

Gdańsk, dnia 23.03.2016

Dr hab. Wojciech Kamysz, prof. nadzw.

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej

Wydział Farmaceutyczny

Gdański Uniwersytet Medyczny

RECENZJA

**Rozprawy doktorskiej pt: „Synteza i badania biologiczne
pochodnych kwasu 6-aminoheksanowego jako potencjalnych
inhibitorów plazminy” autorstwa mgr. Macieja Purwina**

Pojęcie hemostazy odnosi się do zespołu mechanizmów obronnych organizmu, mających na celu utrzymanie płynności krwi krążącej oraz ochronę przed jej utratą w wyniku przerwania ciągłości naczyń krwionośnych. Układ ten odgrywa również znaczącą rolę w regulacji funkcji łożyska naczyniowego, a także mechanizmów odpornościowych ustroju. O prawidłowo funkcjonującej hemostazie mówimy wtedy, gdy zachodzi równowaga pomiędzy czynnikami aktywującymi oraz hamującymi procesy krzepnięcia. Wymaga to zaangażowania wielu układów i stanowi wypadkową funkcjonowania bardzo skomplikowanych i złożonych mechanizmów. W tym, współdziałania naczyń krwionośnych i przyległych tkanek, płytek krwi, białek układu krzepnięcia i układu fibrynolitycznego, inhibitorów i aktywatorów białek układu antykoagulacyjnego oraz układu fagocytarnego, monocytów i granulocytów obojętnochłonnych. Według teorii funkcjonalnej, hemostaza jest procesem trójfazowym, w skład którego wchodzi:

- hemostaza pierwotna, gdzie w wyniku zaangażowania naczyń oraz płytek dochodzi do wytworzenia czopu płytkowego w miejscu uszkodzenia naczynia;
- procesy krzepnięcia, które w wyniku aktywacji przez szereg czynników takich jak czynnik tkankowy (TF), czynniki osoczowe oraz płytkowe (PF3) doprowadzają do wytworzenia fibryny wzmacniającej czop płytkowy i powstaje skrzep ostateczny;
- fibrynoliza, w efekcie której dochodzi do rozpuszczenia skrzepu.

Fizjologicznie, wszystkie te procesy są ze sobą nierozzerwalnie połączone, a głównym aktywatorem krzepnięcia w ustroju jest czynnik tkankowy (TF) pochodzący z uszkodzonych tkanek lub związany z monocytami. Istotą procesu krzepnięcia jest przekształcenie rozpuszczalnego białka – fibrynogenu, w początkowo rozpuszczalną i niestabilną fibrynę, a następnie w nierozpuszczalną sieć fibryny. Powstanie skrzepu fibrynowego jest procesem wieloetapowym. Pod wpływem trombiny (osocowego czynnika krzepnięcia IIa) dochodzi do odszczepienia krótkich fragmentów podjednostek α i β fibrynogenu, spontanicznej polimeryzacji i wytworzenia fibryny labilnej. W kolejnym etapie przy udziale czynnika XIIIa i jonów Ca^{2+} powstają usieciowane oligomery fibryny stabilnej.

Naturalną przeciwwagą dla procesów krzepnięcia stanowi układ fibrynolityczny. Podstawową funkcją tego układu jest usuwanie fibryny oraz utrzymanie przepływu krwi. Głównym białkiem fibrynolizy jest plazminogen, proenzym, który aktywowany jest do aktywnej proteazy serynowej – plazminy. Specyficznymi substratami dla plazminy są fibryna oraz fibrynogen, które pod jej wpływem rozpadają się na niskocząsteczkowe fragmenty peptydowe. Prócz wcześniej wymienionych, specyficznymi substratami dla plazminy są również czynnik wzrostu śródbłónka (VEGF), witronektyna, kolagenaza, fibronektyna, składniki dopełniacza C3/C5, osteokalcyna czy tenascyna C. Dlatego też, plazminogen oraz aktywne formy plazminy odgrywają ważne funkcje nie tylko w utrzymaniu hemostazy, ale również w degradacji przestrzeni międzykomórkowych, migracji komórek (w tym nowotworowych), leczeniu ran oraz w stanach zapalnych. Ponadto udowodniony został wpływ plazminy na procesy patologiczne takie jak rozwój miażdżycy, niedokrwienie mięśnia sercowego, odkładanie β -amyloidu w chorobie Alzheimera, a także wzrost guzów czy też powstawanie przerzutów nowotworowych.

Inhibitory plazminy od lat są stosowane w leczeniu zdarzeń krwotocznych. W szczególności w przypadku nasilonej fibrynolizy oraz związanych z nią efektami ubocznymi. Substancje te, znalazły również zastosowanie w terapii wspomagającej w zespole rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC). Inhibitory plazminy, ze względu na źródło pochodzenia, dzieli się na naturalne oraz syntetyczne. Inhibitory naturalne to substancje białkowe pochodzenia endogennego bądź egzogenne, które wykazują zdolność do hamowania plazminy i/lub innych proteaz serynowych. Inhibitory endogenne występują fizjologicznie w układzie krwionośnym człowieka i są to np. α_2 -antyplazmina, α_2 -makroglobulina, α_1 -antytrypsyna, inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną (TAFI),

antytrombina III czy też trombospondyna. Do naturalnych inhibitorów egzogennych zalicza się związki pochodzenia bakteryjnego, roślinnego oraz zwierzęcego. Wśród nich wymienić należy takie substancje jak aprotynina (inhibitor tripsyny pochodzący z trzustki bydłej) czy leupeptyna – bakteryjny inhibitor proteaz pozyskany ze szczepu *Streptomyces roseus*. Wśród innych naturalnych i egzogennych inhibitorów plazminy wymienić można związki takie jak tekstylina-1 wyizolowana z jadu węża australijskiego czy tryptogalinina znajdująca się w ślinie kleszcza *Ixodes scapularis*. Do syntetycznych inhibitorów plazminy zalicza się substancje działające na centrum aktywne plazminy oraz substancje hamujące aktywność proteolityczną i amidolityczną. Wśród nich wymienić należy inhibitory fibrynolizy takie jak kwas ϵ -aminokapronowy (EACA), kwas traneksamowy (AMCHA) czy kwas p-aminometylobenzoesowy (PAMBA). Modyfikacje w obrębie małowcząsteczkowych antyfibrynolityków zaowocowały opracowaniem pochodnych oddziaływujących z centrum aktywnym plazminy. Wśród nich należy wymienić pochodne aminokwasów argininy i lizyny, krótkie peptydy, amidy lizyny, pochodne aldehydowe, nitrylowe oraz inhibitory typu OS. Obecnie zarejestrowane są tylko trzy leki działające jako inhibitory plazminy i są to aprotynina, kwas ϵ -aminokapronowy (EACA) oraz kwas traneksamowy (AMCHA).

Celem przedstawionej do recenzji pracy było poszukiwanie syntetycznego, selektywnego i odwracalnego inhibitora plazminy, który mógłby znaleźć zastosowanie w terapii chorób związanych z dysfunkcją krzepnięcia krwi oraz leczenia upośledzonego gojenia ran, stanów zapalnych oraz nowotworów. W ramach realizowanych zadań badawczych zsyntezowano 15 nowych peptydów – pochodnych kwasu ϵ -aminokapronowego (EACA) posiadających fragment aminokwasowy wykazujący powinowactwo do plazminy (-Ala-Phe-Lys-). Wszystkie uzyskane związki wykazywały zdolność do hamowania aktywności plazminy, jednocześnie nie wykazując cytotoksyczności wobec badanych linii komórek fibroblastów oraz linii komórek nowotworowych. W rezultacie wytypowany został peptyd: H-D-Ala-Phe-Lys-EACA-NH₂, który może zostać wykorzystany jako selektywny inhibitor plazminy i substancja o potencjalnym działaniu leczniczym.

Rozprawa doktorska mgr. Macieja Purwina przygotowana została zgodnie z wymaganiami stawianym tego typu pracom. Obejmuje 99 stron tekstu, w tym 45 rycin i 24 tabele. Piśmiennictwo liczy 249 pozycji, z czego większość to publikacje zagranicznych renomowanych czasopism. Układ pracy jest klasyczny i obejmuje: Wstęp (str. 5), Część

teoretyczną (str. 7 – 46), Cel pracy (str. 47), Część doświadczalną (str. 48 – 65), Wyniki (str. 66 – 86), Dyskusję (str. 88 – 103) oraz Wnioski (str. 104). W pracy ujęte zostały również: Spis treści, Wykaz używanych skrótów oraz Streszczenie w języku polskim oraz angielskim (str. 105 – 106).

W części teoretycznej mgr Maciej Purwin przedstawia w sposób uporządkowany i przejrzysty teorię dotyczącą hemostazy. Po kolei opisywane są mechanizmy leżące u podstaw zachowania równowagi układów krzepnięcia oraz fibrynolizy. Dodatkowym atutem są ryciny i tabele porządkujące i ilustrujące opisywane procesy. Przedstawiona w tej części teoria pozwala na wprowadzenie czytelnika w tematykę realizowanych badań w ramach rozprawy doktorskiej. Cel pracy przedstawiony został jasno i precyzyjnie.

W części doświadczalnej skrupulatnie opisane zostały wykonane badania. Syntezy przeprowadzono z wykorzystaniem metodologii Fmoc/tBu, metodami powszechnie stosowanymi w chemii peptydów. Procesy syntezy, oczyszczania oraz analiz wykonano poprawnie. W tym kontekście pragnę zwrócić uwagę, że opisy na stronie 61 są prawdopodobnie pomyłką Autora, gdyż nie oczyszczał On na kolumnie analitycznej i nie analizował na kolumnie preparatywnej (Autor pomylił kolumny na etapie pisanie pracy doktorskiej). Błędem jest stosowanie samej wody jako eluentu wyjściowego w chromatografii RP-HPLC (chyba, że posiada się specjalne do tego celu kolumny).

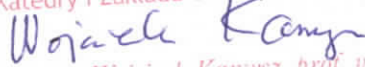
Z obowiązku Recenzenta pragnę nadmienić, iż rozprawa nie jest pozbawiona błędów językowych i stylistycznych. Na stronie 21 Autor wymieniając rodzaje bakterii odpowiedzialnych za aktywację plazminogenu powinien zastosować *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., a nie „*Staphylococci*” czy „*Streptococci*”. Na tej samej stronie również powinno być: „Domeny typu Kringle” zamiast „domeny kringle”. W całej pracy Autor w zapisie ułamków dziesiętnych stosuje kropkę zamiast przecinka, co jest niepoprawne. By nadać przejrzystości przedstawionych danych, należałoby zwrócić uwagę na format zapisu liczbowego. Sugeruje się, by zamiast wielokrotnie powtarzanych zer po przecinku stosować wykładniczy zapis ułamków dziesiętnych lub zmianę przedrostka jednostek (np. w Tabeli 4, czy też dane na stronie 43). Autor nie ustrzegł się również przed popełnieniem błędów interpunkcyjnych, czy też literówek. Błędy wspomniane powyżej nie ujmują jednak wysokiej wartości merytorycznej pracy.

W ocenie Recenzenta badania biologiczne zostały wykonane poprawne, a dotyczyły one – badań *in vitro* aktywności amidolitycznej plazminy, trombiny, tPA (tkankowego

aktywatora plazminogenu), uPA (urokinazowego aktywatora plazminogenu), kalikreiny oraz trypsyny, zaś dla plazminy, także badań wpływu peptydów na aktywność fibrynolityczną. Testy cytotoksyczności wykonano w obecności MTT w stosunku do fibroblastów komórek nowotworowych okrężnicy (linia DLD-1) oraz linii komórek nowotworowych piersi (MCF-7 oraz MDA-MB-231). Ponadto przeprowadzono również badania nad wpływem otrzymanych związków na kinetykę powstawania i stabilności skrzepu.

Na podstawie uzyskanych wyników mgr Maciej Purwin sformułował 5 wniosków. Autor podsumował realizowane przez siebie badania. Podkreślił, które z badanych związków charakteryzowały się wyższą aktywnością fibrynolityczną, a które wyższym powinowactwem wobec plazminy. We wniosku 4 autor zasugerował, iż za brak toksyczności uzyskanych pochodnych odpowiedzialna jest obecność C-terminalnego kwasu ϵ -aminokapronowego (EACA) i podkreślił możliwy związek jego obecności ze wzrostem przeżywalności komórek.

Ogólna ocena pracy doktorskiej na stopień doktora nauk farmaceutycznych mgr. Macieja Purwina jest pozytywna i spełnia wszelkie warunki określone w Art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z późniejszymi poprawkami z 2014 r. (Dz. U. Poz 1852). Jednocześnie wnioskuję o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku mgr. Macieja Purwina do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

K I E R O W N I K
Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej

dr hab. Wojciech Kamysz, prof. nadzw.
tel. 58 349 14 68, kamysz@gumed.edu.pl