

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Macieja Cieślaka

**pt. Synteza i właściwości peptydowych dendronów i ich dimerów o strukturze „bola”
wykonanej w Instytucie Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Lipkowskiej**

Tematyka przedstawionej mi do recenzji dysertacji dotyczy syntezy chemicznej i badania właściwości kompleksujących, antyoksydacyjnych i przeciwnowotworowych peptydowych dendronów i ich dimerów o strukturze „bola”. Dendrony i dendrymery to organiczne związki chemiczne o regularnej rozgałęzionej budowie zbudowane z przyłączanych sekwencyjnie merów wielofunkcyjnych. Wysoce regularna budowa tych cząsteczek przypomina wzory występujące w przyrodzie. Piękno tych wzorów ciągle zadziwia człowieka i zapewne stało się inspiracją dla naukowców chcących zbudować podobne struktury na poziomie atomowym. Multimeryczna natura tych konstrukcji, jednoznaczny skład i łatwość syntezy sprawiają, że ten typ dendrymerów dobrze nadaje się do różnych zastosowań biotechnologicznych i biochemicznych. Zastosowania obejmują wykorzystanie jako biomedyczne odczynniki diagnostyczne, mimetyki białek, środki przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe, szczepionki oraz nośniki leków i genów. Dodatkowo rodzaj cząsteczek dekorującej dendrymer może definiować ich właściwości chemiczne oraz ich zastosowanie. Peptydowe dendrymery mogą mieć oprócz funkcji strukturalnych dodatkową aktywność biologiczną. Związane jest to z faktem, iż peptydy to cząsteczki biologicznie czynne. Dendrymery otrzymuje się począwszy od stopniowej syntezy w roztworze lub w fazie stałej do chemoselektywnej i ortogonalnej ligacji. Ich synteza oraz oczyszczanie często nie jest łatwe. Peptydowe dendrymery stanowią ciekawe, pod względem strukturalnym jak i biologicznym, źródło nowych cząsteczek chemicznych a ich budowa i zastosowanie ograniczona może być jedynie granicami wyobraźni naukowca. W nurt poszukiwań nowych struktur dendrymerów peptydowych a także opracowanie sposobu ich syntezy jak i poszukiwań ich zastosowań wpisuje się praca doktorska mgr Macieja Cieślaka.

Rozprawa doktorska mgr Macieja Cieślaka została wykonana pod opieką prof. dr hab. Zofii Lipkowskiej w Instytucie Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (choć nazwisko pani Promotor w publikacjach brzmi Zofia Urbańczyk-Lipkowska). Praca doktorska była realizowana w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki OPUS 10 i posiada układ typowy dla prac eksperymentalnych z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych. Całość rozprawy obejmuje 143 strony maszynopisu i podzielona jest na 6 głównych rozdziałów (tj. wstęp literaturowy, hipoteza naukowa, cel i zakres pracy, badania własne, badania fizykochemiczne i biologiczne, podsumowanie i wnioski, część eksperymentalna oraz literatura). Rozdziały te poprzedza wykaz skrótów i oznaczeń stosowanych w pracy oraz wykaz dorobku naukowego Doktoranta. W rozprawie umieszczono kilkanaście schematów reakcji, wykresów, rysunków i zdjęć które ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Szczególną uwagę zwracają podziękowania, skierowane do pani Promotor, współpracowników, narzeczonej, rodziców i przyjaciół. Ich treść wskazuje, że Doktorant potrafi współpracować w zespole. W przeglądzie literaturowym dysertacji znalazłam jedynie drobne błędy językowe i edycyjne. Niestety od rozdziału w którym Doktorant opisuje cel i zakres pracy dysertację czyta się bardzo ciężko ze względu na zawity i często niezrozumiały język polski, liczne uproszczenia myślowe oraz uchybienia edycyjne, które wymienię w dalszej części mojej recenzji.

Na początku lektury dysertacji Doktorant wprowadził czytelnika w kontekst który jest wymagany do pełnego zrozumienia przeprowadzonych w pracy doktorskiej doświadczeń i uzyskanych wyników. W rozdziale pierwszym zatytułowanym „Przegląd literaturowy” Doktorant dokonał kompensacji informacji na temat dendrymerów, sposobów ich syntezy ze szczególnym uwzględnieniem syntezy ich odmian peptydowych oraz ich zastosowania. Wyjaśnił i opisał dendrymery typu „bola”, które mogą stanowić rodzaj amfifilowych nanonośników leków. W dwóch ostatnich podrozdziałach Kandydat bardzo ogólnie opisał zastosowanie dendronów i dendrymerów w leczeniu chorób układu nerwowego jako nośniki leków lub jako związki o działaniu antyoksydacyjnym. Przegląd literaturowy dysertacji przeczytałam z dużym zainteresowaniem.

Następny rozdział to opis hipotezy naukowej, celu pracy oraz zakres pracy. Rozdział ten napisany jest w sposób mało zrozumiały i zawity. Rozdział ten musiałam przeczytać parę razy żeby dowiedzieć się co Doktorant planuje wykonać w ramach swojej pracy doktorskiej. Generalnie Doktorant zaprezentował pięć celi szczegółowych swojej pracy, którymi było **(i) zaprojektowanie i opracowanie sposobu syntezy peptydowych dendronów i dendrymerów o strukturze „bola”, (ii) określenie właściwości antyoksydacyjnych i przeciwrodnikowych wybranych związków dimerycznych i dendrymerów typu „bola”, (iii) zbadanie procesu wiązania wybranych leków przeciwnowotworowych z dendrymerami typu „bola”, (iv) sprawdzenie wpływu dendronu na proces defibrylizacji oraz (iv) określenie wpływu wybranych związków na zdrowe i nowotworowe komórki nerwowe.**

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Prezentacja wyników” pan Maciej Cieślak przedstawił rezultaty swojej pracy syntetycznej. Wyniki podzielił na dwa główne podrozdziały. Pierwszy opisywał syntezę dimerów zawierających pochodne kwasu cyjankowego i lizyny. Związki te zostały tak zaplanowane żeby miały działanie antyoksydacyjne. Ich aktywność antyoksydacyjna została opisana w tej części rozprawy, choć w mojej opinii powinny znaleźć się w części pracy poświęconej badaniom fizykochemicznym. Uzyskane związki wykazywały aktywność antyoksydacyjną ale nie zostały przebadane w układach biologicznych. Kolejne zaprojektowane i zsyntezowane przez Doktoranta związki to dendrony lizynowe zsyntezowane na nośniku stałym. Okazało się, że uzyskane produkty były słabo rozpuszczalne dlatego w kolejnym etapie zsyntezował dendrony lizynowe i ornitynowe metodą estrów aktywnych w roztworze w celu otrzymania większej ilości związków. Dendrony te na samym końcu były dekorowane resztą proliny lub histydyny. Aminokwasy te zostały wybrane jako związki o właściwościach antyoksydacyjnych. Proszę o wyjaśnienie jaki jest mechanizm działania tych aminokwasów w tym aspekcie. Nie znalazłam wyjaśnienia dlaczego dendrymery były dekorowane metyloimidazolem? Po udanej syntezie dendronów Doktorant przystąpił do syntezy w roztworze dendrymerów typu „bola” według różnych strategii a różnymi łącznikami. Okazało się że druga strategia (ostatni etap to funkcjonalizacja dendrymeru „bola”) daje lepsze wydajności. Ta część pracy stanowi w mojej opinii największe osiągnięcie naukowe recenzowanej pracy doktorskiej. Pokazuje umiejętności Doktoranta w zakresie planowania i przeprowadzenia syntezy rozbudowanych nanostruktur w roztworze i na nośniku stałym. Doktorant dokonał optymalizacji procesu w celu otrzymania związków do dalszych badań. Z pewnością realizując tą część badań korzystał z wieloletnich doświadczeń zespołu pani prof. Zofii Lipkowskiej w zakresie syntezy dendrymerów.

Wyniki badań antyoksydacyjnych, kompleksotwórczych z wybranymi lekami, badania defibrylizacji oraz badań biologicznych zostały umieszczone w kolejnym rozdziale zatytułowanym „Badania fizykochemiczne i biologiczne”. Pierwszy podrozdział dotyczył badań konformacyjnych dendrymerów o strukturze „bola” metodą dichroizmu kołowego. Ta część rozprawy jest dla mnie zupełnie niezrozumiała i proszę Doktoranta o przedstawienie tych wyników podczas publicznej obrony w sposób bardziej zrozumiały. Co na przykład oznacza, że „widma dichroizmu kołowego dla sfunkcjonalizowanych proliną 55a i 57a lub sfunkcjonalizowanych histydyną 56a i 58a dendrymerów „bola” wykazują wzorce charakterystyczne również dla odpowiednich dendronów: sfunkcjonalizowanych proliną 43 lub sfunkcjonalizowanych histydyną 44” lub że „żaden z dendrymerów „bola”, z wyjątkiem sfunkcjonalizowanego proliną dendrymeru 57a, nie wykazuje śladów CD charakterystycznych dla większości liniowych AMP, gdzie konformacja α -helisy umożliwia sortowanie centrów kationowych i hydrofobowych”. Proszę o wyjaśnienie dlaczego widma tych struktur są porównywane z widmami CD peptydów przeciwbakteryjnych AMP? Zaprezentowane widma CD są bardzo złej jakości. Widać że jest to zrzut ekranu z publikacji a nie oryginalne widma CD. Kolejny podrozdział dotyczy badań antyoksydacyjnych i antyrodnikowych wybranych dendrymerów typu „bola”. Ponieważ w części eksperymentalnej brak jest opisu metodyki i wyjaśnienia czego dotyczy skala TEAC oraz brak kontroli/odniesienia to trudno mi było ocenić dużą skuteczność działania

antyoksydacyjnego lub antyrodnikowego badanych związków. Ufając jednak, że uzyskane wyniki dla dendrymerów udekorowanych His i Pro są bardzo dobre (o czym świadczy fakt umieszczenia tych wyników w zgłoszeniu patentowym) to czy pod względem ekonomicznym opłacałoby się syntezować takie związki w zastosowaniu medycznym? Dlaczego nie zostały wykonane badania antyoksydacyjne dla związku 14 z rozdziału 3.4 oraz dla dendrymeru funkcjonalizowanego metyloimidazolem? W mojej opinii związek 14 mógłby wykazywać najciekawsze parametry? Kolejny podrozdział dotyczy badań własności kompleksujących dendrymerów „bola” z lekami onkologicznymi. Przedstawionych zostało kilka chromatogramów HPLC (kiepskiej jakości zrzuty ekranu bez wyjaśnienia co oznaczają kolory) na których Doktorant pokazał, że neutralny dendrymer 55a tworzył kompleksy z cząsteczkami wszystkich leków, bez względu na ich budowę chemiczną i możliwość tworzenia oddziaływań międzycząsteczkowych. Jakiego typu to są oddziaływania? Natomiast kationowy dendrymer 58a tworzył wyraźny kompleks głównie z chlorambucilem posiadającym grupę karboksylową. Czy na podstawie intensywności absorpcji można określić w jakich proporcjach utworzyły się kompleksy? Do badań przygotowane zostały układy 1:20 ale wydaje się że jedynie część leku utworzyła kompleks. W wynikach tej części rozprawy brakuje w mojej opinii analizy ilościowej. Kompleksy dendrymer-lek miały być zbadane pod względem biologicznym ale z uwagi na śmierć współpracownika badania te nie zostały wykonane. Doktorant opisał skrótowo uzyskane wyniki wstępne bez prezentacji konkretnych danych eksperymentalnych. Kolejny podrozdział dotyczył badania wpływu jednego związku 14 (choć w tytule jest liczba mnoga związków) na strukturę polilizyny i kwasu poliglutaminowego, które zostały zastosowane jako modelowe peptydy imitujące fibryle amyloidowe. Ta część pracy posiada jedynie opis widm CD bez ich prezentacji, i które należało sobie wyobrazić lub znaleźć w publikacji Doktoranta. Opis jest mało zrozumiały, ale konkluzje obiecujące, że związek 14 może służyć do zapobiegania tworzenia się nierozpuszczalnych agregatów peptydów polilizyny i kwasu poliglutaminowego. Doktorant konkluduje, że potrzebne byłyby dalsze i szczegółowe badania w tym zakresie. Jakież? Ostatnia część tego rozdziału dotyczyła badań biologicznych na komórkach glejaka i zdrowych komórkach nerwowych. Uzyskane wyniki są bardzo obiecujące, gdyż pokazują iż niektóre z testowanych dendrymerów typu „bola” mają potencjał przeciwnowotworowy. Zastanawia mnie tylko dlaczego uzyskane wyniki badań komórkowych nie zostały skorelowane z aktywnością antyoksydacyjną i antyrodnikową badanych związków. Warto podkreślić że wszystkie uzyskane wyniki badań biologicznych zostały poddane rygorystycznej analizie statystycznej. Ta część pracy zwiera również przepiękne zdjęcia komórek spod mikroskopu fluorescencyjnego obrazujące zmiany ich morfologii pod wpływem badanych związków.

Następny rozdział dysertacji doktorskiej pana Macieja Cieślaka, to „Podsumowanie i wnioski” w którym Doktorant krótko podsumował najważniejsze wyniki swoich badań kreśląc również perspektywę ich dalszych badań.

Ostatni rozdział, zatytułowany „Część eksperymentalna” jest zbiorem protokołów syntetycznych, listą użytych odczynników i zastosowanej aparatury oraz zestawem podstawowych informacji (wydajność, NMR, MS, temperatura topnienia itp.) potwierdzających uzyskane produkty. Wszystkie czynności, związane z procedurami syntetycznymi zostały przez Doktoranta bardzo dokładnie opisane. Nie znalazłam natomiast w tej części pracy opisu dotyczącego sposobu wykonywania badań CD, eksperymentów antyoksydacyjnych oraz badań komórkowych. Zdaję sobie sprawę, że tych doświadczeń nie wykonywał Doktorant, co wyjaśnił, ale informacje te powinny znaleźć się w rozprawie. Uważam, że tabele z danymi na temat aktywności antyoksydacyjnej są niepotrzebne, gdyż znajdują się w treści rozprawy w postaci wykresów słupkowych. W tej części pracy znajdują się również słabej jakości chromatogramy i to nie dla wszystkich otrzymanych związków.

Pracę zamyka spis literatury cytowanej w liczbie 127. W tej części dysertacji Doktorant nie uniknął błędów edytorskich, takich jak chociażby w inny sposób podawane tytuły czasopism (nazwa skrótowa lub pełna lub pisana wielkimi literami), w bardzo różny sposób podawana jest kolejność nazwisk i imion (czasami z kropkami i przecinkami a czasami bez, czasami tylko pierwszy autor), istnieją różne systemy odniesień do numerów artykułów, dat i stron oraz krótkie lub długie myślniki. Tak wiele błędów edycyjnych w tym rozdziale dowodzi, że Doktorant nie korzystał z dostępnych powszechnie specjalistycznych programów do automatycznego formatowania bibliografii.

Część opisanych eksperymentów, ich analiza i płynące z badań wnioski zostały już wcześniej poddane ocenie recenzentów w dwóch czasopismach w których zostały opublikowane. Stąd moja rola jako recenzenta jest znacznie ułatwiona. Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została poprawnie zaplanowana a prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone poprawnie z drobnymi uwagami opisanymi powyżej. Poniżej, z obowiązku recenzenta, wymieniam pytania oraz uwagi dotyczące dysertacji:

Uwagi merytoryczne i językowe:

1. Określenie „obsadzenie” jest niepoprawne, tradycyjnie w przypadku syntez na nośnikach stałych używa się określenia „stopień osadzenia”
2. Co wg Doktoranta oznacza pojęcie „biodegradowalne wiązanie estrowe”? Czy wykonane były badania w tym kierunku?
3. Brak jest pełnych wyjaśnień pod rysunkami z wynikami badań biologicznych na liniach komórkowych. Co oznaczają zastosowane skróty? Brak jest odniesień do części A, B, itd. W trakcie lektury opisu wyników trudno się zorientować.
4. W jaki sposób wyznaczona została zależność ładunku od bioaktywności? (Rys. 57)

5. Co Doktorant rozumie pod pojęciem badania dendronów ze strukturami drugorzędowymi co napisane jest w kilku miejscach w dysertacji? „Struktura drugorzędowa białka” to pojęcie ogólne.
6. Czy polilizyna lub kwas poliglutaminowy są dobrymi modelami struktur fibrylarnych powstających w chorobie Alzheimerera czy Parkinsona? Czy można było zastosować inne peptydy modelowe? Jakież?
7. Jaki jest wzór kwasu hydrokwawowego?
8. Brak jest informacji w części wynikowej na temat syntezy związku nr 14 dla którego przedstawione są wyniki badań w rozdziale 3.4. Związek numer 14, zgodnie z oznaczeniami w rozdziale 1.2 to zupełnie inny związek.
9. Dlaczego "β-skręt" napisany jest w cudzysłowie? Co oznacza zdanie względny udział innych struktur drugorzędowych w zdaniu: „α-helisy, β-kartki, "β-skrętu" i "innych" struktur drugorzędowych”? Jakież to są inne struktury drugorzędowe? Co oznacza pojęcie „rozplątywanie struktury β-kartki”?

Uwagi edycyjne:

1. Stawianie kropek przed lub po odnośniku literaturowym
2. Bardzo słaba jakość chromatogramów, brak skali, brak informacji co oznaczają kolory, bardzo małe litery trudne do odczytania, ucięte rysunki które zostały zrobione jako zrzuty ekranu z komputera a nie przetworzone przez program graficzny
3. Angielskie opisy na rysunkach 49-56
4. Słaba jakość niektórych rysunków (zrzuty z ekranu)
5. Profesor Jarosław Czyż pracuje na Wydziale Biologii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego a nie w Katedrze Biologii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
6. W wykazie skrótów znajdują się pojęcia PLL (CD), PLL oraz PLGA (CD) i ich wyjaśnienia. W mojej opinii skróty te były używane inaczej w treści dysertacji niż wyjaśnione.
7. W wykazie skrótów nie powinno się wyjaśniać skrótów zapisanych w rozporządzeniach IUPAC np. skróty trójliterowe aminokwasów

Na zakończenie recenzji warto podkreślić, że p. Maciej Cieślak jest współautorem dwóch publikacji naukowych w czasopismach z listy JCR oraz dwóch artykułów popularnonaukowych. Brał udział w prezentowaniu wyników naukowych w formie doniesień konferencyjnych (szesnastu). Jest współtwórcą jednego patentu RP, powstałego na bazie wyników jego pracy doktorskiej. Doktorant uczestniczył jako wykonawca w realizacji jednego projektu naukowego (OPUS).

Uważam, że tematyka recenzowanej pracy doktorskiej jest interesująca i wnosi nową wiedzę w rozwój dyscypliny, szczególnie w zakresie syntezy dendronów i dendrymerów typu „bola” oraz ich ciekawych zastosowań biologicznych wobec komórek nerwowych. Wyniki uzyskane przez

Doktoranta zostały zinterpretowane poprawnie. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Instytutu Chemii Organicznej PAN o dopuszczenie mgr Macieja Cieślaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.



Sylwia Rodziewicz-Motowidło