



Wrocław 15 kwietnia 2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Krzysztofa Finka

„Właściwości chemiczne i biologiczne koniugatów i kompleksów klastrów boru
z makrocząsteczkami”

Unikalne własności polihedralnych klastrów boru powodują, że wzrasta zainteresowanie ich zastosowaniem w medycynie. W zależności od składu, związki te mogą posiadać cechy hydrofobowe, hydrofilowe lub amfifilowe. Ponadto klastry boru charakteryzują się niską toksycznością, wysoką stabilnością, sztywnością struktury oraz zdolnością do tworzenia wiązań określanych jako σ -hole bonds. Klastry boru mogą być dołączone do związków chemicznych w celu nadania im nowych własności fizykochemicznych lub biologicznych, jako grupy farmakoforowe lub stanowić elementy rusztowania dla budowania cząstek. Spośród różnego rodzaju klastrów boru, ze względu na swoje własności, szczególnym zainteresowaniem cieszą się klastry dwudziestościenne (dwonastowierzchołkowe), karborany zawierające jeden lub więcej atomów węgla oraz metalkarborany zawierające atom metalu. Klastry boru są wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej w celu generowania cząstek α .

Pomimo wielu atrakcyjnych cech jakie posiadają klastry boru, a co za tym idzie szerokich możliwości ich zastosowania w lekach, zaskakująco mało wiadomo o ich oddziaływaniu z podstawowym białkiem osocza – albuminą. W tym zakresie przedstawiona do recenzji praca doktorska przynosi wartościowe informacje. Albumina pełni wiele ważnych funkcji biologicznych, między innymi przenosi jony metali lub kwasy tłuszczowe. Wiązanie leków z albuminą wykorzystuje się w celu znaczącego przedłużenia czasu ich działania.

Celem pracy doktorskiej mgr inż. Krzysztofa Finka było zbadanie oddziaływania klastrów boru z albuminą surowicy. Ponadto, przeprowadził on syntezę koniugatów peptydu tymozyny $\beta 4$ z klastrami boru o różnym powinowactwie do albuminy, a następnie ocenił aktywność biologiczną tak otrzymanych cząstek. Uważam, że temat badań jest ciekawy a praca doktorska wykonana pod opieką prof. dr hab. Janusza Boratyńskiego dostarcza wartościowych wyników.

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 136 stron i została podzielona w sposób nietypowy na rozdziały: Cel pracy, Wprowadzenie, Badania własne, Podsumowanie i dyskusja wyników, Materiały i metody oraz Bibliografia. Taka kolejność rozdziałów przypomina strukturę artykułu naukowego.

W rozdziale Wprowadzenie przedstawiono charakterystykę klastrów boru, oddziaływania z białkami oraz ich zastosowanie w medycynie. Opisane zostały struktury przestrzenne klastrów boru o różnej liczbie wierzchołków oraz pochodne klastrów boru z węglem i metalami. Więcej uwagi poświęcono użyciu pochodnych dodekaboranu w przeciwnowotworowej terapii borowo-neutronowej. Ponadto omówiono własności takich związków, jak monokarba-closo-dodekaboran, monokarba-nido-

dodekaboran, dikarba-closo-dodekaboran, dikarba-nido-dodekaboran oraz metalokarborany. Następnie przedstawiono własności albuminy surowicy krwi, jej strukturę, miejsca wiążące związki chemiczne oraz jej wpływ na farmakokinetykę i farmakodynamikę leków. W końcowej części Wprowadzenia opisano różnorodną aktywność biologiczną tymozyny $\beta 4$, zwracając szczególną uwagę na jej udział w regeneracji mięśnia sercowego. Ten rozdział pracy kończy opis strategii wydłużenia czasu działania tymozyny $\beta 4$ w organizmie

Do najważniejszych wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej zaliczam:

1. Opisanie oddziaływania klastrów boru z albuminą.

W pierwszej kolejności wyznaczono zależność wygaszania fluorescencji BSA pod wpływem klastrów boru. Badania te przeprowadzono dla różnych stężeń klastrów oraz różnych temperatur. Pomiarów te pozwoliły na wyznaczenie stałych oddziaływania, parametrów termodynamicznych (ΔG , ΔH , ΔS) oraz ilości miejsc wiążących na białku. Ponadto, na podstawie stałej wygaszania fluorescencji, wyliczonej z równania Sterna-Volmera, określono mechanizm oddziaływania klastrów boru z BSA. Następnie, podjęto próbę określenia powinowactwa klastrów boru do HSA metodą pomiaru powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR). Na podstawie skomplikowanych pomiarów oraz analiz stwierdzono, że powinowactwo klastrów boru do HSA jest porównywalne do oddziaływania warfaryna:HSA.

2. Opracowanie warunków syntezy i otrzymanie z dużą wydajnością koniugatów T $\beta 4$ z klastrami boru.

Polipeptyd był przyłączony do klastrów za pomocą linkera powstającego po otwarciu pierścienia dioksanu, co zapewniło zachowanie jego aktywności biologicznej. Produkty reakcji rozdzielono za pomocą HPLC, a tożsamość koniugatów potwierdzono za pomocą spektrometrii mas (MS). W kolejnym kroku rozdzielono koniugaty w zależności od miejsca przyłączenia klastrów boru. Następnie, za pomocą ograniczonej proteolizy, połączonej z analizą MS, zidentyfikowano miejsca przyłączania klastrów boru do polipeptydów. Dodatkowo wyznaczono trwałość koniugatów w środowisku wodnym w różnym pH.

3. Zmierzenie powinowactwa otrzymanych koniugatów T $\beta 4$ z klastrami boru do HSA.

Poprzez pomiar zmian emisji fluorescencji w obecności koniugatów wyznaczono stałe wygaszania, powinowactwo oraz liczbę miejsc wiązania na HSA. Dla otrzymanych koniugatów, udało się, za pomocą analizy z użyciem SPR, wyznaczyć powinowactwo do HSA. Ponadto, poprzez pomiar skręcalności optycznej stwierdzono, że koniugaty nie wpływają na struktury drugo- i trzeciorzędowe HSA.

4. Określenie aktywności biologicznej klastrów boru w testach *in vivo*.

Badania przeprowadzono wykorzystując szczurze kardiomiocyty linii H9C2. W pierwszej kolejności stwierdzono, że koniugaty nie są toksyczne względem badanych komórek w warunkach normoksji. Następnie, prowadząc badania w warunkach hipoksji wykazano, że koniugat tymozyny $\beta 4$ z metalokarboranem (T $\beta 4$ -CoD) zwiększa żywotność szczurzych kardiomiocytów o 30-40% względem kontroli.

Mam następujące uwagi oraz pytania:

Nie pokazano krzywych na podstawie których wyznaczono parametry wygaszania lub oddziaływania, rysunki: 10, 11, 12, 14A, 38, 39, 40. Brak wykresu dla związku 10 pokazującego K_d i K_{sv} . W tabelach 5, 20, 21 nie podano błędów dla stałych (K_d , ΔG).

Stałe dysocjacji rzędu mikromolowego (warfaryna lub ibuprofen z HSA), wskazują na średnie powinowactwo a nie „duże” (stosował bym raczej określenie mocne), jak napisano w wynikach oraz dyskusji.

W jakim czasie od zmieszania klastrów boru lub koniugatów z albuminą wykonywano pomiary, czy obserwowano zmiany w widmach (absorpcji lub fluorescencji) w trakcie inkubacji? Na stronie 114 pojawia się informacja, że wykonano je bezpośrednio po zmieszanii, czy tak było również w przypadku pozostałych eksperymentów?

Na sensorze CM5 poziom immobilizacji BSA wynosił 11,1 kRU? Czy próbowano wykonać pomiary dla mniejszej gęstości? Obniżenie ilości immobilizowanego BSA mogłoby poprawić jakość pomiaru.

Dlaczego użyto skomplikowanej metody wyznaczania stężenia koniugatów T β 4-klastrów boru za pomocą MS. Czy klasycznymi metodami pomiaru stężenia białek/peptydów było to niemożliwe?

Dlaczego niektóre z chromatogramów EIC dla T β 4 (rys. 50) zawierają dwa szczyty?

W rozdziale Wyniki obliczane są parametry termodynamiczne (ΔG , ΔH , ΔS), które są podstawą wnioskowania o rodzajach wiązań odpowiadających za oddziaływań. Niestety, nie podano literatury na podstawie której wysnuto wnioski.

Na stronie 96 pada określenie, że otrzymane wyniki były istotne statystycznie, nie przedstawiono obliczeń.

Jak wykonano pomiar fluorescencji z użyciem spektropolarymetru Jasco 815?

Nie opisano w jaki sposób wywoływano hipoksję.

W pracy pojawiają się angielskie nazwy, które można bez problemu przetłumaczyć (np. *data pitch*, *band width*, *D.I.T.*, *¹⁰B-sodium-mercaptoundecahydrododecaborate*) oraz niefortunne stwierdzenia: „bilirubina – produkt rozpadu tlenu”, „czas półtrwania wzrósł z 4 do 6 min do 5 do 7 h”, „T β 4 umożliwia przywrócenie embrionalnego programu, który stworzył tę tkankę”, „terapię regeneracyjną szukają sposobów na wykorzystanie nasierdza jako źródła fibroblastów serca”, „zastosowana przez nas procedura reakcji nie powoduje peptydu...”, „Dionex... wyposażony w detektor DAD oraz kolekcję frakcji”, „Każde widmo było poprawione o odpowiedni blank buforu”, „Wszystkie wartości intensywności fluorescencji wykorzystane w tej pracy zostały poprawione”, „W trakcie pomiarów SPR buforem przepływowym był”, „wykonano optymalizację temperatury grzania w reakcji”, „Każdy pomiar został wyblankowany na 10-krotnie rozcieńczony PBS”, „komórki były uwalniane przez trypsynizację”. Zamiast nazwy receptory purynergiczne powinno się raczej używać receptory nukleotydowe.

Efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (EPR) w przypadku niektórych nowotworów jest niwelowany przez podniesione ciśnienie śródmiąższowe wewnątrz guza. Jak wygląda sytuacja w mięśniu sercowym po zawale?

Ponieważ stała wygaszania wzrasta ze wzrostem temperatury, a ilość miejsc oddziaływania jest większa od 1, czy możliwy jest mieszany mechanizm wygaszania fluorescencji, wynikający z wielu miejsc oddziaływania?

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca zawiera szereg wartościowych wyników. Badania wykonane przez mgra inż. Krzysztofa Finka pozwoliły na charakterystykę oddziaływania klastrów boru z albuminą. Ta część pracy została opublikowana w renomowanym czasopiśmie *Scientific Reports*. Ponadto, przeprowadzone badania pozwoliły potwierdzić przydatność koniugatów tymozyny $\beta 4$ z metalokarboranem i HSA dla zwiększenia przeżywalności kardiomiocytów poddanych hipoksji. Autor rozpraw zastosował szeroki wachlarz technik badawczych. Zamieszczony w pracy opis przeprowadzonych badań, wskazuje na bardzo dobre zrozumienie stosowanych metod eksperymentalnych.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej „Właściwości chemiczne i biologiczne koniugatów i kompleksów klastrów boru z makrocząsteczkami” jest wysoce pozytywna, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie mgra inż. Krzysztofa Finka przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN we Wrocławiu do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze poziom przedstawionej pracy oraz fakt opublikowania części jej wyników w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.



Daniel Krowarsch