

Gdańsk, 09.08.2024 r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej **mgr. inż. Krzysztofa Śmiałkowskiego**

pt. *Oligofunkcjonalizacja klasterów boru jako bloków budulcowych
nowych materiałów bioaktywnych*

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski

„Niczego w życiu nie należy się bać, należy to tylko zrozumieć. Nauka leży u podstaw każdego postępu, który ułatwia życie ludzkie i zmniejsza cierpienie. Jestem z tych, którzy wierzą, że nauka jest czymś bardzo pięknym” – to słowa Marii Skłodowskiej-Curie, które przychodzą na myśl podczas lektury rozprawy doktorskiej mgr. inż. Krzysztofa Śmiałkowskiego. Bez wątpienia odwaga towarzyszyła Doktorantowi podczas realizacji projektu badawczego skoncentrowanego na opracowaniu metod syntezy pochodnych karboranów oraz ich analizie strukturalnej.

Warto zauważyć, że oligofunkcjonalizacja klasterów boru jest jednym z kierunków bogatej tematyki badawczej Pracowni Chemii Medycznej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Jego realizacja wymagała nawiązania współpracy z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN oraz Department of Pharmacy, University of Salerno. Praca doktorska mgr. inż. Krzysztofa Śmiałkowskiego jest dowodem na owocną współpracę interdyscyplinarną na wysokim poziomie naukowym.

Przechodząc do formalnej oceny przedłożonej rozprawy stwierdzam, że jest to dzieło skonstruowane w trafny sposób. Dysertację stanowi cykl dwóch artykułów naukowych zaopatrzoney w *Cel pracy*, *Wstęp literaturowy*, *Omówienie badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej*, *Podsumowanie* oraz *Bibliografię*. Nieco zaskakująca może być kolejność prezentowanych treści, a konkretnie zamieszczenie *Celu pracy* przed *Wstępem literaturowym*. Zwykle przegląd dotychczasowej wiedzy poprzedza cel, który jest formułowany na podstawie przeglądu literatury. Całości pracy dopełniają informacje nt. źródeł finansowania, wykazy publikacji oraz komunikatów konferencyjnych, streszczenie w języku polskim i języku angielskim, wykaz skrótów i spis treści, zamieszczone na początku opracowania. Do pracy dołączono osobno zbiór dziesięciu oświadczeń współautorów publikacji 1-2 stanowiących cykl w ramach pracy doktorskiej przedstawionej do recenzji,

w tym dwa oświadczenia Autora. Dysertacja zaopatrzona została w 1 zdjęcie, 12 tabel, 23 schematy i 24 rysunki, nie wliczając tych zawartych w cyklu publikacyjnym.

Cel pracy został sprecyzowany w jasny sposób. Koncentrował się na stworzeniu podstaw chemicznych syntezy kompozytów klasterów boru i antysensownych DNA-oligonukleotydów stanowiących bloki budulcowe nowego typu nanocząstek, nośników terapeutycznych kwasów nukleinowych. Środkiem do osiągnięcia tego celu było opracowanie metod oligofunkcjonalizacji karboranów i metalokarboranów poprzez kontrolowane przyłączanie określonych podstawników do atomów boru i węgla w klasterach boru. Zadania zaplanowane przez Doktoranta objęły oligofunkcjonalizację 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu na atomach boru B₉ i B₁₂ oraz atomach węgla C₁ i C₂, oligofunkcjonalizację metalokarboranu zawierającego kobalt, bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)-*commo*-3,3'-kobaltanu(III) na atomach boru B₈ i B_{8'} oraz atomach węgla C₁, C₂, C_{1'} lub C_{2'}, syntezę cyklicznych estrów tiofosforanowych 8,8'-dihydroksy-[bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)]-*commo*-3,3'-kobaltanu(III), pochodnych metalokarboranu o zahamowanej rotacji, opracowanie metody alkilowania na atomie siarki cyklicznych estrów tiofosforanowych 8,8'-dihydroksy-[bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)]-*commo*-3,3'-kobaltanu(III) liniowymi i rozgałęzionymi odczynnikami alkilującymi, syntezę z wykorzystaniem platform do przyłączania DNA-oligonukleotydów metodą amidofosforinową, opracowanie metody i syntezę pochodnych genisteiny modyfikowanej klasterem boru.

Realizacja tak ambitnego programu badawczego wymagała rozległej wiedzy w dziedzinie chemii ogólnej, chemii medycznej, syntezy chemicznej, stereochemii, a także opanowania nowoczesnych metod eksperymentalnych, w tym preparatywnych. Co więcej, złożoność badanych związków stanowiła poważne wyzwanie w zakresie analizy strukturalnej związków organicznych. Należy podkreślić, iż w każdej z tych dziedzin mgr inż. Krzysztof Śmiałkowski wykazał się rzetelnością i profesjonalizmem. Na szczególne wyróżnienie zasługuje konsekwencja z jaką Doktorant zrealizował przyjęte założenia badawcze, cecha rzadko spotykana na tak wczesnym etapie kariery naukowej.

Wstęp literaturowy, liczący 40 stron, jest wynikiem zainteresowań Autora, a w szerszym kontekście potwierdzeniem przygotowania zawodowego do uczestniczenia w procesie projektowania i otrzymywania nowych połączeń chemicznych, procesie interdyscyplinarnym, wymagającym wiedzy w zakresie nauk chemicznych, fizycznych i biologicznych. Z tego powodu, obok wątków natury chemicznej, jak budowa klasterów boru, przegląd właściwości fizykochemicznych dikarbado-

dekarboranów, w tym lipofilowość, rozkład ładunku, efekty elektronowe czy pKa, wpływ obecnych w cząsteczce podstawników, znajdujemy w tej części również rys historyczny badań nad klastkami boru w kontekście chemii medycznej. Osobiście zabrakło mi tutaj szerszej informacji nt. potencjalnych zastosowań karboranów jako związków bioaktywnych. Z kolei na uznanie zasługuje fakt, że ta obszerna część pracy została napisana w oparciu o szeroko zakrojoną kwerendę artykułów opisujących poruszane zagadnienia. Aż 101 pozycji literaturowych na 109 cytowanych w pracy przywołana została właśnie w tej części, z czego 54 pozycje (53%) obejmują publikacje, które ukazały się po roku 2000. Zdecydowanie dokonany przegląd literatury stanowi doskonały materiał na pracę przeglądową nt. klastek boru.

W rozdziale *Omówienie badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej* opisał Autor etap projektowania i syntezy chemicznej nowych oligofunkcjonalizowanych pochodnych 1,2-dikarba-closo-dodekarboranu, bis(1,2-dikarba-closo-dodekarborano)-*commo*-3,3'-kobaltanu(III), etap otrzymywania nanocząstek drugiej generacji posiadających zdolność równoczesnego wyciszania dwóch onkogenów (EGFR, c-MYC) oraz etap syntezy i wstępnych badań biologicznych analogów genisteiny zawierających w swojej strukturze klastki boru. W *Streszczeniu* Doktorant wskazał eksperymenty, które zostały dla Niego zrealizowane przez współautorów artykułów.

W skład cyklu artykułów, na których osadzona jest praca doktorska, wchodzi dwie publikacje. W publikacji 1 mgr inż. Krzysztof Śmiałkowski pełni rolę pierwszego autora, a w publikacji 2 rolę czwartego autora. Sumaryczny współczynnik oddziaływania dla tego cyklu wynosi IF = 8,1 i 280 pkt. MNiSW. Takie parametry naukometryczne najlepiej świadczą o dobrej jakości ocenianej pracy.

W publikacji 1 autorzy opisali badanie funkcjonalizacji bis(1,2-dikarbolidu) kobaltu przy atomach 8,8'-boru z różnymi heterobifunkcyjnymi grupami posiadającymi chronioną grupę hydroksylową umożliwiającą dalszą modyfikację po deprotekcji. Ponadto, opisali podejście do syntezy trzech i czterech funkcjonalizowanych metalokarboranów, przy atomach boru i węgla jednocześnie poprzez dodatkową funkcjonalizację przy węglu. Dzięki temu uzyskali pochodne posiadające trzy lub cztery racjonalnie zorientowane i odrębne powierzchnie reaktywne.

Przedmiotem publikacji 2 była wszechstronna metoda automatycznej syntezy kompozytów zawierających DNA-oligonukleotydy i rusztowania klastek boru oraz ich montażu w funkcjonalne nanocząstki. Uzyskane nanocząstki przypominające torusy zawierają oligonukleotydy antysensowe, które celują w dwa różne onkogeny jednocześnie. Nanocząstki wykazały znaczną skuteczność

wyciszania *in vitro* w linii komórkowej raka trzustki PANC-1 genów EGFR i cMyc na poziomie mRNA oraz znaczną skuteczność na poziomie białka. Jak autorzy sami zauważyli, proponowane podejście może być atrakcyjną alternatywą dla metod obecnie stosowanych, w tym jednego terapeutycznego kwasu nukleinowego, jednego celu genetycznego lub stosowania koktajli terapeutycznych kwasów nukleinowych. Do tej opinii jeszcze odniosę się w dalszej części recenzji.

Układ prezentacji badań i ich wyników w rozdziale *Omówienie badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej* odbiega od kolejności prezentowanej w cyklu publikacyjnym. Doktorant słusznie podjął się skrupulatnego opisu przeprowadzonych eksperymentów, gdyż opublikowane artykuły nie pokrywają w całości przeprowadzonych prac. Przykładowo, ostatni podrozdział w tej części, *Synteza i wstępne badania biologiczne analogów genisteiny zawierających w swojej strukturze klaster boru*, nie został opublikowany. W związku z tym, wskazane by było wyraźne zaznaczenie w dysertacji, które wyniki wcześniej opublikowano, a których nie. W przypadku pochodnych zawierających klaster boru, które wcześniej nie zostały opisane, oczekiwałabym utworzenia dodatkowego rozdziału o charakterze doświadczalnym z dokładnym opisem preparatyki, pełną charakterystyką i analizą widmową. Tak przygotowane rozprawy doktorskie o charakterze hybrydowym nie są obecnie rzadkością.

W nieco ponad jednostronicowym *Podsumowaniu* Doktorant zamieścił najistotniejsze wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań oraz przedstawił w sposób jasny, które osiągnięcia uważa za najważniejsze. Na pochwałę zasługuje zwięzła forma tego rozdziału, rzadko spotykana u pełnych entuzjazmu młodych naukowców. Autor podkreśla, że w wyniku przeprowadzonych badań opracował szereg użytecznych w praktyce metod oligofunkcjonalizacji zarówno 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu, jak i jego kompleksu z metalem, bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)-*commo*-3,3'-kobaltanu(III), umożliwiających przyłączanie jednego, dwóch, trzech lub czterech podstawników zarówno do atomów boru jak i węgla. Zauważa również, że opracował metody syntezy tripodstawionej pochodnej 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu, wykorzystanej z powodzeniem do otrzymania funkcjonalnych nanocząstek drugiej generacji, kompozytów klasterów boru i terapeutycznych kwasów nukleinowych. Opracował także oryginalną metodę funkcjonalizacji metalokarboranów na drodze alkilowania na atomie siarki cyklicznego tiofosforanu bis(8,8'-dihydroksy-1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)-*commo*-3,3'-kobaltanu(III). Metoda ta pozwala na łatwe przyłączanie do metalokarboranu szerokiej gamy podstawników. Wymienia także metodę syntezy tripodstawionej pochodnej metalokarboranu, 8-(5-

hydroksy-3-oksa-pentoksy)-[1,1'-di(2-O-trytyloksyetylo)-bis(1,2-dikarbolido)-3,3'kobaltanu](III), wykorzystanego do otrzymania funkcjonalnych nanocząstek trzeciej generacji, kompozytów klasterów boru i terapeutycznych kwasów nukleinowych. Bez wątplenia ważnym osiągnięciem pracy jest także wykorzystanie $^{11}\text{B-NMR}$ i $^1\text{H-NMR}$ do analizy wpływu wprowadzania podstawników w strukturę karboranu lub metalokarboranu na zmianę właściwości cząsteczki związanej ze zmieniającym się rozkładem gęstości elektronowych oraz stereochemią otrzymanych pochodnych, a także wspomniana już wyżej synteza pierwszych analogów genisteiny modyfikowanych klasterem boru. W tym miejscu nasuwa się pytanie, czy w eksperymencie oceniającym siłę działania cytotoksycznego analogów genisteiny, nie należało zastosować kontroli w postaci jakiegoś cytostatyku będącego, podobnie jak genisteina, inhibitorem topoizomerazy II, np. etopozydu. Należy również zachować pewien dystans do stwierdzenia wskazującego wykorzystanie nanocząstek drugiej generacji, kompozytów klasterów boru i terapeutycznych kwasów nukleionowych zdolnych do wyciszania dwóch różnych genów. Jeżeli jakiś pojedynczy czynnik ma zdolność wyciszania dwóch genów, należy brać pod uwagę, że celów molekularnych dla takiego czynnika może być więcej. Mogą to być cele, których inhibicja nie jest pożądana lub wręcz jest niebezpieczna. Zalecałabym znaczną ostrożność w formułowaniu wniosków, zwłaszcza dotyczących potencjalnej aktywności biologicznej, choć kierunek badań z pewnością jest bardzo obiecujący. Świadczy o tym fakt, że prowadzone badania finansowane były z grantu NCN Symfonia 3, 015/16/W/ST5/00413 *Oligopodalne kompozyty kwasów nukleinowych i klasterów boru - nowy materiał dla bionanotechnologii*.

Autorowi pracy nie udało się uniknąć błędów literowych i interpunkcyjnych, co w tak obszernym opracowaniu jest właściwie niemożliwe. Jednakże wspomniane niedociągnięcia w żaden sposób nie wpływają na mój odbiór pracy doktorskiej, dlatego nawet ich nie wymieniam. Zwłaszcza, że nie dostrzegłam błędów rzeczowych, które mogłyby wprowadzać czytelnika w błąd.

Podczas obrony pracy chciałabym, aby mgr inż. Krzysztof Śmiałkowski przedyskutował dwa zagadnienia:

1. Proszę o przedstawienie pełnej charakterystyki dla dowolnego analogu genisteiny zawierającego klaster boru, który nie został opublikowany, a reakcja jego syntezy znalazła się w rozdziale *Omówienie badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej*.
2. W jakim kierunku powinien podążać dalszy rozwój podjętego w pracy tematu, zarówno pod kątem syntezy chemicznej, jak i badań biologicznych?

W podsumowaniu swojej recenzji chciałabym podkreślić, że Doktorant w pełni zrealizował postawione przed sobą ambitne zadania badawcze w dziedzinie oligofunkcjonalizacji klasterów boru jako bloków budulcowych dla nowych materiałów i związków bioaktywnych. Wykazał przy tym szeroki wachlarz umiejętności praktycznych i w sposób właściwy wykorzystał rozległą wiedzę teoretyczną. Z uznaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest osiągnięciem oryginalnym i spełnia kryteria merytoryczne i formalne stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr. inż. Krzysztofa Śmiałkowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne, w specjalizacji chemia medyczna.

Katedra i Zakład
Chemii Organicznej

prof. dr hab. Katarzyna Gobis

prof. dr hab. Katarzyna Gobis