



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Mikrobiologii

Dr hab. Joanna Koziel

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzeleckiej "Synthesis of theta-defensins analogues and evaluation of their antimicrobial and cytotoxic activity toward selected bacterial strains and cell lines"**

**Promotor: prof. dr hab. Adam Lesner**

Peptydy antybakteryjne (ang. *antimicrobial peptides* - AMPs) stanowią konserwatywne ewolucyjnie elementy systemu obrony immunologicznej. Pierwotnym i naczelnym efektem ich działania jest eliminacja drobnoustrojów chorobotwórczych, jednakże wraz z rozwojem badań nad funkcjonowaniem systemu obronnego organizmu zidentyfikowano ich plejotropowość, przejawiającą się m.in. efektem immunomodulacyjnym, pro-/anty- angiogennym, proliferacyjnym, czy anty-kancerogennym. Naturalnie występujące w organizmie komponenty układu immunologicznego, takie jak AMPs są niezwykle interesującym przedmiotem badań dla farmakologów. Po pierwsze, jako naturalnie produkowane przez organizm molekuly, w warunkach fizjologicznych nie indukują reakcji immunologicznej, po drugie nie wywołują oporności u bakterii, a wreszcie, po trzecie, wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej. Doktorantka podążyła tokiem idei terapeutycznego zastosowania AMPs, koncentrując swoje badania na grupie teta-defensyn, peptydów zidentyfikowanych w neutrofilach makaków i pawianów. Peptydy te, o silnych właściwościach antybakteryjnych cechuje wyjątkowa u peptydów pochodzenia zwierzęcego cykliczna struktura, stabilizowana obecnością trzech mostków disulfidowych. Taka budowa zapewnia im wysoką stabilność termodynamiczną i obniżoną podatność na proteolizę, a zwiększenie tym samym czasu półtrwania w organizmie przyczynia się do wydajności ich działania. Cechy te plasują teta-defensyny wysoko w rankingu naturalnie występujących peptydów, które mogą zostać wykorzystane jako podstawa do konstrukcji nowych leków. W swoich badaniach Pani Strzelecka podjęła próbę syntezy związków bazujących na strukturze teta-defensyn, a następnie oceniła ich właściwości bakteriobójcze i cytotoksyczne względem komórek prawidłowych oraz nowotworowych - raka piersi.

Rozprawa doktorska ma układ standardowy. Poza wstępem, rozdziałami opisującymi zastosowane materiały i metody, wyniki przeprowadzonych eksperymentów oraz ich dyskusję zawiera spis literatury, tabel i rycin oraz streszczenie i krótkie podsumowanie wyników, w którym doktorantka przedstawiła w punktach najistotniejsze według jej oceny osiągnięcia swojej rozprawy doktorskiej. Pracę wzbogaca również rozdział, w którym szczegółowo opisano procesy syntez chemicznych wykonanych w ramach prowadzonych badań.

Wstęp do rozprawy, podzielony na szereg właściwie dobranych podrozdziałów doskonale wprowadza w tematykę badań. Należy podkreślić wyjątkową staranność w jego konstrukcji. Doktorantka zadbała o to, by zachować jego interdyscyplinarny charakter, który cechuje cały temat jej badań. Przedstawiona w nim charakterystyka peptydów antybakteryjnych, w tym defensyn nie pomija żadnych aspektów, w tym: struktury chemicznej, metod syntezy, efektów biologicznych i molekularnych mechanizmów działania. Jego opracowanie nie było więc łatwym zadaniem, bowiem wymagało od doktorantki głębokiej wiedzy z różnych dziedzin. Wyjątkowo cenne jest zamieszczenie danych na temat prób wprowadzenia do badań klinicznych peptydów antybakteryjnych, co często w tego typu rozprawach opisujących badania podstawowe jest pomijane lub lakonicznie wspomniane, bez podawania konkretnych informacji. Wstęp, podobnie zresztą jak cała rozprawa, został bardzo dobrze zilustrowany, a ryciny i tabele cechuje wykonanie z dużą starannością.

Cel pracy został przez autorkę jasno przedstawiony. Autorka podkreśliła pracownie i osoby, z którymi współpracowała w ramach realizacji poszczególnych celów badawczych. Wyniki swoich badań oparła nie tylko na doskonale jej bliskim warsztacie metod chemicznych, ale również biologicznych, stosując modele badawcze z zakresu mikrobiologii i biologii komórki. Kolejność przedstawiania wyników jest logiczna, a opracowano je z należytą starannością. Opisy uzyskanych danych nie pozostają zdawkowe, a miejscami zostały szeroko zinterpretowane.

Dyskusja wyników przeprowadzona została w sposób profesjonalny w oparciu o dostępne dane literaturowe. Za najciekawsze uważam opis współcześnie funkcjonujących w literaturze wyjaśnień specyficzności działania peptydów antybakteryjnych względem



komórek nowotworowych. Nakreślają one kierunki dalszych badań nad teta-defensynami, co zostało podkreślone w podsumowaniu pracy.

Podsumowując, recenzowana praca doktorska udokumentowała próby syntezy teta-defensyn i ich analogów oraz właściwości biologiczne uzyskanych związków. Dowiodła specyficzności działania uzyskanych analogów względem komórek nowotworowych. Wykazała, że podstawienie reszt cysteiny, resztami alaniny przyczynia się do braku aktywności biologicznej, zaś resztami seryny zmniejsza żywotność komórek raka piersi. Zaprezentowane wyniki mogą posłużyć jako dobra podstawa do dalszych badań nad projektowaniem leków opartych o strukturę teta-defensyn.

Lektura niniejszej pracy nasuwa kilka pytań i uwag do autorki:

- Dlaczego autorka interpretuje wynik przedstawiony na Ryc. 51 jako cyt. "*Co-administration of  $\vartheta$ -defensins analogues with chemotherapeutics caused enhance cytotoxic effect on MDA-MB-231 cells*", skoro efekt zahamowania wzrostu obserwowany po zastosowaniu samej cisplatyny, czy doksorubicyny jest większy (redukcja objętości sferoidu o *circa* 80%), niż w jednoczesnej obecności cytostatyku i peptomeru (redukcja objętości sferoidu o 30% - 70%)?
- Czy Rycina 50 przedstawia wyniki uzyskane w modelu hodowli 2D, czy 3D? Przedstawione obrazowanie nie jest jednoznaczne dla recenzenta, a opis pod ryciną tego nie wyjaśnia. Jeśli to obraz pochodzący z analizy hodowli komórek w formacie 3D, to dlaczego stężenie cisplatyny i doksorubicyny optymalizowano w modelu hodowli 2D (Ryc. 49), modelu o wyższej podatności na działanie cytostatyków niż model 3D?
- Recenzenta frapuje brak uzasadnienia wyboru typu nowotworu w prowadzonych badaniach. Dlaczego rak piersi? Czy wybór został dokonany na podstawie danych literaturowych, czy wyników badań wstępnych?
- Dlaczego stabilność peptydów w surowicy ludzkiej porównywana była do stabilności w osoczu zwierząt? I dlaczego wybór padł na szczep zwierząt transgenicznych NOD/SCID mice?
- Dlaczego nie przedstawiono wyników testów antybakteryjnych, testu na hemolizę, czy wpływu analogów na morfologię komórek HEK 293, które dały, jak opisuje autorka wynik

negatywny, czyli brak wpływu testowanych związków? Podobnie negatywny wynik uzyskano w przypadku komórek PBMC, który to wynik jednak znalazł się w pracy. Co było podstawą do takiej selekcji wyników? Zdaniem recenzenta, brak wpływu analogów na badane zjawisko jest równie istotną informacją co jego udział i informacja ta powinna zostać udokumentowana wynikami, choćby w formie dodatkowego rozdziału w pracy.

- Ponieważ w pracy zastosowano kilka rodzajów testów żywotności komórek, które wykonywano w różnych czasach po ekspozycji na dany peptyd, stąd cenne byłoby rozbudowanie opisu rycin, które tych informacji nie zawierają o wspomniane dane (Ryc. 44, 46). Ten zabieg niewątpliwie ułatwiłby recenzentowi interpretację uzyskanego wyniku i porównanie do pozostałych. Brak analizy statystycznej.

- Niejasny jest brak kompatybilności opisu stężeń peptydów. Na stronie 63 podano, że stężenie 2,5  $\mu\text{M}$  odpowiada 5  $\mu\text{g/ml}$ , podczas gdy poniżej w tekście widnieje 1  $\mu\text{g/ml}$ .

- W celu pracy podano informację, że dokonano syntezy sześciu analogów peptomerowych, podczas gdy w opisie wyników i streszczeniu pracy mowa o jednym.

- Drobne błędy literowe i redakcyjne. Miejscami, brak precyzyjnego opisu cytokin. Przykładowo, w Tabeli 6 nie sprecyzowano rodzaju interleukiny 1, której formy ( $\alpha$  i  $\beta$ ) mają odmienne funkcje immunologiczne. Na Rycinie 21 zamieszczono RTD-1 zamiast RTD-2. Odwrócony opis na Ryc. 45.

Podsumowując, pomimo powyższych uwag wyraźnie chciałam podkreślić wysoką wartość naukową przeprowadzonych badań oraz staranność opracowania ich wyników. Bezsprzecznie pogłębiły one wiedzę dotyczącą metodologii syntezy teta-defensyn i funkcji powstałych analogów. Równocześnie badania pani Strzeleckiej mogą przyczynić się do opracowania nowych skutecznych metod terapeutycznych. Pragnę również podkreślić ogromny wkład pracy doktorantki w realizację tego tematu, co uważam za tym cenniejsze, że praca ma charakter interdyscyplinarny. Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Pauliny Marii Strzeleckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.