

**Ocena pracy doktorskiej mgr. inż. Krzysztofa Śmiałkowskiego
pt. „Oligofunkcjonalizacja klasterów boru jako bloków budulcowych
nowych materiałów i związków bioaktywnych”**

wykonana w oparciu o uchwałę Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej
Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Pracowni Chemii Medycznej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, pod opieką merytoryczną prof. dr. hab. Zbigniewa J. Leśnikowskiego. Praca ta została zrealizowana w ramach projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt.: „Oligopodalne kompozyty kwasów nukleinowych i klasterów boru – nowy materiał dla bionanotechnologii” (konkurs Symfonia 3, grant 015/16/W/ST5/00413). Jej podstawę stanowią dwa spójne tematycznie artykuły naukowe, opublikowane na łamach czasopism *Molecules* oraz *Chemistry – A European Journal*:

(i) Śmiałkowski, K.; Sardo, C.; Leśnikowski, Z.J. Metallacarborane synthons for molecular construction – oligofunctionalization of cobalt bis(1,2-dicarbollide) on boron and carbon atoms with extendable ligands. *Molecules* 2023, 28, 4118.

(ii) Bednarska-Szczepaniak, K.; Ebenryter-Olbińska, K.; Gajek, G.; Śmiałkowski, K.; Suwara, J.; Fiedorowicz, L.; Leśnikowski, Z. Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity. *Chem. Eur. J.* 2024, 30(14) e202303531.

Ponadto, wyniki prac eksperymentalnych dedykowane zaprojektowanym nanocząsteczkom trzeciej generacji, posiadającym zdolność wyciszania ekspresji receptora nabłonkowego czynnika wzrostu, stanowią przedmiot rozważań podejmowanych w toku artykułu zatytułowanego *Synthesis of DNA-metallacarborane composites and assembly into functional nanoparticles with anti-EGFR gene silencing activity*, autorstwa Śmiałkowski, K.; Bednarska-Szczepaniak, K.; Kulik, K.; Suwara, J.; Grúner, B.; Nawrot, B.; Leśnikowski Z.J. (manuskrypt w przygotowaniu).

Formalna ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawa oprócz kopii ww. publikacji, zawiera nieco ponad stustronicowy komentarz obejmujący charakterystykę dotychczasowej aktywności naukowo-dydaktycznej doktoranta, streszczenie w języku polskim i angielskim, cel rozprawy, wstęp literaturowy oraz obszerny

komentarz wraz z odniesieniami literaturowymi prezentujący omówienie wyników badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej wraz z podsumowaniem. Ponadto, doktorant przedstawił oświadczenia współautorów prac o ich roli oraz wkładzie merytorycznym. Z oświadczeń można jednoznacznie wywnioskować, iż jego rola w zakresie opracowania i optymalizacji metod otrzymywania klasterów boru jako platform do przyłączenia DNA-oligomerów, a także w zakresie ich pełnej charakterystyki metodami chromatograficznymi oraz spektroskopowymi, była wiodąca.

Rozprawa doktorska pana mgr. inż. Krzysztofa Śmiałkowskiego przygotowana została ze starannością i napisana na poziomie bardzo dobrego dyskursu naukowego. Tekst czyta się bardzo dobrze, a skala usterek edytorskich (których nie będę wymieniać w recenzji – na niektóre z nich zwrócę uwagę doktorantowi indywidualnie) nie narusza uznania dla staranności redakcji. Wstęp literaturowy dedykowany oligofunkcjonalizacji klasterów boru jako platform dla DNA-oligonukleotydów i bloków budulcowych do konstrukcji nanocząstek jako nośników terapeutycznych kwasów nukleinowych został wykorzystywany problemowo – w odniesieniu do bezpośrednio realizowanych zadań badawczych, a nie w formie samodzielnego, autonomicznego rozdziału w pracy o ograniczonej użyteczności. Autor rzetelnie zaprezentował dogłębną analizę danych literaturowych, jak na pracę doktorską o charakterze syntetycznym przystało, i podjął się próby skatalogowania zmieniającej się reaktywności atomów boru i węgla celem wyjaśnienia preferencyjnego tworzenia się pochodnych dwupodstawionych (metalo)karboranów względem ich pochodnych monopodstawionych, w kontekście ukierunkowanej oligofunkcjonalizacji karboranów i metalokarboranów. Świadczy to o dobrze opanowanym warsztacie badawczym autora. W kontekście tytułu rozprawy doktorskiej, mój niedosyt po lekturze *Wstępu literaturowego* budzi jedynie brak szerszego komentarza autora w zakresie potencjalnych zastosowań (metalo)karboranów jako bloków budulcowych nowych (bio)materiałów i związków bioaktywnych. Z pewnością taki podrozdział stanowiłby cenne źródło inspiracji dla badaczy zajmujących się modyfikacją strukturalną i projektowaniem nowatorskich klasterów boru oraz nanocząsteczek w oparciu o ich strukturę, otwierając drogę zarówno do wydajnych i selektywnych procesów technologicznych, jak i nowych (bio)materiałów i związków o potencjale terapeutycznym.

Ocena merytoryczna rozprawy

Prowadząc badania z perspektywy obranych zamierzeń badawczych, autor recenzowanej rozprawy doktorskiej przyjął jako ich cel zasadniczy stworzenie podstaw chemicznych umożliwiających syntezę kompozytów klasterów boru i antysensowych DNA-oligonukleotydów stanowiących bloki budulcowe nowego typu nanocząsteczek, nośników terapeutycznych kwasów nukleinowych zdolnych do jednoczesnego wyciszania dwóch oknogenów; receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) i protoonkogenu komórkowego c-MYC ulegających nadekspresji w wielu typach komórek nowotworowych. Prowadząc badania dedykowane oligofunkcjonalizacji (metalo)karboranów jako platform dla antysensowych DNA-oligonukleotydów, mgr inż. Krzysztof Śmiałkowski zajmował się także opracowaniem syntezy bloków budulcowych nanocząsteczek trzeciej generacji wykazujących zdolność wyciszania ekspresji receptora nabłonkowego czynnika wzrostu oraz prekursorskich analogów genisteiny modyfikowanych klasterem boru, o potencjalnej zdolności do selektywnego modulowania aktywności receptora estrogenowego.

Tak postawione cele badawcze świadczą o spełnieniu podstawowego kryterium dla oceny pracy doktorskiej – dowodzą zidentyfikowania problemu badawczo-naukowego, w tym przypadku związanego z nurtem poszukiwań nanocząsteczek opartych o motyw (metalo)klasteru boru jako nośnika terapeutycznych kwasów nukleinowych. Do realizacji tak zakreślonego celu badawczego pan mgr inż. Krzysztof Śmiałkowski skutecznie przeprowadził serię żmudnych, trudnych i wieloetapowych prac eksperymentalnych, zrealizowanych w ramach ośmiu zasadniczych zadań szczegółowych obejmujących: *i*) oligofunkcjonalizację *orto*-karboranu; *ii*) oligofunkcjonalizację metalokarboranu zawierającego jon kobaltu (COSANU); *iii*) syntezę estru tiofosforanowego COSANU o zahamowanej rotacji ligandów karboranylowych; *iv*) opracowanie metody jego alkilowania na atomie siarki trytyloksyalkilowymi odczynnikami liniowymi i rozgałęzionymi oraz następczą funkcjonalizację otrzymanego syntonu na atomach węgla w reakcji z tlenkiem etylenu; *v*) opracowanie metody syntezy syntonu na bazie oligofunkcjonalizowanego COSANU do otrzymywania kompozytów DNA i klasterów boru trzeciej generacji; *vi*) syntezę bloków budulcowych nanocząsteczek drugiej oraz trzeciej generacji; *vii*) składanie otrzymanych bloków budulcowych w nanocząsteczki drugiej generacji; *viii*) opracowanie metody i synteza analogów genisteiny modyfikowanej klasterem boru.

Badania dotyczące syntezy bloków budulcowych nanocząstek drugiej oraz trzeciej generacji były prowadzone we współpracy z Pracownią Terapeutycznych Kwasów Nukleinowych Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych w Łodzi, zaś metodę syntezy syntonu do otrzymywania kompozytów DNA i klasterów boru trzeciej generacji doktorant opracował podczas stażu naukowego w Instytucie Chemii Nieorganicznej Czeskiej Akademii Nauk w Husinec-Řež.

Nie zgłaszam uwag do części syntetyczno-eksperymentalnej dysertacji, która znalazła swój wyraz w artykułach opublikowanych na łamach czasopism *Molecules* 2023, 28, 4118 oraz *Chem. Eur. J.* 2024, 30(14) e20230353. Na uznanie zasługuje fakt, że doktorant unika nadinterpretacji uzyskanych wyników (patrz str. 85: *Wielość obserwowanych sygnałów w widmach ¹¹B- i ³¹P-NMR ilustruje skomplikowaną stereochemię otrzymanych przez mnie oligofunkcjonalizowanych pochodnych COSANU, jednak na obecnym etapie badań nie pozwala na przypisanie poszczególnych sygnałów do poszczególnych diastereomerów o zdefiniowanej lokalizacji podstawników w jego strukturze*). W podrozdziale o alkilowaniu na atomie siarki cyklicznego estru tiofosforowego metalokarboranu (podrozdział 2.2.4) brakuje mi jednakże szerszego komentarza spostrzeżeń doktoranta odnośnie zaobserwowanej przez niego znacznie wyższej wydajności alkilowania atomu siarki liniowymi odczynnikami alkilującymi aniżeli odczynnikiem rozgałęzionym (patrz: str. 83), zaś rozdział 3 pomija opis badań dotyczący syntezy bloków budulcowych nanocząsteczek trzeciej generacji.

Zalety rozprawy doktorskiej

Z praktycznego punktu widzenia najważniejszą zaletą rozprawy jest opracowanie efektywnych metody funkcjonalizacji (metalo)karboranów warunkujących działanie terapeutyczne docelowych nanocząsteczek, kompozytów klasterów boru i terapeutycznych kwasów nukleinowych, posiadających zdolność równoczesnego wyciszania onkogenów EGFR i c-MYC, a także opracowanie pierwszych analogów genisteiny modyfikowanych klasterem boru przeznaczonych w szczególności do selektywnego modulowania aktywności

receptora estrogenowego. Biorąc pod uwagę poruszaną w pracy tematykę badawczą, niezwykle wartościowe dla chemii klasterów boru wnioski oraz wartość dodaną przeprowadzonych badań stanowią również zagadnienia spektroskopowe ($^{11}\text{B-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$, $^{31}\text{P-NMR}$) odnośnie wpływu podstawników na kwasowość grup C-H mierzonego wartością przesunięcia chemicznego, zmianę właściwości cząsteczki związanej ze zmieniającym się rozkładem gęstości elektronowych oraz stereochemię otrzymanych związków.

Należy jasno podkreślić, że tematyka rozprawy jest bardzo ambitna i dojrzała, daleka od przeciętnej na tym etapie kariery naukowej, zaś wartość merytoryczna osiągnięć przedstawionych w pracy jest wysoka. Jestem pod wielkim wrażeniem zarówno warsztatu syntetycznego doktoranta, jak i znajomości metod spektroskopowych. Z czysto poznawczego punktu widzenia, a także w kontekście potencjalnej możliwości zastosowania opracowanych nanocząsteczek w terapii farmakologicznej, ważny wątek dysertacji dla naukowców i badaczy zajmujących się poszukiwaniem nowych związków o znaczeniu terapeutycznym stanowiłaby ocena toksyczności otrzymanych nanocząsteczek, ich interakcji z albuminą, a także charakterystyka parametrów farmakodynamicznych oraz farmakokinetycznych zaprojektowanych struktur. Jak rozumiem, zagadnienia te były poza głównym obszarem badawczym przygotowanej dysertacji. A szkoda. I dedykuję autorowi tę uwagę w kontekście przyszłej aktywności naukowo-badawczej.

Wniosek końcowy

Z pełnym uznaniem odnoszę się do tematyki rozprawy, którą uważam za bardzo ambitną, poznawczo i praktycznie niezwykle wartościową, dalece powyżej przeciętnej na tym etapie aktywności naukowej. Doktorant wykazał się biegłością w zakresie zaprezentowanej tematyki i doskonałością warsztatu badawczego, analizy wyników i ich interpretacji, dowodząc tym samym opanowania zasad rzetelnej pracy naukowej. Z całkowitym przekonaniem stwierdzam, że oceniana dysertacja doktorska potwierdza ogólną wiedzę zarówno teoretyczną, jak i eksperymentalną doktoranta z obszaru chemii klasterów borów oraz zaświadcza o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i badawczej. **Przedmiotowa rozprawa z dużym naddatkiem odpowiada wszelkim wymaganiom formalnym i merytorycznym stawianym postępowaniom o nadanie stopnia doktora, określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Tym samym wnioskuję o dopuszczenie mgr. inż. Krzysztofa Śmiałkowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne w specjalizacji chemia medyczna.** Jednocześnie, biorąc pod uwagę wagę uzyskanych wyników, dojrzałość naukową i warsztatową doktoranta, wnoszę również o rozważenie możliwości wyróżnienia pracy.

powełr ogota