



Prof. dr hab. Wojciech Kamysz

Gdańsk, 18.06.2018

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej

Wydział Farmaceutyczny

Gdański Uniwersytet Medyczny

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „Substraty i niskocząsteczkowe inhibitory wybranych enzymów proteolitycznych z rodziny kalikrein. Synteza chemiczna i badania enzymatyczne.”,

wykonanej przez Panią magister Annę Wojtysiak.

Niewątpliwie, istotnym elementem organizmów żywych są peptydy i białka, które pełnią wiele funkcji m.in. strukturalne, transportowe, enzymatyczne, receptorowe, regulacyjne i ochronne. Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej było poszukiwanie selektywnych substratów oraz inhibitorów kalikreiny 14 oraz możliwości ich wykorzystania w różnych układach biologicznych. Kalikreina 14 jest proteazą serynową, której aktywność wiązana jest z nowotworami m.in. prostaty, jajników i sutka. Postuluje się, że bierze ona udział w rozwoju nowotworu. W związku z tym jest ona potencjalnym celem molekularnym w terapii przeciwnowotworowej, a także biomarkerem chorób nowotworowych, co może zostać wykorzystane w diagnostyce. Nowotwory są bardzo częstą przyczyną zgonów, zaś liczba zachorowań rośnie z roku na rok. Skuteczność terapii jak i wczesna diagnostyka są wciąż niezadowolające, pomimo ogromnych wysiłków środowiska medycznego i naukowców. W związku z tym zasadne jest poszukiwanie nowych i skutecznych rozwiązań w tym zakresie. Niewątpliwie praca doktorska Pani magister Anny Wojtysiak wpisuje się w jakże ważny nurt badań nad nowymi celami molekularnymi.





Układ pracy doktorskiej jest typowy dla tego typu opracowań. Liczy ona aż 240 stron i podzielona została na dziewięć głównych rozdziałów: przegląd literaturowy, cel pracy, badania własne, wyniki i dyskusja, wnioski, dorobek naukowy, wykaz rysunków, wykaz tablic, oraz cytowana literatura. W opinii recenzenta można by zawarty materiał skrócić, może nawet o połowę. W części teoretycznej szeroko i szczegółowo opisano kalikreiny, a także zjawisko proteolizy, enzymy proteolityczne, inhibitory enzymów proteolitycznych ze szczególnym uwzględnieniem proteaz serynowych, chemię kombinatoryczną, a także dokonano przeglądu technik stosowanych do oznaczania aktywności proteaz. Opisano w niej najważniejsze informacje, które podkreślają sens prowadzonych badań oraz pozwalają lepiej zrozumieć część dotyczącą badań własnych. Przegląd literaturowy został przeprowadzony skrupulatnie co znajduje swoje odzwierciedlenie w ilości cytowanych źródeł (340). Warto nadmienić, że literatura cytowana jest w sposób jednolity. Wyznaczone zostały trzy główne cele pracy, które można opisać jako poszukiwanie selektywnych substratów i selektywnych niskocząsteczkowych inhibitorów kalikreiny 14 oraz próbę wykorzystania otrzymanych związków do identyfikowania aktywności hK14 w układach biologicznych. Metodyka badań została opisana bardzo dokładnie a jej zrozumienie ułatwiają przygotowane rysunki, których w całej pracy znajdziemy 126. Ponadto w rozprawie zamieszczono 38 tablic. Praca napisana jest w sposób poprawny i z pewnością przykuwająca uwagę jest jej estetyka.

Tematyką badawczą, którą Recenzent zajmuje się na co dzień jest synteza peptydów, dlatego też szczególna uwaga w recenzji została poświęcona tym częściom pracy, które się do niej odnoszą. Rolą Recenzenta jest nie tylko podkreślenie zalet pracy, lecz także wskazanie uchybień, niedociągnięć i błędów. Przykłady takich niedociągnięć stanowią:



- Na stronie 116 dowiadujemy się, że podczas przyłączenia C-końcowej reszty aminokwasowej do 17,1 g żywicy substrat rozpuszczano w 170,1 ml pirydyny, zaś na 1 gram żywicy przypadało 10 ml pirydyny (powinno być 171 ml pirydyny).
- Na stronie 109 podczas rozwinięcia nazwy dla DIPEA zapisano „N,N'-diizopropylamina” zamiast „N,N-diizopropylamina”, szczegół, ale warto zapisywać poprawnie.
- Na stronie 109 podano wymiary kolumny stosując dwie jednostki – długość w centymetrach, zaś średnicę w milimetrach; ogólnie przyjętą normą jest podawanie obu wymiarów w milimetrach.
- Na stronie 112 zapisano „naczynka Marrfielda zakończonego szklanym spiekem” zamiast „naczynia Merrifielda”; Ponadto na stronie 115 można przeczytać o „naczynku Merffielda” (jeszcze inny zapis).
- Na stronie 114 opisano szczegółowo procedurę przygotowania żywicy. Podczas jednego z etapów pęcznienia żywicy wykorzystano izopropanol. Jego wykorzystanie nie jest jasne ze względu na słabe pęcznienie żywicy w tym alkoholu. Najlepszym rozwiązaniem jest wykorzystanie DMF, DCM lub NMP.
- Na stronie 115 dowiadujemy się o metodach sprzęgania i odczynnikach wykorzystanych do tego celu. Interesującym jest fakt wykorzystania aż trzech różnych odczynników sprzęgających. Czy zastosowanie większego nadmiaru i wybranie jednego odczynnika nie dawało zadowalających rezultatów?
- Na stronie 117 możemy przeczytać o negatywnym teście chloranilowym. W pracach o charakterze naukowym powinno unikać się wszelkich skrótów myślowych. Zwrot „negatywny wynik testu chloranilowego” jest bardziej trafnym sformułowaniem.



- Na stronie 119 podrozdział 3.2.4. został zatytułowany – „usunięcie peptydów z nośnika stałego”. Nie jest to poprawne określenie. Właściwym byłoby nazwanie tegoż podrozdziału – „odszczępienie peptydów od nośnika stałego”. Ponadto odszczepianie peptydów prowadzono przez trzy godziny. W mojej ocenie czas ten można skrócić bez uszczerbku dla wydajności czy jakości otrzymanego produktu syntezy.

- Osobnego komentarza wymaga prowadzenie analiz HPLC przy długości fali równej 226 nm. Peptydy powinny być analizowane przy długości fali 214nm. Recenzent pracy przez wiele lat robił ten sam błąd.

Nie wszystkie uwagi wymieniam w recenzji. Są bowiem one na tyle mało istotne, że nie wazą na bardzo wysokiej wartości pracy. Doktorantka bez wątpienia włożyła duzo wysiłku zarówno w laboratorium jak i podczas pisania dysertacji.

W pracy doktorskiej znajduje się rozdział – WNIOSKI. Zamieszczone tam stwierdzenia nie zawsze są wnioskami, a często przypominają streszczenie dokonań. Na przykład na str. 209, w pkt. 11 możemy przeczytać – „Przedstawiłam możliwości zastosowania różnorodnych technik do badania procesów proteolizy, a w tym metody fluorescencyjne i elektrochemiczne”. Zdanie to nie wnosi istotnych informacji, nie wyłania się z niego konkretny wniosek, a także nie mówi wiele o wyniku pracy. Mimo dysonansu, którego można doświadczyć, jest to bardzo przydatny rozdział, gdyż zwięźle podsumowuje pracę.

Tematyka poruszona przez Panią magister Annę Wojtysiak jest aktualna ze względu na wagę problemu jakim są choroby nowotworowe. Wszelkie próby, których rezultaty mogą przyczynić się do opracowania nowych rozwiązań, zarówno terapeutycznych jak i diagnostycznych, zasługują na szczególną uwagę i uznanie. Za najbardziej doniosłe osiągnięcia uznaję:



- Otrzymanie bibliotek tetra- i heptapeptydowej, które doprowadziło do zsyntezowania substratów fluorescencyjnych będących selektywnie hydrolizowanymi przez hK14 (ABZ-YGPR-ANB-NH₂ oraz ABZ-YGPRVLPY(3-NO₂)-NH₂);
- Otrzymanie serii analogów fosfonowych przy współpracy z grupą badawczą dr. hab. inż. Marcina Sieńczyka (Politechnika Wrocławska) oraz sondy Biotyna-YGPR-CMK będących inhibitorami hK14;
- Znalezienie zastosowania dla otrzymanych związków i wstępne badania wykazujące różnice w aktywności enzymatycznej hK14 w próbkach śliny od osób zdrowych i pacjentów z nowotworem ślinianek.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej Pani magister Anny Wojtysiak należy uznać, że jest ona pracą nowatorską i niewątpliwie przedstawia interesujące rezultaty. Wyniki pracy stanowią dobrą podstawę do podjęcia dalszych działań mających na celu potwierdzenie wstępnych obserwacji wynikających z badań wstępnych dotyczących analizy aktywności enzymatycznej hK14 u osób z nowotworem ślinianek. W celu realizacji niniejszej pracy Pani magister Anna Wojtysiak umiejętnie zaplanowała wszystkie eksperymenty i wykazała się znajomością wielu technik laboratoryjnych. W ramach pracy otrzymano biblioteki peptydów oraz przeprowadzono badania enzymatyczne (kinetyka, inhibicja). Wykonano także badania aktywności hK14 przy wykorzystaniu wcześniej otrzymanych koniugatów peptydów z kropkami kwantowymi oraz przy zastosowaniu modyfikowanych elektrod złotych, dzięki którym potwierdzono możliwość ich wykorzystania do tego typu pomiarów. Ponadto podjęto próbę zastosowania otrzymanych związków w układach biologicznych. Niniejszą rozprawę doktorską oceniam jako bardzo wartościową pracę.

Stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach



i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego prośbę o przyjęcie wniosku o dopuszczenie Pani Magister Anny Wojtysiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej

prof. dr hab. Wojciech Kamysz