

dr hab. inż. Julia Gibka
Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa
im. Prezydenta Stanisława Wojciechowskiego w Kaliszu
Wydział Nauk o Zdrowiu
Katedra Kosmetologii

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Urszuli Tałałaj

pt. „Synteza i ocena aktywności biologicznej peptydów sygnałowych”

Praca wykonana pod kierunkiem dr hab. n. farm. Agnieszki Markowskiej

Recenzowana praca doktorska dotyczy syntezy i oceny aktywności biologicznej pochodnych pentapeptydu KTTKS (lizylo treonylo treonylo lizylo seryna, Lys-Thr-Thr-Lys-Ser). Jest to peptyd sygnałowego często stosowanych w kosmetologii i medycynie estetycznej, bowiem wykazuje działanie przeciwstarzeniowe w stosunku do skóry. Peptydy są ciekawą grupą surowców kosmetycznych. Z powodu dużej skuteczności stały się przedmiotem zainteresowania przemysłu kosmetycznego. Ze względu na to, że mają podobną strukturę do składników budulcowych skóry człowieka, stosowanie ich w preparatach kosmetycznych jest jak najbardziej uzasadnione, obniża bowiem ryzyko alergii i podrażnień. Miękka, gładka, elastyczna skóra, pozbawiona przebarwień, zmarszczek jest oznaką zdrowia i młodości. Szczególnie w ostatnich latach obserwuje się dbałość o aktywny, zdrowy styl życia i młody wygląd. Poszukuje się nowych surowców kosmetycznych, nowych zabiegów, nowych sposobów na opóźnianie procesów starzenia. Zachowanie jak najdłużej atrakcyjnego, młodego wyglądu ciała, w tym szczególnie skóry jest współczesnym wyzwaniem dla naukowców.

W świetle powyższych stwierdzeń wybór tematu pracy i obiektu badań uważam za trafny i celowy.

Rozprawa doktorska Pani mgr Urszuli Tałałaj ma układ typowy, zawiera 123 strony, składa się z 9 rozdziałów, w kolejności: wstęp, część literaturowa, cel pracy, część eksperymentalna, wyniki i ich dyskusja, wnioski, streszczenie (również w języku angielskim), spis literatury. Tekst uzupełniony jest 32 rysunkami i 25 tabelami. Autorka w pracy cytuje 143 pozycje literaturowe, w większości z ostatnich 20 lat.

Przegląd literatury związany z tematem rozprawy zajmuje 32 strony. W tej części pracy Doktorantka starannie opisała budowę i funkcje skóry, opis wzbogaciła rysunkami. Scharakteryzowała proces starzenia się skóry, wymieniła cechy i zmiany zachodzące w skórze starzejącej się. Zwróciła uwagę jak szkodliwy jest wpływ nadmiaru promieniowania słonecznego na wygląd skóry.

W tym miejscu nasuwa się pytanie, co Pani mgr sądzi o ochronie skóry przed nadmierną ekspozycją na promieniowanie słoneczne a jednocześnie wytwarzaniem witaminy D₃?

Sporo miejsca (16 stron) Autorka poświęciła na scharakteryzowanie 4 grup peptydów kosmetycznych (peptydy sygnałowe, peptydowe inhibitory enzymów, peptydy jako inhibitory neurotransmiterów, peptydy transportujące), również peptydu KTTKS i podkreśliła ich aktywności biologiczną, wskazała znaczenie w kosmetologii i medycynie estetycznej. Omówiła aktualny stan badań nad wykorzystaniem peptydów w walce z procesami starzenia skóry. Wyczerpujące omówienie opisanych w literaturze efektów badań nad zastosowaniem peptydów w kosmetologii, pokazuje znajomość literatury przedmiotu, świadczy o dobrym rozeznaniu tematu pracy i uzasadnia zainteresowanie Doktorantki tematem rozprawy.

W moim subiektywnym odczuciu brakuje w tej części pracy opisu białek strukturalnych skóry, szczególnie kolagenu.

Doktorantka jasno sprecyzowała i uzasadniła cel pracy. Zaproponowała plan jego realizacji, obejmujący dwie części – pierwszą stanowi synteza pochodnych peptydu KTTKS, drugą zaś, stanowią badania biologiczne tych związków, obejmujące ocenę aktywności antyamidolitycznej wobec siedmiu enzymów – plazminy, urokinazy, trombiny, tPA (tkankowy aktywator plazminogenu), kalikreiny, tripsyny, chymotrypsyny oraz badania cytotoksyczności na fibroblastach.

Peptyd KTTKS jest dość często wykorzystywany w kosmetologii, bowiem stymuluje syntezę kolagenu i elastyny, zatem wobec poszukiwań nowych surowców kosmetycznych, interesująca jest aktywność biologiczna jego pochodnych. Wiadomo, że nawet niewielka zmiana struktury cząsteczki może powodować istotne zmiany w aktywności biologicznej.

Zasadniczą część pracy stanowi rozdział „Część doświadczalna”, w którym Doktorantka w bardzo czytelny i szczegółowy sposób opisała syntezę analogów peptydu KTTKS. Zachowując podstawową sekwencję aminokwasów w macierzystym pentapeptydzie LYS-Thr-Thr-Lys-Ser, poddała go przemianom chemicznym, które miały na celu ustalenie zależności aktywności biologicznej od struktury związku.

Przemiany polegały na zamianie grupy karboksylowej aminokwasu C-końcowego grupą amidową, zaś grupę aminową aminokwasu N-końcowego blokowano resztą kwasu liponowego, palmitynowego i acetyloimidazolu. Wymieniano też w sekwencji aminokwasów jedną lub dwie cząsteczki lizyny na argininę. Jako wzorce do badań Doktorantka stosowała zsyntetyzowane przez siebie dwa peptydy KTTKS i PAL-KTTKS. Proces otrzymywania pochodnych peptydów Doktorantka wykonywała w pięciu zaprojektowanych etapach, na fazie stałej, którą stanowiły żywice 2-chlorotrytylowa i Rink-amidowa. Uzyskane produkty Autorka oczyszczała i oznaczała ich czas retencji wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową. Analizą spektrometrii masowej oznaczyła masę molową związków. Doktorantka oznaczała też, jak napisała na stronie 51 temperaturę topnienia produktów. **Nie spotkałam**

w pracy informacji dotyczących tego pomiaru. Sposób wykonania syntez Autorka zaprezentowała też na dwóch schematach a w 4 tabelach (10-13) przedstawiła otrzymane pochodne peptydów, ich właściwości fizyko-chemiczne, podała wydajności syntez.

Pozytywnie oceniam sposób zaplanowanych syntez i cykl wykonywanych operacji. Procedura badawcza zastosowana przez Doktorantkę jest prawidłowa, opis tej części doświadczalnej jest przedstawiony właściwie. Doceniam umiejętność korzystania z technik i pracy w laboratorium. Na podkreślenie zasługuje 60 wykonanych syntez.

Do tej części pracy kieruję do Pani mgr zapytanie, czym sugerowała się Pani wymieniając w sekwencji aminokwasów lizynę na argininę?

Badanie aktywności biologicznej otrzymanych 32 związków, Autorka zaplanowała z wykorzystaniem siedmiu enzymów i ich chromogennych substratów, mianowicie, plazminy, trombiny, enzymu tPA, kalikreiny, trypsyny i chymotrypsyny. Wykorzystując metodę amidolityczną określiła ich właściwości inhibicyjne. Na podstawie otrzymanych wyników hamowania aktywności enzymów wyznaczyła wartości IC_{50} dla zsyntetyzowanych pochodnych peptydów (wartość IC_{50} oznacza stężenie peptydu, przy którym aktywność badanego enzymu zostaje zahamowana w 50%) i okazało się, że w stosunku do 4 enzymów (tPA, kalikreiny, trypsyny i chymotrypsyny) otrzymane produkty nie wykazywały aktywności. W stosunku do pozostałych trzech enzymów (plazminy, urokinazy, trombiny) aktywność inhibicyjną wykazało 8 pochodnych, mianowicie C-terminalne kwasy i amidy z zablokowaną grupą N-aminową kwasem palmitynowym (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32) a dwa spośród nich (N-palmitynowe C-terminalne z grupą karboksylową) 20 i 28 charakteryzowały się aktywnością przekraczającą 90%. Acetylowane pochodne wykazywały najniższą aktywność inhibitującą.

Stosując metodę Carmichael'a, Doktorantka zbadała cytotoksyczność otrzymanych peptydów względem fibroblastów. Żaden z spośród 32 związków nie wykazywał tej aktywności, trzy zaś (**13, 14, 26**) z cząsteczką argininy w łańcuchu aminokwasów (N-terminalny

z C-terminalną grupą amidową, z N-terminalną grupą acetylową i C-terminalną grupą amidową, z N-terminalną grupą acetylową i C-terminalną grupą karboksylową) powodowały wzrost komórek. Dla tych 3 pochodnych peptydów zbadała i stwierdziła ich korzystny wpływ na biosyntezę DNA i kolagenu, co zasługuje na podkreślenie, ponieważ są to nowe, aktywne analogi peptydu KTTKS o potencjalnej możliwości stosowania w kosmologii. Wykonywane procedury Autorka starannie opisała a wyniki badań przedstawiła w 12 obszernych tabelach i na 4 wykresach. Prawidłowo dobrane metody i dokładne ich omówienie świadczą o dobrej znajomości procedur poszukiwania nowych surowców kosmetycznych.

Przeprowadzone badania doprowadziły do otrzymania zaplanowanych i oczekiwanych produktów, wśród których jest 30 nowych dotychczas nieopisanych, po raz pierwszy zbadanych biologicznie. Uzyskane wyniki niewątpliwie wzbogacają dotychczasową wiedzę o aktywności biologicznej nowych analogów peptydu KTTKS.

Uwieńczeniem rozprawy jest obszerny liczący 19 stron rozdział „Dyskusja”, w którym Doktorantka zebrała wyniki badań przeprowadzonych i opisanych w pracy, a także zamieściła je na 15 wykresach. W tej części pracy Doktorantka dokonała starannej, wyczerpującej analizy zależności aktywności biologicznej od struktury zsyntetyzowanych związków. Oceniała jak na aktywność inhibicyjną względem enzymów wpływa zablokowanie w macierzystym peptydzie KTTKS, aminokwasów N-końcowych i C-końcowych oraz jak wpływa wymiana w sekwencji aminokwasów lizyny na argininę. Zauważyła zróżnicowaną aktywność otrzymanych związków względem poszczególnych enzymów. Podsumowując stwierdziła, że najwyższą aktywność jako inhibitory enzymów wykazywały peptydy z zablokowanym aminokwasem N-końcowym kwasem palmitynowym. Porównała struktury zsyntetyzowanych analogów, wskazała różnice i wspólne elementy, podjęła próbę uzasadnienia różnic w aktywności biologicznej. Wskazała struktury najbardziej aktywne i zasugerowała możliwości ich praktycznego zastosowania. Autorka opisując wyniki badań, uzupełniła je wyczerpującą dyskusją. Uzasadniła wybór obiektu badań. Odniosła się do badań wcześniej wykonywanych w Zakładzie Chemii Organicznej, nawiązała również do opisanych w literaturze prac innych autorów. Uzasadniła celowość poszukiwania analogów macierzystego peptydu KTTKS.

Przedstawione w dyskusji rozważania, wskazują na rzetelną i dokładną znajomość badanej tematyki.

Kieruję do Pani mgr zapytanie, w tym rozdziale, na stronie 103, gdzie Pani charakteryzuje aktywność peptydów z N-terminalną resztą kwasu palmitynowego, napisała Pani takie zdanie „Ze względu na obecność długiego łańcucha węglowodorowego powinny mieć lepszą przenikalność przez skórę, a zatem będą mogły być stosowane w mniejszym stężeniu”. Dlaczego Pani tak uważa?

Najważniejsze wyniki uzyskane w pracy zostały treściwie, krótko w pięciu punktach przedstawione w rozdziale „Wnioski”. **Szkoda, że nie ujęła Pani we wnioskach porównania aktywności biologicznej palmitynowej pochodnej z macierzystym peptydem.**

Podsumowując stwierdzam, że synteza 32, w tym 30 nowych związków chemicznych, zbadanie ich aktywności biologicznej i głęboka analiza uzyskanych wyników świadczą o wartości poznawczej rozprawy doktorskiej.

Praca napisana jest poprawnie, ale spotyka się drobne błędy. Między innymi dość licznie występują tzw. „literówki”. Korekty wymagają pozycje w rozdziale „Literatura”. Niektóre nazwy związków chemicznych budzą wątpliwości, m.in. sposób zapisu izomerów optycznych symbolami R i S (str. 93, 99), podpis pod ryciną (str. 96). Spotyka się potoczne określenia, np. „peptydy w postaci kwasów”, str. 96.

Wymienione uwagi w porównaniu z zaletami pracy mają marginalne znaczenie, nie umniejszają wartości naukowej badań wykonanych przez Doktorantkę i ujętych w rozprawie.

W mojej ocenie przedstawiona do recenzji praca magister Urszuli Tałałaj „Synteza i ocena aktywności biologicznej peptydów sygnałowych” wnosi elementy nowości, co w tej pracy szczególnie wysoko cenię, charakteryzuje się wysoką wartością merytoryczną wykonanych badań, spełnia kryteria prawidłowo zaplanowanej, zrealizowanej i udokumentowanej rozprawy doktorskiej.

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie magister Urszuli Tałałaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.