

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY**

Prof. dr hab. inż. Andrzej Sporzyński
Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa
tel.: 22 234 5737
fax: 22 6282741
e-mail: spor@ch.pw.edu.pl
http://obc.ch.pw.edu.pl



Warszawa, 27.04.2018

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Krzysztofa Finka
pt. „Właściwości chemiczne i biologiczne koniugatów i kompleksów
klastrów boru z makrocząsteczkami”**

Związki boroorganiczne wykazują różnorodne zastosowania biologiczne, które są podstawą ich zastosowań w medycynie. Dwie bardzo ważne grupy związków to kwasy boronowe i ich pochodne oraz klastry boru. W badaniach ich aktywności antybakteryjnej, antygrzybiczej i antynowotworowej istotnym problemem jest ich wprowadzenie do organizmu oraz farmakodynamika. Z tego powodu, po intensywnym rozwoju badań nad aktywnością biologiczną, coraz większe znaczenie mają badania związane ze znalezieniem pochodnych wykazujących wysokie powinowactwo do osocza, umożliwiające rozprzestrzenianie się tych substancji w organizmie. Do grupy tego typu badań można zaliczyć pracę doktorską Pana mgr. inż. Krzysztofa Finka. Jako obiekt badań wybrał on klastry boru, których działanie biologiczne jest od wielu lat przedmiotem intensywnych badań. Jednak nadal kierunki: rozprowadzenie leku w organizmie i jego trwałość oraz kontrolowane uwalnianie pozostawiają wiele niezbadanych obszarów. Z tego powodu uważam wybór tematu pracy doktorskiej za trafny i perspektywiczny.

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 136 stron i zawiera streszczenie, cel pracy, wprowadzenie (15 stron), omówienie badań własnych (68 stron), podsumowanie i dyskusję wyników (7 stron), część doświadczalną ("Materiały i metody", 16 stron) oraz bibliografię, obejmującą 194 pozycje.

Część zatytułowana "Wprowadzenie" obejmuje zwięzłe omówienie typów badanych klastrów boru (boranów, karboranów i metalokarboranów), oddziaływanie tych związków z białkami, zastosowanie klastrów boru w medycynie ze wskazaniem zalet tych związków i przykłady różnego typu klastrów ze wskazaniem ich charakterystycznych cech

strukturalnych. W dalszym fragmencie Autor opisuje albuminę, jej funkcje w organizmie i budowę, a także zagadnienie oddziaływania z lekami. Rozwija zagadnienie stosowania peptydów terapeutycznych i potrzebę tworzenia koniugatów oraz wyjaśnia sposoby wprowadzania leków do tkanki nowotworowej dzięki efektowi EPR. Kolejny fragment dotyczy peptydu tymozyny $\beta 4$ i jego roli w regeneracji uszkodzonych tkanek, w tym mięśnia sercowego, a jako strategię poprawy jego działania podaje tworzenie koniugatów zwiększających czas półtrwania, w wyniku czego następuje zwiększenie efektu terapeutycznego. Omówiony fragment jest logicznym i jasnym uzasadnieniem podjęcia zaplanowanych badań. Jednak końcowy fragment mówiący o tym, że klaster boru mają wysokie powinowactwo do albuminy, jest tylko ogólnym stwierdzeniem, popartym jednym odnośnikiem [9]. W tym fragmencie wyraźnie brakuje podania informacji literaturowych. Przykładowe publikacje podałem jako załączniki [1-3]:

[1] Goswami, L.N., Cai, Q., Ma, L., Jalisatgi, S.S., Hawthorne, M.F., *Org. Biomol. Chem.*, 13 (2015) 8912.

[2] Kracke, G.R., VanGordon, M.R., Sevryugina, Y.V., Kueffer, P.J., Kabytaev, K., Jalisatgi, S.S., Hawthorne, M.F., *ChemMedChem*, 10 (2015) 62.

[3] Golovina, G.V., Rychkov, G.N., Ol'shevskaia, V.A., Zaitsev, A.V., Kalinin, V.N., Kuzmin, V.A., Shtil, A.A., *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 13 (2013) 639.

W tym miejscu spodziewałem się opisu metod badania oddziaływań albumin z klasterami boru i ich koniugatami. Autor jednak nie wyodrębnił tych informacji literaturowych, umieszczając je w poszczególnych rozdziałach opisu badań własnych. Utrudnia to czytelnikowi ogólne zapoznanie się z metodyką tego typu badań. Chociaż nie jest to typowy układ rozprawy doktorskiej oddzielający część literaturową od badań własnych, to dzięki takiemu ujęciu możliwa jest łatwiejsza analiza postępowania w poszczególnych doświadczeniach i dokonywania modyfikacji eksperymentów.

Opis badań własnych podzielony jest na dwie części. Pierwsza z nich obejmuje badania powinowactwa klasterów boru do albumin. Obszerne badania obejmują 16 związków boru należących do klasy boranów, karboranów i metalokarboranów i zaczynają się od pomiarów wygaszania fluorescencji. Badania są logicznie zaplanowane, zaczynają się od wstępnej oceny powinowactwa i doboru stężeń. Dalej następuje badanie mechanizmu (badania temperaturowe), określenie wartości stałych wiązania i parametrów termodynamicznych. Z wartości tych parametrów określono dominujące typy oddziaływań oraz oceniono które rodzaje związków boru oddziałują najsilniej i jaki jest wpływ podstawników.

Wyniki tej części pracy potwierdziły użyteczność badań oddziaływań albumina - związek boru. Jednak zastosowana metodyka jest trudna do wykorzystania jako dostępna metoda analityczna. Jako szybką metodę Autor zaproponował metodę SPR, w której albumina jest immobilizowana na powierzchni złota, analitem jest klaster boru, a mierzony jest współczynnik refrakcji. Wykonano pomiary z użyciem związku referencyjnego, warfaryny, osiągając szybką asocjację i dysocjację i bardzo dobrą powtarzalność wyników. Jednak badania prowadzone dla klasterów boru wykazały osiągnięcie wysycenia miejsc wiążących, co uniemożliwiło wyznaczenie wartości stałej K_D . Doktorant zastosował więc zmodyfikowaną metodę pomiaru przy pojedynczym stężeniu. Metoda ta nie pozwala na określenie bezwzględnych wartości powinowactwa, jednak zastosowanie związków referencyjnych (warfaryny i ibuprofenu) pozwoliła prowadzić badania tą metodą. Wyniki badań są zgodne z rezultatami badań wygaszania fluorescencji. Z wyjątkiem dodekaboranu badane związki wykazują wysokie powinowactwo do albuminy, co najmniej na poziomie związków referencyjnych.

Druga część badań własnych Autora obejmuje syntezę koniugatów peptydu T β 4 z wybranymi klasterami boru i badania ich oddziaływań z albuminą, uzupełnione o badanie wpływu utworzenia koniugatu na aktywność biologiczną peptydu. Autor wybrał do badań dwa klaster boru - CoD, wykazujący najwyższe powinowactwo do albuminy i dodekaboran, który nie oddziałuje z albuminą. Analizując opisane w literaturze reakcje w roztworach i w ciele stałym wybrał on do reakcji oksoniowe addukty związków boru, które po otwarciu dają połączenie przez linker, istotne z punktu widzenia zachowania aktywności biologicznej peptydu. Reakcje były prowadzone w ciele stałym, aby uniknąć denaturacji białek. Prowadzenie reakcji w różnych warunkach dało koniugaty o różnych stopniach podstawienia. Dla związków o jednokrotnym podstawieniu związek boru może być przyłączony w różnych miejscach sekwencji aminokwasów peptydu. Autor zastosował zaawansowane techniki rozdziału i identyfikacji produktów. Stwierdził, że modyfikacji ulegają wszystkie grupy karboksylowe peptydu. Wyodrębnił on 9 koniugatów dodekaboranu i 5 dla CoD, określił ich stabilność badając hydrolizę wiązania estrowego przy różnych wartościach pH. Stwierdził, że stabilność koniugatów zależy od aminokwasu wiążącego związek boru (mała dla Asp, duża dla Glu) i od pH. Ważnym stwierdzeniem było, że hydroliza prowadzi do niezmiennego peptydu T β 4.

Po syntezie i wyodrębnieniu koniugatów Autor badał ich oddziaływanie z HSA obydwoma opisanymi technikami (wygaszenie fluorescencji i SPR). Dla niezwiązanego CoD otrzymał on podobne wyniki jak w I części dla BSA, co pozwala na używanie białka BSA

jako modelowego. Wartości otrzymane dla koniugatów są porównywalne dla otrzymanych dla samego metalokarboranu, a miejsce modyfikacji nie ma wpływu na wartości. Pomiary SPR wykazały, że peptyd T β 4 wykazuje brak powinowactwa do HSA, koniugaty T β 4-B₁₂H₁₂ mają słabe powinowactwo, a koniugaty T β 4-CoD wykazują różnice w kinetyce asocjacji i dysocjacji. Autor udowodnił również metodą dichroizmu kołowego, że tworzenie kompleksów z koniugatami T β 4-CoD nie wpływa strukturę drugo- i trzeciorzędową białka. Ostatnim fragmentem badań było sprawdzenie, czy przyłączenie klasteru boru wpływa na toksyczność (nie spowodowało wystąpienia toksyczności) i na aktywność biologiczną (nie zmniejszyło działania ochronnego wobec komórek kardiomyocytów H9C2).

Ostatnią częścią opisową pracy jest rozdział "Materiały i metody". Doktorant bardzo szczegółowo opisał przygotowanie materiału, prowadzenie pomiarów i opracowanie wyników.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi omówienie wyników bardzo obszernych badań w ważnej z punktu widzenia praktycznych zastosowań dziedzinie wiedzy. Doktorant prowadził badania, wykorzystując wyniki kolejnych etapów do zaplanowania następnych. Wykazał się znajomością metod syntezy koniugatów, ich rozdziału i analizy z użyciem nowoczesnych metod badawczych. Wykorzystał zaawansowane techniki do określenia oddziaływań. Wyniki badań są bardzo dobrze opracowane, a ich prezentacja, zarówno w postaci graficznej jak i tabelarycznej, bardzo jasna i czytelna. Po każdym fragmencie badań następuje podsumowanie, umożliwiające ocenę danego etapu. Ta forma pozwala czytelnikowi śledzić cały ciąg prowadzonych badań i znaleźć uzasadnienie doboru metod badawczych i badanych układów. Niezależnie od wymienionych cząstkowych podsumowań, Autor przedstawił wyczerpująco "Podsumowanie i dyskusję wyników", obejmujące całość pracy.

Należy podkreślić, że Doktorant opublikował część swoich wyników w trzech publikacjach, a także przedstawił je na 3 konferencjach, w tym dwóch międzynarodowych. Kierował również grantem Preludium10 przyznany przez Narodowe Centrum Nauki. Za wkład w uzyskanie międzynarodowego certyfikatu przez laboratorium NEOLEK uzyskał nagrodę dyrektora laboratorium.

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest bardzo starannie przygotowana, a korekta tak staranna, że wyeliminowała "literówki". Mimo bardzo starannej lektury znalazłem tylko nieliczne błędy, które wymieniam z obowiązku recenzenta:

str. 14: estry borowe (powinno być: boronowe),

str. 15: orto (nie: ortho),

str. 19: bilirubina - produkt rozpadu tlenu (????),

str. 47: ponieważ, ... (jedyne błęd interpunkcyjny, jaki znalazłem).

Trochę więcej uwag mam do bibliografii:

[22] i [31]: "center do center dot center dot (chyba skopiowane z Web of Science) zamiast D-H...H-A,

tytuły czasopism: całe tytuły, np. [32] lub ich skróty [45] dla tego samego czasopisma, skróty z kropkami [52] lub bez (większość).

W konkluzji stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska jest wartościowym opracowaniem dobrze przygotowanych i przeprowadzonych badań dotyczących ważnych z punktu widzenia potencjalnych zastosowań układów. Rozprawa spełnia wymagania wynikające z art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pana mgr. inż. Krzysztofa Finka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę szeroki zakres badań, ich wysoki poziom merytoryczny oraz wyróżniający poziom opracowania, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu o wyróżnienie rozprawy Pana mgr. inż. Krzysztofa Finka.



Prof. dr hab. inż. Andrzej Sporzyński