

Gdańsk, dnia 7 października 2016 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Oliwii Frączak

p.t. „Synteza i właściwości biologiczne „biwalentnych” ligandów receptorów opioidowych”

Przeciwbólowe działanie opium znane było od dawna, ale dopiero wyodrębnienie i poznanie struktury chemicznej, na początku XIX wieku, jego głównego składnika – morfiny umożliwiło badania nad mechanizmem jego działania. Z kolei dzięki opracowaniu w 1917 roku przez Trendelenburga prostego oznaczenia aktywności opiatów, polegającego na wykorzystaniu zjawiska hamowania ruchu robaczkowego izolowanego jelita świnki morskiej, rozpoczęły się badania na ich receptorami. Połowa XX wieku przynosi kolejne ważne odkrycia, poznanie struktury pierwszorzędowej pierwszych peptydów opioidowych – Leu- i Met-enkefaliny oraz wyróżnienie trzech typów receptorów opioidowych - μ , δ i κ . Odkrycie peptydów opioidowych spowodowało w latach 70. i 80. ubiegłego wieku ogromne zainteresowanie tą grupą analgetyków. Dotychczas znane, oprócz wielu efektów ubocznych, prowadzą także do rozwoju tolerancji na terapeutyk i uzależnienia. Niestety nadzieje, że peptydy opioidowe o strukturach identycznych lub bardzo zbliżonych do związków endogennych będą przynajmniej częściowo pozbawione tych cech okazały się nieuzasadnione. Dodatkowy problem to ich duża podatność na proteolizę, znacznie ograniczająca możliwe drogi podania. Interesujące podejście do projektowania związków wykazujących powinowactwo do receptorów opioidowych zaproponował prof. A. Lipkowski. Otrzymana w Jego zespole w latach 80. ubiegłego wieku bifalina, w której C-końcowe grupy karboksylowe dwóch

identycznych tetrapeptydów o aktywności opioidowej połączone zostały resztą hydrazyny, wykazała wysoką aktywność przeciwbólową; w niektórych testach *in vivo* wyższą od klasycznych analgetyków, w tym morfiny. Tę zaskakująco aktywność bifalina zawdzięcza możliwości jednoczesnego oddziaływania z więcej niż jednym receptorem opioidowym. W kolejnych latach otrzymano wiele związków o działaniu analgetycznym zbudowanych z dwóch identycznych lub różnych komponentów wykazujących powinowactwo do wybranych receptorów. Hybrydy takie, zwane ligandami biwalentnymi stanowią przedmiot zainteresowania mgr inż. Oliwii Frączak, a uzyskane wyniki zawarte są w Jej rozprawie doktorskiej, którą wykonała pod kierunkiem promotora rozprawy, prof. dr hab. Aleksandry Olmy w Instytucie Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej. W ramach rozprawy Kandydatka zaprojektowała i zsyntetyzowała kilka serii biwalentnych ligandów receptorów opioidowych. Były wśród nich analogi bifaliny, dimeryczne analogi dermofiny, hybrydy fentanylu i enkefaliny, a także dimery tripeptydu Ac-D-Trp-Phe-Gly wykazującego powinowactwo do receptorów opioidowych. Modyfikacje wprowadzane do łańcuchów peptydowych polegały na wymianie α -aminokwasów na β -aminokwasy (β^3 -homo-Phe, β^3 -homo-Phe(4-NO₂), β^3 -homo-Tyr) oraz α -hydroksymetyloaminokwasy (α -HmAla, α -HmVal). Optymalizacji podlegał także łącznik (diaminy) spinający oba komponenty (poprzez ich grupy karboksylowe) syntetyzowanych związków. Synteza obu klas aminokwasów oraz ich wykorzystanie w syntezie biologicznie czynnych peptydów stanowi jeden z głównych nurtów badawczych profesor Aleksandry Olmy. Doświadczenie Promotorki w ich syntezie niewątpliwie ułatwiło Kandydatce rozpoczęcie badań. Jak już wspomniałem, chemiczna synteza peptydów opioidowych ma długą historię. Otrzymano bardzo wiele analogów naturalnie występujących peptydów o takim profilu aktywności. Jak dowodzą liczne doniesienia literaturowe, badania takie są w dalszym ciągu intensywnie rozwijane. Tak więc problematykę badawczą podjętą przez Doktorantkę bez wątpienia należy naliczyć do głównego nurtu współczesnej chemii medycznej. Dodatkowym walorem badań realizowanych w ramach recenzowanej rozprawy jest fakt, iż wszystkie syntezy prowadzone były klasycznymi metodami w roztworze. Ten sposób podejścia jest obecnie rzadko wykorzystywany w syntezie peptydów. Z tego powodu niewielu badaczy posiada takie umiejętności. Tym cenniejsze są kompetencje Doktorantki, jakie nabyła w trakcie realizacji zadań badawczych rozprawy. Osoby z doświadczeniem w zakresie syntezy koniugatów peptydowych są poszukiwane przez firmy farmaceutyczne.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska to 175 stronic tekstu. Układ pracy jest typowy dla tego typu opracowań. Zasadnicze rozdziały pracy to: Cel i Założenia Pracy (3 strony), Część Referatowa (41 stron), Badania Własne (40 stron), Część Eksperymentalna (41

stron). Rozprawę uzupełniają: Podsumowanie, Wykaz skrótów oraz literatury cytowanej (226 pozycji, przy czym niektóre z nich zawierają kilka odnośników). Opis prowadzonych eksperymentów i dyskusja uzyskanych wyników stanowi prawie 70% opracowania. Już ten sam fakt wskazuje na dużą objętość pracy wykonanej przez Kandydatkę.

Przegląd literatury zwany przez Doktorantkę *Częścią Referatową* stanowi monograficzne opracowanie podsumowujące wyniki badań nad biwalentnymi ligandami receptorów opioidowych. Po krótkiej charakterystyce receptorów związanych z białkami G oraz zjawiska ich oligomeryzacji, w kolejnych podrozdziałach Kandydatka przedstawia struktury chemiczne oraz aktywność biologiczną najbardziej aktywnych biwalentnych ligandów receptorów opioidowych, zarówno niepeptydowych, peptydowych jak i mieszanych peptydowo- niepeptydowych. Wyniki te zestawione są w tablicach, a konsekwentna numeracja wszystkich związków w całej rozprawie znacznie podnosi jej przejrzystość. Poziom merytoryczny tego rozdziału jest wysoki, Kandydatka przekonuje, że potrafi analizować i redagować teksty naukowe. Na równie wysoką ocenę zasługuje strona językowa oraz edycja nie tylko tej części rozprawy. Dostrzeżone tu niedociągnięcia są niewielkie. Z obowiązku recenzenta wymienię kilka: w języku polskim rysunek i tabela piszemy z małej litery, poli(tlenek etylenu) niewłaściwie nazwano glikolem etylenowym (str. 40, 42). Określenia „agoniści” „antagoniści” (niecelowa personifikacja) proponuję zamienić na „agony” i „antagony”. W opisach tablic określenie „właściwości” proponowałbym zastąpić innym terminem np. „względne powinowactwo”, „ilość grup metylenowych” zamienić na „liczbę grup metylenowych”, a „antagonizować” (str. 50) na „hamować”, czasownik „mimikować” (str. 43) to niepotrzebna kalka z języka angielskiego. Treści tego rozdziału korespondują bezpośrednio z problematyką badań Kandydatki. W pełni uzasadniają realizowane zadania badawcze. Zakładając jednak, że czytelnikami rozprawy mogą być osoby niedysponujące podstawową wiedzą z zakresu związków opioidowych, za celowe uważałbym dodanie bardzo syntetycznej charakterystyki receptorów opioidowych i ich endogennych peptydów.

Wysoki poziom merytoryczny reprezentuje także kolejny rozdział zatytułowany „Badania własne”. Autorka w bardzo klarowny sposób prezentuje tu stosowane ścieżki syntetyczne, uzasadnia ich wybór, a także porównuje wyniki uzyskane różnymi metodami. W wyniku zastosowania kilkietapowych procedur otrzymuje odpowiednie β -aminokwasy i α -hydroksymetyloaminokwasy. Te ostatnie rozdziela na czyste enancjomery w wyniku krystalizacji ich soli diastereoizomerycznych. Zaprojektowane biwalentne ligandy receptorów opioidowych otrzymuje klasycznymi metodami w roztworze, łącząc odpowiednie fragmenty. Końcowe produkty oczyszcza metodą HPLC w układzie faz odwróconych, a poprawność ich

struktur potwierdza analizą spektrometrii mas. W wyniku przeprowadzonych syntez Doktorantka otrzymała 33 związki chemiczne (hybrydy i koniugaty peptydowe) zaprojektowane pod kątem ich powinowactwa do receptorów opioidowych. Wszystkie związki zostały poddane w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN badaniom biologicznym *in vitro* (oznaczenie powinowactwa do receptorów opioidowych μ i δ), a dwa z nich także *in vivo* (ocena aktywności analgetycznej). W wypadku badań zależności struktura – aktywność, możliwość weryfikacji założeń badawczych, jaką zapewnia harmonijna współpraca (jak w tym wypadku) z grupami biologów decyduje o sukcesie programu badawczego. Analiza uzyskanych wyników wskazuje, że wymiana reszt Phe w pozycjach 4 i 4' na reszty β^3 -homo-Phe(4-NO₂), a także zastąpienie w hybrydach zawierających aktywny fragment dermorfiny, C-końcowych reszt Tyr resztami β^3 -homo-Tyr zwiększa selektywność do receptora μ . Podobny efekt daje podstawienie reszt D-Ala izomerami S-hydroksymetyloaminokwasów (HmAla i HmVal). We wszystkich tych związkach oba komponenty, podobnie jak w bifalinie, łączone były poprzez resztę hydrazyny. Oba analogi bifaliny, oznaczone jako **P1** i **P2**, w warunkach eksperymentu wykazały aktywność przeciwbólową wyższą niż morfina. Doktorantka wykazała też, że wprowadzone modyfikacje zwiększają odporność badanych peptydów na proteolizę. W kontekście poszukiwania związków charakteryzujących się selektywnym powinowactwem wobec poszczególnych receptorów opioidowych, wyniki te są bardzo interesujące. Wskazują, że zarówno β -aminokwasy, jak i hydroksymetyloaminokwasy mogą być z powodzeniem stosowane w modyfikacjach ligandów receptorów opioidowych. Pozostałe związki czyli koniugaty fenantylu oraz hybrydy zaprojektowane na bazie tripeptydu wywiedzionego z sekwencji endomorfiny-1 wykazały wyraźnie niższe powinowactwo niż związki macierzyste. Wyniki te, choć nie spektakularne, nie należy interpretować w kategoriach niepowodzenia. Wieloletnia praktyka badań zależności struktura – aktywność dowodzi, iż spośród ogromnej liczby syntetyzowanych związków, bardzo niewiele cechuje się profilem biologicznym pozwalającym liczyć na ich zastosowanie w praktyce medycznej. Charakterystyka aktywności biologicznej pozostałych, także i tych otrzymanych przez Doktorantkę, stanowi ważną wskazówkę w projektowaniu kolejnych generacji peptydów biologicznie czynnych. Zarówno strona merytoryczna, jak i redakcja także tego rozdziału rozprawy jest na wysokim poziomie, a moje uwagi odnoszą się głównie do strony formalnej. Nie mam wątpliwości, że analizy HPLC, MS i NMR zostały przeprowadzone poprawnie, niemniej w pracy brakuje mi (np. w postaci suplementu na płycie CD) choćby przykładowych chromatogramów, widm mas i NMR. Ich analiza pozwoliłaby czytelnikowi ocenić skalę trudności prowadzonych eksperymentów. Niektóre rysunki (np. 33) są nieczytelne. Odniesienie warunków wewnątrzcząsteczkowej migracji O \rightarrow N (procedura syntetyczna) do fizjologicznych (str. 97) nie ma uzasadnienia. Moje

wątpliwości budzi zapis związków. Po połączeniu diaminą grup α -karboksylowych obu fragmentów peptydowych, w zapisie przyjętym przez Doktorantkę, łańcuch peptydowy drugiego z fragmentów biegnie w przeciwnym kierunku – należałoby to zaznaczyć. Ponadto, umiejscowienie litery określającej konfigurację bezwzględną jest błędne. W całej rozprawie dla asymetrycznych atomów węgla aminokwasów podano ich konfiguracją bezwzględną. Taka forma zapisu praktycznie nie jest stosowana w chemii peptydów i białek. Odporność peptydów na proteolizę badano najprawdopodobniej w surowicy krwi a nie w osoczu (str. 92).

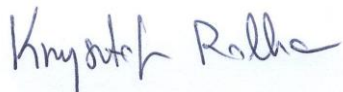
Opisy wykonywanych eksperymentów oraz charakterystyka fizykochemiczna wszystkich związków, w tym substratów i produktów pośrednich zawarta jest w kolejnym rozdziale zatytułowanym „Część eksperymentalna”. Są one precyzyjne, konsekwentna numeracja związków ułatwia lekturę tekstu i świadczy o dużej skrupulatności Kandydatki, tak w trakcie wykonywania eksperymentów, jak i ich opisie. Synteza w roztworze jest bardzo czasochłonna i wymaga dużej sprawności manualnej. Tym samym objętość pracy wykonanej przez Doktorantkę zasługuje na szczególne podkreślenie. Nie mam zastrzeżeń do strony merytorycznej. Sugestia o charakterze edytorskim – ten fragment rozprawy zyskałby na przejrzystości gdyby charakterystykę fizykochemiczną i informację o stosowanych (powtarzających się) procedurach umieścić w tabeli.

Na podstawie lektury rozprawy doktorskiej mgr inż. Oliwii Frączak, nie mam wątpliwości, że jest Ona bardzo dobrze wykształconym chemikiem, zarówno od strony teoretycznej jak też praktycznej. Wysoko oceniam zakres badań przeprowadzonych przez Doktorantkę a także ich objętość. Stosowane przez Nią procedury syntetyczne były wieloetapowe i wymagały dużej biegłości w posługiwaniu się technikami współczesnej chemii organicznej. Kandydata przygotowała bardzo interesującą rozprawę doktorską, a uzyskane przez Nią wyniki zostały w znacznej części już opublikowane w trzech pracach zamieszczonych w czasopiśmie z listy JCR . Moje uwagi krytyczne i sugestie odnoszą się głównie do strony formalnej i mają charakter polemiczny. Nie wpływają na ogólną ocenę dysertacji, a ta jest wysoka.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania ustawowe (Ustawa o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami (Dz.U. z 2016 poz. 882) oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 30 października 2015 roku (Dz. U. z 2015 r. poz. 1842) i zwyczajowe, dlatego wnoszę do

Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr inż. Oliwii Frączak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoką ocenę recenzowanej rozprawy, w tym wartość merytoryczną przeprowadzonych badań oraz fakt opublikowania znacznej części wyników rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

Gdańsk, dnia 7 października 2016 roku

Handwritten signature in blue ink, reading "Krzysztof Rolhe".

Prof. dr hab. Krzysztof Rolka
KIEROWNIK KATEDRY BIOCHEMII MOLEKULARNEJ

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
tel. +48-58-5235088
e-mail: krzysztof.rolka@ug.edu.pl

Gdańsk, dnia 7 października 2016 r.

**Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Oliwii Frączak p.t.
„Synteza i właściwości biologiczne „biwalentnych” ligandów receptorów opioidowych”**

Na podstawie lektury recenzowanej Rozprawy Doktorskiej, a także analizy dorobku naukowego Kandydatki wnosząc do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej o rozważenie wniosku o jej wyróżnienie. Uważam, że mgr inż. Oliwia Frączak spełniła wszystkie kryteria (podlegające ocenie recenzenta) regulaminu wyróżnień prac doktorskich Wydziału Chemicznego PŁ. Argumenty skłaniające mnie do takiego wniosku są następujące:

1. Problematyka rozprawy (poszukiwanie nowych związków o działaniu analgetycznym) należy do głównego nurtu współczesnej chemii medycznej.
2. Wysoki poziom merytoryczny oraz kompletność badań potwierdza fakt, iż duża część wyników została już opublikowana w trzech pracach, które ukazały się w specjalistycznych czasopismach z listy JCR.
3. Wysoki poziom edytorski rozprawy
4. Bardzo dobry dorobek naukowy Kandydatki. Oprócz wymienionych powyżej trzech prac i dwóch zamieszczonych w materiałach pozjazdowych, uzupełniają go trzy prace niewchodzące w zakres badań rozprawy oraz dwie prace przeglądowe opublikowane w Wiadomościach Chemicznych, których treści nawiązują bezpośrednio do problematyki rozprawy. Kandydatka jest także współautorką ponad 20 komunikatów prezentowanych na zjazdach krajowych i międzynarodowych.

Krzysztof Rolka