Dyskusja wyników i klarowne ich podsumowanie nie budzą zastrzeżeń. Jednak zainspirowany lekturą tej pracy chciałbym przedstawić poniżej kilka uwag i poprosić Doktorantkę, aby się do tych uwag odniosła.

1. Celowe byłoby wyjaśnienie, dlaczego w testach biologicznych wykorzystano tylko część syntetyzowanych peptydów. Nie sugeruję, że wykonano za mało oznaczeń, gdyż przedstawiony program badawczy był więcej niż intensywny, ale interesujące jest, jakie były kryteria wyboru związków do badań.
2. Jak można wytłumaczyć zmniejszenie aktywności antyproliferacyjnej peptydów z N-końcową resztą kwasu p-glutaminowego (pQHNPR-NH₂ i pQHNPR-OH) wraz ze wzrostem ich stężeń pokazane na wykresach 10 i 11?
3. Dlaczego w badaniach na komórkach LS180 i SW620 nie użyto czterech analogów sialorfiny testowanych na liniach HT-29 HTP-1, zwłaszcza Ac-QHNPR-NH₂, który dość silnie (o około 40%) obniżał proliferację komórek HT-29?
4. Jak można wytłumaczyć wyraźnie większą wrażliwość na badane analogi sialorfiny komórek SW620 w porównaniu do LS180 (Tab. 17)?
5. W ewaluacji potencjału przeciwnowotworowego sialorfiny i jej analogów przydatne byłoby porównanie do aktywności antyproliferacyjnej jakiegoś stosowanego leku przeciwnowotworowego.
6. To zrozumiałe, że wstępna ocena aktywności przeciwnowotworowej analogów sialorfiny polega na zbadaniu wpływu na proliferację komórek nowotworowych. Czy Doktorantka widzi jednak możliwość oceny potencjału przeciwnowotworowego inhibitorów enkefalinaz w bardziej złożonych modelach, poprzez badanie ich działania regulatorowego na funkcjonowanie niezwykle złożonego układu opioidowego?

Podsumowując, chciałbym podkreślić szeroki zakres wykonanych przez Doktorantkę badań obejmujących syntezy chemiczne i badania biologiczne, który wymagał niewątpliwie wielkiego nakładu pracy. Ocena zależności między strukturą i aktywnością przeciwnowotworową analogów sialorfiny w komórkach nowotworu okrężnicy stanowi cenny i oryginalny wynik naukowy p. Joanny Kreczko-Kurzawy. Zaznaczam, że podniesione wyżej pytania i uwagi krytyczne nie pomniejszają mojej wysokiej oceny tej rozprawy doktorskiej.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca mgr Joanny Kreczko-Kurzawy pt. „Rola wybranych inhibitorów enkefalinaz w biologii nowotworu jelita grubego. Projektowanie i synteza związków o charakterze przeciwnowotworowym w oparciu o strukturę sialorfiny” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym warunki art. 13 ustawy Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego o stopniach naukowych i tytule naukowym wraz z późniejszymi zmianami. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pani mgr Joanny Kreczko-Kurzawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

