



dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

Wrocław, 21.06.2020 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi Pióreckiej

pł. „Otrzymywanie i badania kompleksów i koniugatów silseskwioksanów z antracyklinami”

Powierzona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Pióreckiej została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr. hab. Włodzimierza A. Stańczyka w Dziale Polimerów Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Tytuł dysertacji jest ciekawy i sugerujący interdyscyplinarny charakter pracy, która doskonale wpisuje się w zagadnienia naukowe z sukcesem podejmowane od lat przez Promotora w obszarze funkcjonalnych związków krzemu.

Choroby nowotworowe są obecnie poważnym problemem całego świata i dotyczą, w mniejszym lub większym stopniu, każdego z nas. Najnowsze badania przewidują, że za pięć lat w Polsce liczba chorych wyniesie 170 tys., a liczba zgonów osiągnie aż 105 tys. przypadków.¹ Warto w tym miejscu podkreślić, że w Polsce na nowotwory zapada mniej osób niż w innych krajach Europy Zachodniej, ale z drugiej strony statystyczny pacjent onkologiczny w naszym kraju ma zdecydowanie mniejsze szanse na przeżycie. Dlatego leczenie chorób nowotworowych i ich diagnozowanie należą do priorytetowych wyzwań współczesnej medycyny. Mimo że nowoczesne metody leczenia powinny być w zasięgu każdego chorego, są jednak nadal trudno dostępne, głównie ze względu na koszty. Obecne strategie walki z rakiem są ściśle uzależnione od rodzaju zmian nowotworowych i ich umiejscowienia w organizmie. Jedną z grup leków przeciwnowotworowych są antracykliny, które należą do substancji przeciwnowotworowych najczęściej stosowanych w terapiach raka piersi, pęcherza moczowego, mięsaka Kaposiego i ostrej białaczki. Niestety, nie są to terapie celowane, a działanie leków nie jest selektywne, stąd zwiększenie dawki terapeutycznej jest toksyczne i powoduje szereg skutków ubocznych, m.in. tysienie, anomalia procesu produkcji krwinek, zaburzenia w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego oraz wykazują tzw. kardiotoxyczność, która może prowadzić do niewydolności układu krążenia. Stąd najnowsze terapie bazują na kontrolowanym uwolnieniu ściśle określonej dawki leku w miejscu chorobowo zmienionym, co umożliwia zwiększenie dawki leku i zniwelowanie działań ubocznych. W zagadnienia te wkomponowują się ambitne poszukiwania Pani mgr Kingi

1/6

¹ J. Didkowski, U. Wojciechowska, W. Zatoński, *Prediction of cancer incidence in Poland up to the year 2025*, ISSN 0867-8251, 2015, Warsaw, Poland.

Ł. John



WYDZIAŁ CHEMII

dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

Pióreckiej, której celem była eksploracja połączeń klatkowych silseskwioksanów POSS (o strukturze typu T_8), pełniących rolę nośnika leków przeciwnowotworowych z grupy antybiotyków antracyklinowych, tj. doksorubicyny (DOX) i daunorubicyny (DAU). W tym aspekcie dobór nośnika stanowi element nowości naukowej, a samą hipotezę badawczą uważam za interesującą.

Na dokumentację przedstawioną do recenzji składają się: 20 stronicowy autoreferat, spis dorobku naukowego Kandydatki oraz publikacje i oświadczenia współautorów. Do oceny osiągnięcia zostały włączone trzy prace oryginalne opublikowane w takich czasopismach jak: *New Journal of Chemistry* (IF = 3,069), *Tetrahedron Letters* (IF = 2,259) i *RSC Advances* (IF = 3,049) oraz jedna praca o charakterze przeglądu ogłoszona w bardzo dobrym czasopiśmie *Biomaterials Science* (IF = 5,251). Sam fakt przyjęcia do druku, po wymagającym procesie recenzji, wymienionych prac świadczy o ich wysokim poziomie merytorycznym oraz że wpisują się w aktualne trendy poszukiwań naukowych w tym obszarze badań.

W artykule opublikowanym w *New Journal of Chemistry* (2016, 40, 5997-6000), opisano syntezę pierwszych przykładów koniugatów wielościennej POSS z wybranymi antracyklinami (DOX i DAU), w których grupą łączącą hybrydę organiczno-nieorganiczną jest wiązanie amidowe. W badaniach jako nanonośników użyto dwie pochodne klatkowych silseskwioksanów, mianowicie komercyjnie dostępny chlorowodorek oktakis(3-aminopropyl)oktasilseskwioksanu ($T_8[(CH_2)_3NH_2 \cdot HCl]_8$) oraz pochodną karboksylową o wzorze $T_8[(CH_2)_2S(CH_2)_{10}COOH]_8$, którą otrzymano w reakcji hydrosulfidowania (z ang. *thiol-ene*) klatki oktawinyłowej POSS za pomocą kwasu 11-merkaptoundekanowego. W następnym etapie, chlorowodorek POSS użyto w reakcji otwarcia pierścienia bezwodnika kwasu bursztynowego w celu zmodyfikowania cząsteczki doksorubicyny (SAMDAU) czego rezultatem były nanokoniugaty o ogólnym wzorze (SAMDAU)- $T_8[(CH_2)_3NH_2]_{8-x}$ (gdzie $x = 2-4$), które otrzymano z wydajnością 40%. Z kolei, pochodna karboksylowa POSS została połączona z chlorowodorkiem DOX w obecności mieszaniny trietyloaminy, NHS i EDC prowadząc do produktów typu $(DOX)_xT_8[(CH_2)_2S(CH_2)_{10}COOH]_{8-x}$ ($x = 1, 2$) z wydajnością 70%. Za ciekawostkę w tych badaniach uważam obserwację różnego podstawienia pochodnych antracyklinowych do rdzenia POSS. W przypadku SAMDAU od 2 do 4 cząsteczek antybiotyku w stosunku 1 : 2,6 : 1 przyłącza się do klatki silseskwioksanowej. Natomiast, dla DOX obserwuje się substytucję 1 lub 2 cząsteczek doksorubicyny do wielościennej oligosilseskwioksanu w stosunku 3 : 1. Nie jest to jednak nowość, gdyż zjawisko to zaobserwowano badając reakcje ferocenowej pochodnej kwasu karboksylowego do chlorowodoru oktakis(3-

t. John



dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

aminopropyl)oktasilsekwioksanu.² W podsumowaniu, za najważniejsze osiągnięcie tej pracy uważam opracowanie dwóch alternatywnych strategii syntezy nanokoniugatów na bazie sfunkcjonalizowanych POSS i dwóch pochodnych antracyklin (DOX i DAU) zakotwiczonych do nośnika za pomocą amidowego łącznika.

W drugiej pracy oryginalnej, opublikowanej na łamach *Tetrahedron Letters* (**2017**, 58, 152-155), Autorka wzięta za cel analizę spektroskopową, stosując magnetyczny rezonans jądrowy (NMR), dwóch badanych przez siebie antracyklin (DOX i DAU) i ich zmodyfikowanych pochodnych – SAMDOX i SAMDAU wiążących się do nośnika za pomocą łącznika karboksylowego oraz UAMDOX i HAMDOX posiadających łączniki alkenylowe. W mojej opinii badania te są o tyle istotne, że grupa antybiotyków antracyklinowych wykazuje zdolność do oddziaływania z helisą DNA tworząc stabilne termodynamicznie kompleksy, przez co hamują proliferację komórek nowotworowych, a w konsekwencji prowadzą do ich apoptozy. Stąd poznanie ich struktury w roztworze jest niezwykle istotne. Podczas studiowania tego artykułu, można zauważyć, że Autorzy podjęli się wprowadzenia poprawek do błędnie do tej pory przypisanych w literaturze³ przesunięć chemicznych dla protonów chlorowodorkowych pochodnych dokso- i daunorubicyny. Analiza ta jest również ważna ze względu na fakt, że umożliwia śledzenie postępu funkcjonalizacji tej grupy związków, ale również czystości produktów końcowych, w momencie kiedy ilościowa analiza z zastosowaniem spektrometrii mas nie jest możliwa.

3/6

Celem badań opisanych w trzecim artykule oryginalnym, opublikowanym w *RSC Advances* (**2020**, 10, 15579-15585), było zbadanie natury oddziaływań pomiędzy chlorowodorkiem oktakis(3-aminopropyl)oktasilsekwioksanu z chlorowodorkiem doksorubicyny za pomocą takich metod jak NMR, FT-IR, spektroskopia fluorescencyjna, spektrometria mas Q-TOF i analiza potencjału elektrokinetycznego (z ang. *Z-potencjal*), prowadzące do wyjaśnienia zwiększonej aktywności doksorubicyny po zakotwczeniu jej na nanonośniku POSS. Za najciekawsze odkrycie opisane w tej pracy uważam tworzenie tzw. aktywnych kompleksów przez jonowe oddziaływanie fragmentów $-NH_2 \cdot HCl$ obecnych w cząsteczkach nanonośnika POSS, jak i DOX, co pozostaje w kontrze do wcześniej promowanej w literaturze hipotezy, że oddziaływanie to odbywa się poprzez wiązanie wodorowe $NH \cdots N$.⁴ Ponadto, wykazano, że siłą napędową tworzenia kompleksów mogą być m.in. oddziaływania typu $\pi-\pi$ (z ang. *$\pi-\pi$ stacking*). Badania empiryczne zostały również uzupełnione obliczeniami DFT. Analiza wyników opisanych w pracy pozwala stwierdzić,

² K. Tanaka, N. Kitamura, Y. Takahashi, Y. Chujo, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 3818.

³ P. Yousefpour, F. Atiyabi, E. Vasheghani-Farahani, A-A. M. Movahedi, R. Dinarvand, *Int. J. Nanomed.* **2011**, 6, 1977.

⁴ S. Ohta, K. Yamura, S. Inasawa, Y. Yamaguchi, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 6422.



dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

że dostarczanie cząsteczek leków wraz z nośnikiem, które oddziałują niekowalencyjne ze sobą, wykazuje potencjalne zalety w kierunku poprawy skuteczności chemioterapii, unikając wymagającej syntezy koniugatów, w których występuje wiązanie kowalencyjne pomiędzy cząsteczką leku i nanonośnikiem. Wydaje się jednak, że aby w pełni potwierdzić tę odważną tezę potrzebne są dalsze badania biologiczne i kliniczne.

Ostatnia praca dołączona do dysertacji Pani mgr Kingi Pióreckiej, opublikowana w znakomitym czasopiśmie *Biomaterials Science* (**2018**, 6, 2552-2565), ma charakter przeglądowy i jest ważnym uzupełnieniem do, przedstawionych w pracach oryginalnych, wyników badań własnych Doktorantki dotyczących niekowalencyjnych połączeń (pro)lek/nośnik. W przeglądzie tym skoncentrowano się na ostatnich osiągnięciach w kontekście strategii syntetycznych prowadzących do nowych nanomateriałów typu antracykliny/nanonośnik. Co interesujące, mimo że znane są komercyjnie dostępne czynniki chemoterapeutyczne zawierające doksorubicynę, takie jak Doxil, Myocet, Lipo-Dox i ThermoDox, to jednak liczba doniesień literaturowych, zwłaszcza w aspekcie preparatyki, jest na ten temat nadal niewielka. Stąd powstanie tej pracy ma silne uzasadnienie. W artykule opisano wiele rodzajów nanocząstek z przeznaczeniem do enkapsulacji antracyklin. Do najczęściej opisywanych w literaturze zalicza się polimerowe układy koloidalne, lipidowe nanocząstki, nanostruktury DNA, cząstki nieorganiczne na bazie krzemionki, kropek kwantowych, nanocząstek złota, Fe_3O_4 , i hydroksapatytu, ale również materiały z przeznaczeniem do terapii chemo- i fototermicznych. Do zalet tych układów zalicza się nanometryczne rozmiary (często poniżej 20 nm) i rozwiniętą powierzchnię właściwą w stosunku do ilości/stężenia nanonośnika. Stosowanie tego typu nanomateriałów ułatwia penetrację nowotworowych przestrzeni międzykomórkowych, które wykazują inną strukturę niż w przypadku komórek zdrowych, dzięki czemu rozmieszczenie czynników chemoterapeutycznych w miejscach docelowych jest efektywniejsze.

Na zakończenie tej części, bardzo proszę o ustosunkowanie się Kandydatki do następujących pytań, uwag i komentarzy:

- (I) W publikacji *New Journal of Chemistry* **2016**, 40, 5997-6000 zamiennie stosowane są dwa pojęcia w odniesieniu do tych samych układów, mianowicie koniugat i kompozyt. Czy jest to poprawne? Bardzo proszę o komentarz Doktorantki. Ponadto, z jakimi trudnościami syntetycznymi spotkała się Kandydatka podczas syntezy koniugatów (SAMDAU)- $\text{T}_8[(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]_{8-x}$ (gdzie $x = 2-4$), dla których wydajności, w odróżnieniu od połączeń z doksorubicyną (wydajność 70%), wyniosły zaledwie 40%. Jakie zastosowano ścieżki optymalizacji syntezy tych produktów?

t. John



dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

- (II) Na str. 20 autoreferatu jest napisane, że „...dzięki możliwości funkcjonalizacji i obecności ośmiu naroży [w POSS] pozwala na potencjalne przyłączenie jednocześnie różnych leków”. Czy zna Pani literaturowe przykłady tego typu połączeń? Jeśli tak, to proszę o komentarz.
- (III) W literaturze znane są kompleksy i koniugaty pochodnych antracyklin osadzonych na innych (nano)nośnikach niż Pani badała. Proszę o komentarz dot. zalet otrzymanych przez Panią układów nad tymi znanymi z literatury naukowej.
- (IV) Jakie należy wykonać w dalszej perspektywie badania, aby udowodnić podane przez Panią stwierdzenie, że „Uogólniając rezultaty (...) [przeprowadzonych] badań można oczekiwać, że POSSy z różnymi grupami funkcyjnymi będą skutecznymi nośnikami dla szerokiej gamy leków przeciwnowotworowych”?
- (V) Autorka w referacie używa miejscami niefortunnych lub niezręcznych sformułowań, np. „...stos pierścieni antracyklinowych...” (str. 19). Ponadto, sam referat jest dość lapidarnym wprowadzeniem do publikacji. Miejscami do tego stopnia, że trudno zorientować się z treści co Autorka ma na myśli, gdyż występują dość swobodne „skoki myślowe” pomiędzy co najmniej dwoma wątkami. Na szczęście rekompensatą staje się lektura dołączonych prac, które są podstawą oceny osiągnięcia.

Na zakończenie, pragnę stwierdzić, że analiza oświadczeń współautorów jednoznacznie pozwala wnioskować, że Pani mgr Kinga Piórecka miała wiodący wkład w prace eksperymentalne i przygotowywanie manuskryptów. W jednej z prac (RSC Adv. **2020**, 10, 15579) występuje nawet w roli autora korespondencyjnego, co nie jest powszechne na tym etapie kariery naukowej.

Na pozostały dorobek naukowy doktorantki składają się dodatkowo 4 artykuły opublikowane w takich czasopismach jak *Materials* (2 prace; IF = 2,972), *Polimery* (IF = 1,121) i *Bioorganic Chemistry* (IF = 3,926). Co ciekawe, publikacje te są ściśle związane z tematem rozprawy Pani mgr Kingi Pióreckiej, ale nie zostały włączone do monotematycznego cyklu. Wyniki swoich badań prezentowała na 21 konferencjach (8 prezentacji ustnych i 13 plakatowych). Za wyróżniającą aktywność uważam kierowanie grantem PRELUDIUM Narodowego Centrum Nauki pt. „Inteligentne oligosilsekwioxanowe nanokoniugaty leków przeciwnowotworowych o właściwościach kierujących” (nr rej. 2016/21/N/ST5/03360). Doktorantka była również wykonawcą w grantie prof. W. A. Stańczyka (NCN OPUS 2012/07/B/ST5/02603).

Reasumując, po uważnej analizie przesłanej dokumentacji jestem przekonany, że Pani mgr Kinga Piórecka jest już ukształtowanym młodym naukowcem, podejmującym ciekawe

t. John



WYDZIAŁ CHEMII

dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

kierunki badań i posiadającym wszelkie predyspozycje pozwalające na analizę wyników i wyciąganie trafnych wniosków naukowych.

W podsumowaniu, bez żadnych wątpliwości stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Pióreckiej spełnia wszystkie wymogi i warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” oraz w §5 ust. 1 „Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora” (Dz. U. z 2018 r. poz. 261) oraz na podstawie art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669) stawiane pracom składanym przez osoby ubiegające się o stopień naukowy doktora nauk chemicznych i z przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny badań, ilość i jakość prac składających się na monotematyczny cykl dysertacji oraz pozostałą działalność naukowo-organizacyjną Kandydatki do stopnia doktora nauk chemicznych, zwracam się z prośbą do odpowiedniej Rady Dyscypliny Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi o rozważenie wyróżnienia opiniowanej rozprawy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku

Łukasz John