



dr hab. Magdalena Małecka
adiunkt Uniwersytetu Łódzkiego

Łódź, 4 września 2016

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Bartosza Sekuły pt. „**Badania strukturalne końskiej albuminy surowiczej (ESA) w kompleksach z ligandami o znaczeniu terapeutycznym**” wykonanej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem dr hab. inż. Anny Bujacz.

Badania strukturalne białek w oparciu o eksperyment rentgenowski stanowią dziś ważną dyscyplinę naukową, która dostarcza cennych informacji o strukturze przestrzennej makromolekuł. Krystalografia białek ma duże znaczenie m.in. w przemyśle farmaceutycznym, gdzie wspomaga badania projektowania leków poprzez dokładną analizę np. zdolności wiążących białek ze związkami stosowanymi jako terapeutyki.

Rozprawa doktorska mgr inż. Bartosza Sekuły doskonale wpisuje się w ten nurt badań krystalograficznych i jest poświęcona badaniom strukturalnym końskiej surowiczej albuminy (ESA) w kompleksach z ligandami. Wybrane ligandy to niesteroidowe leki przeciwzapalne takie jak: diklofenak, ibuprofen, naproksen i suprofen, antybiotyki takie jak: ampicylina, chloramfenikol, chlorotetracyklina i oksacylina oraz kwas 3,5-dijodosalicylowy. Wyznaczenie struktury krystalicznej kompleksów ESA z w.w. ligandami zostały zwieńczone pełną charakterystyką kieszeni wiążących białka, które są odpowiedzialne za transport wspomnianych leków w krwiobiegu.

Przedstawiona do recenzji praca ma klasyczny układ. Autor na 147 stronach przedstawia część teoretyczną i eksperymentalną wraz z dyskusją wyników. W części teoretycznej można wyróżnić dwa główne nurty: wstęp wraz z wprowadzeniem do zagadnień związanych z tematyką pracy, czyli: funkcją, budową i charakterystyką strukturalną albuminy surowiczej (26 stron) oraz opis metodyki prowadzonych badań (25 stron), czyli krystalizacja, wykonanie eksperymentu dyfrakcyjnego i rozwiązanie struktury białka. Drugą część pracy stanowi opis wykonanych przez doktoranta eksperymentów (15 stron), oraz przedstawienie i podsumowanie wyników jak również ich dyskusja (54 strony). Doktorant przedstawił bardzo dobrze napisane zwięzłe streszczenie informujące o najważniejszych osiągnięciach pracy. Rozprawę kończy spis odnośników do cytowanej literatury obejmujący 235 pozycji, spis rysunków i tabel oraz przedstawienie dorobku naukowego doktoranta.

W części literaturowej Autor w kompetentny sposób dokonuje charakterystyki rodziny białek albuminy surowiczej, składającej się dodatkowo z α -fetoproteiny, afaminy i białka wiążącego witaminę D. Białka te wykształciły znakomite zdolności transportowe. Doktorant w sposób szczegółowy omawia procesy ewolucyjne oraz podobieństwa i różnice strukturalne i funkcjonalne tej rodziny białek. Na uwagę zasługuje dokładny i czytelny opis kieszeni wiążących ludzkiej albuminy surowiczej.

Kolejny rozdział z części literaturowej poświęcony jest aspektom związanym z biodostępnością leków. Autor opisuje tutaj jakie wymogi powinien spełniać farmaceutyk, tak aby efekt leczniczy był jak największy. Dystrybucja leku ma tu ogromne znaczenie, a m.in. stopień oddziaływania leku z białkami osocza. To, w jakim stopniu dane leki wiązane są przez białka osocza, jest głównym wyznacznikiem dystrybucji leku w organizmie, a albumina surowicza jako główne białko

osocza odgrywa w tych procesach szczególną rolę. Z tego też powodu wybór obiektu badań – końskiej albuminy surowiczej wydaje się w pełni uzasadniony.

W następnym rozdziale doktorant opisuje bardziej szczegółowo najciekawsze cechy strukturalne i mechanizm działania leków wiązanych przez albuminę. Ze wstępu pracy już wiadomo, że doktorant wybrał 9 leków, które posłużyły mu jako ligandy kompleksów krystalicznych ESA w celu poznania zdolności wiążących ESA z wybranymi farmaceutykami. Należą do nich niesteroidowe leki przeciwzapalne takie jak: diklofenak, ibuprofen, naproksen i suprofen, antybiotyki takie jak: ampicylina, chloramfenikol, chlorotetracyklina i oksacylina oraz kwas 3,5-dijodosalicylowy. Przegląd literaturowy jest pełny, oparty na najnowszej literaturze i dotyczy zastosowania, działania i farmakokinetyki nie tylko zastosowanych do ko-kryształizacji leków, ale również całej podobnej grupy farmaceutyków.

Rozdział III poświęcony jest metodyce badań, gdzie Autor opisuje wszystkie etapy „od kryształu do struktury białka”. Wymienia tutaj najpopularniejsze etapy krystalizacji białek, sposoby zabezpieczania kryształów białek przed zamrożeniem, opisuje podstawy teoretyczne dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na kryształach, metody pomiaru dyfrakcyjnego w tym pomiaru w ośrodku wykorzystującym promieniowanie synchrotronowe i w ostatnim podrozdziale przechodzi do metod rozwiązywania struktury krystalicznej białek.

Warte podkreślenia jest to, że część teoretyczna pracy jest napisana zwięźle i zrozumiale, w sposób przemyślany, a efekt jest taki, że Autor wprowadza czytelnika doskonale w tematykę pracy.

Część badawcza pracy koncentruje się wokół siedmiu głównych zagadnień t.j. sposobów oczyszczania albuminy, tworzeniu kompleksów albuminy z ligandami i krystalizacja tych kompleksów, rejestracji danych dyfrakcyjnych, określenie struktury krystalicznej kompleksów ESA z ligandami oraz pomiary kalorymetryczne i spektroskopowe tych kompleksów. W tym miejscu nie sposób wspomnieć o dużej liczbie analizowanych struktur. Wykonanie chociażby samych pomiarów dyfrakcyjnych na synchrotronie dla 13 struktur jest dużym wyzwaniem, trudnym logistycznie i wymagającym doskonale i w sposób przemyślany zorganizowania sobie warsztatu eksperymentalnego. Czy doktorant uczestniczył we wszystkich tych pomiarach ?

Celem rozprawy było zbadanie i identyfikacja charakteru oddziaływań końskiej albuminy surowiczej z wybranymi związkami należącymi do grupy leków, które są transportowane przez albuminę w układzie krążenia. Miało to doprowadzić do strukturalnej identyfikacji kieszeni wiążących albuminy surowiczej. Pan Bartosz w szczegółowy sposób opisuje swoją żmudną drogę do zidentyfikowania kieszeni wiążących albuminy oraz jakie oddziaływania są odpowiedzialne za wiązanie wybranego leku. W strukturze ESA doktorant zidentyfikował osiem kieszeni wiążących, które oddziałują z badanymi ligandami. Zaobserwował również związane ligandy pochodzące z roztworów krystalizacyjnych i krioprotekcyjnych. Badania właściwości wiążących doktorant rozpoczął od kompleksu z jodową pochodną kwasem 3,5-dijodosalicylowym. Związek ten zawiera w swojej cząsteczce dwa ciężkie atomy jodu, które są bardzo dobrze widoczne na 'zawiłych i skomplikowanych', mapach gęstości elektronowej. Doktorant wykorzystał ten związek jako sondę do identyfikacji i charakterystyki kieszeni ESA. Nasuwa się pytanie: Czy możliwa by była identyfikacja kieszeni ESA z innym 'lżejszym' związkiem współkrystalizującym z białkiem.? Jak wyznacza się takie granice w identyfikacji kieszeni wiążących?

W kolejnym etapie doktorant zbadał naturę oddziaływania ESA z lekami przeciwzapalnymi. Ciekawy jest wniosek, że kieszeń DS2 w czasie wiązania leków IBU (ibuprofen) i SUP(suprofen), wykazuje, że jedynymi wiązanyimi formami są enancjomery o konfiguracji absolutnej (S). Doktorant podsumowuje, że wobec profenów zdolności wiążące dwóch kieszeni ESA, DS2 i FA6, są bardzo podobne w albuminach innego pochodzenia. Czy również preferowane jest wiązanie przez inne albuminy enancjomerów o konfiguracji (S) ? W tym rozdziale bardzo ciekawie prezentują się badania konkurencyjności dwóch leków diklofenaku i naproksenu. Doktorant badał konkurencyjność leków dwiema metodami: poprzez współkryształizację i namaczanie. Interesuje mnie czy zwiększony czas namaczania pozwoliłby na przyłączenie cząsteczki NPS do kieszeni FA6?, Czy roztwór użyty do współkryształizacji i namaczania był tak samo stężony? Czy zmiana kolejności namaczania dałaby podobne wnioski? Czy można wnioskować ze takie badania cyt: 'pokazują że NPS jest silniej wiązany niż DIC w kieszeni DS2'; może wystarczy zwiększyć stężenie leku?

Ostatni rozdział przedstawiany przez doktoranta w wynikach dotyczy oddziaływania ESA z antybiotykami. Kompleksy z ampicyliną i oksacykliną zostały uzyskane zarówno poprzez kryształizację i namaczanie. Analiza struktur tych kryształów wskazała, że kieszenią odpowiedzialną za wiązanie antybiotyków jest kieszeń FA6. Natomiast struktury kompleksów z z chloramfenikolem i chlorotetracykliną wykazują ich wiązanie do więcej niż jednej kieszeni ESA: chloramfenikol wiązany jest do kieszeni DS2, FA9 i we wnęce pomiędzy subdomenami IA/IB, a chlorotetracykliną wiązana jest w czterech kieszeniach: FA6, FA6', FA9, oraz pomiędzy domeną li III.

Ogólny wniosek przedstawiony przez doktoranta brzmi: 'na podstawie porównania dotychczas zebranych danych widać, że pomimo dużego ogólnego podobieństwa strukturalnego i sekwencyjnego pomiędzy albuminami, zdolność do wiązania poszczególnych substancji, a więc i cechy transportowe, są w pewnym stopniu cechą charakterystyczną dla danego gatunku.'

Niewątpliwie realizacja założonych celów wymagała od doktoranta przeprowadzenia wielu eksperymentów w laboratorium chemicznym, pomiarów dyfrakcyjnych, obliczeń komputerowych i oczywiście dogłębnych i czasochłonnych studiów literaturowych.

Wszystkie przedstawione badania zawarte w przedłożonej do oceny pracy zostały wykonane i opisane poprawnie. Rozdziały części eksperymentalnej kończą się zwięzłym podsumowaniem i trafnymi wnioskami.

Część badań jakie przedstawił doktorant w swojej pracy doktorskiej znalazły już odzwierciedlenie w publikacjach naukowych w czasopismach z listy filadelfijskiej: *Journal of Medicinal Chemistry, Proteins, International Journal of Biological Macromolecules, Bioscience Reports*.

Doktorant ogólnie jest współautorem 5-ciu publikacji naukowych i ta ilość świadczy o dużym zaangażowaniu w prace badawcze zespołu, w którym realizował swój doktorat, a przy okazji potwierdza wysokie kompetencje Promotora pracy.

W pracy nie znajduję poważniejszych błędów czy też istotnych niedociągnięć, czytało się ją bardzo dobrze. Zdarzyły się bardzo drobne błędy literowe, a żeby nie być gołosłowną to kilka z nich wymienię:

1. Strona 81:...i grupą aminową łańcucha głównego Lys544 (kąt C-I...O)...: powinno być C-I...N
2. Strona 85: powinno być analizie



Podsumowując, moim zdaniem praca pana mgr inż. Bartosza Sekuły jest bardzo dobra. Eksperymenty zostały dokładnie zaplanowane i wykonane. Pan Bartosz opisuje nowe nie znane dotąd właściwości transportowe końskiej albuminy surowiczej. Widać, że doktorant dysponuje ogromną wiedzą z zakresu krystalografii i biochemii. Z tych właśnie powodów praca doktorska zasługuje na wyróżnienie i składam Komisji odpowiedni wniosek. Rozprawa spełnia wymogi formalne stawiane pracom doktorskim, dlatego wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku
dr hab. Magdalena Małecka