

Prof. dr hab. MARIUSZ MAKOWSKI
KIEROWNIK

Gdańsk, 5 czerwca 2020 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej **magistra Mateusza Jakubowskiego**

zatytułowanej:

„Projektowanie, charakterystyka spektroskopowa i cytotoksyczność nowych, mieszanych kompleksów platyny(II) z ligandami N-, O- i S-donorowymi.”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr. Mateusza Jakubowskiego została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Iwony Łakomskiej w Zespole Naukowym Chemii Bionieorganicznej Katedry Chemii Analitycznej i Spektroskopii Stosowanej Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Rozprawa została napisana w sumie na 143 stronach. Zawiera ona wszystkie wymagane odpowiednimi przepisami elementy, w tym *Abstrakt* w języku angielskim. W celu ułatwienia lektury dołączona została *Karta wzorów strukturalnych* otrzymanych i badanych w toku realizacji pracy połączeń kompleksowych. Na ostatnich trzech stronach głównego dokumentu znajduje się informacja na temat przebiegu dotychczasowej kariery naukowej Kandydata do stopnia naukowego doktora wraz z informacją o Jego zaangażowaniu dydaktycznym i organizacyjnym. Praca została napisana bardzo dobrze od strony językowej. Za szczególnie mocną jej stroną należy uznać też szatę graficzną i edytorską. Oczywiście w tego rodzaju rozprawach nie można było uniknąć pewnego rodzaju nieścisłości, żargonowych stwierdzeń i pewnego rodzaju błędów edytorskich. Usterki te nie wpływają jednak na moją całkowitą i bardzo pozytywną ocenę pracy. Dysertacja została napisana w przemyślany i bardzo dojrzały sposób jak na osobę na tym etapie swojego rozwoju naukowego. Moim zdaniem jest to praca kompletna zarówno pod względem wykonania jak i samego opisu wyników.

Tytuł rozprawy odpowiada treści pracy i zawartych w niej wyników badań. Mgr Mateusz Jakubowski podjął się w swojej dysertacji bardzo ważnej i aktualnej problematyki związanej z poszukiwaniem nowych i bardziej skutecznych w terapii leczenia nowotworów połączeń



Prof. dr hab. MARIUSZ MAKOWSKI
KIEROWNIK

Gdańsk, 5 czerwca 2020 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej **magistra Mateusza Jakubowskiego**

zatytułowanej:

„Projektowanie, charakterystyka spektroskopowa i cytotoksyczność nowych, mieszanych kompleksów platyny(II) z ligandami N-, O- i S-donorowymi.”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr. Mateusza Jakubowskiego została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Iwony Łakomskiej w Zespole Naukowym Chemii Bionieorganicznej Katedry Chemii Analitycznej i Spektroskopii Stosowanej Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Rozprawa została napisana w sumie na 143 stronach. Zawiera ona wszystkie wymagane odpowiednimi przepisami elementy, w tym *Abstrakt* w języku angielskim. W celu ułatwienia lektury dołączona została *Karta wzorów strukturalnych* otrzymanych i badanych w toku realizacji pracy połączeń kompleksowych. Na ostatnich trzech stronach głównego dokumentu znajduje się informacja na temat przebiegu dotychczasowej kariery naukowej Kandydata do stopnia naukowego doktora wraz z informacją o Jego zaangażowaniu dydaktycznym i organizacyjnym. Praca została napisana bardzo dobrze od strony językowej. Za szczególnie mocną jej stronę należy uznać też szaty graficzną i edytorską. Oczywiście w tego rodzaju rozprawach nie można było uniknąć pewnego rodzaju nieścisłości, żargonowych stwierdzeń i pewnego rodzaju błędów edytorskich. Usterki te nie wpływają jednak na moją całkowitą i bardzo pozytywną ocenę pracy. Dysertacja została napisana w przemyślany i bardzo dojrzały sposób jak na osobę na tym etapie swojego rozwoju naukowego. Moim zdaniem jest to praca kompletna zarówno pod względem wykonania jak i samego opisu wyników.

Tytuł rozprawy odpowiada treści pracy i zawartych w niej wyników badań. Mgr Mateusz Jakubowski podjął się w swojej dysertacji bardzo ważnej i aktualnej problematyki związanej z poszukiwaniem nowych i bardziej skutecznych w terapii leczenia nowotworów połączeń

kompleksowych jonów platyny(II) z ligandami N-, O- i S-donorowymi, które mogłyby zastąpić obecnie używane związki, takie jak: cis-platynę, karboplatynę i oksaliplatynę. Obecnie używane chemioterapeutyki, zawierające w swojej budowie jony platyny, wykazują się czasami zbyt niską cytotoxycnością w stosunku do chorych komórek, często wymagają leczenia wspomagającego i tym samym okazują się być czasem za mało skuteczne. Dodatkowo przy ich zastosowaniu w terapii pojawia się też cała kaskada efektów ubocznych i niepożądanych dla organizmu. Zasadne wydają się być tym samym poszukiwania nowych i skuteczniejszych chemioterapeutyków zawierających w swoim składzie jony platyny w oparciu o modyfikacje ich sfer koordynacyjnych, które mogłyby być bardziej cytotoxyczne w kierunku komórek nowotworowych oraz mniej toksyczne dla zdrowych komórek. O tym jak ważne jest poszukiwanie nowych preparatów w terapii nowotworowej świadczą przytaczane przez Autora we *Wprowadzeniu* dane informujące o 10 milionach zgonów na różnego rodzaju nowotwory w 2018 roku i prognozie wzrostu zachorowań do 22 milionów w 2030 roku. Nowotwory są drugą, po chorobach układu krążenia, przyczyną śmierci na świecie.

Część teoretyczna pracy została napisana na 35 stronach. Jest to solidny przegląd literatury poświęcony charakterystyce wybranych ligandów O-, N- i S-donorowych, tj. karboksylany, pochodne adeniny, w tym m.in. jej pochodnej roskowityny, analogów adeniny: 7-azoindolu oraz 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirymidyny, wybranych nukleozydów: kinetyna, rybozyd kinetyny (KR), rybawiryna (RBV), EICAR (5-etynylo-1- β -D-rybofuranozyloimidazolo-4- karboksamid), ETCAR (5-etynylo-1- β -D-rybofuranozylo-1,2,3-triazolokarboksamid), oraz związku o charakterze amfifilowym – DMSO. Dla opisywanych ligandów o oznaczeniu biologicznym zostały przedstawione sposoby chelatacji w połączeniach z jonami metali, występowania charakterystycznych widm spektroskopowych w wolnych ligandach oraz po połączeniu z jonami metalu, czy też wartości współczynnik IC₅₀ dla wybranych linii komórkowych. W kilku miejscach tej części rozprawy, „wkradł” się żargon. W zdaniu na 13 stronie (*cyt.*): „Tego rodzaju różnorodność wykazano m.in. w strukturze krotonianu lantanu [6], polimerycznym kompleksie europu z 1,3,5-tris-(4-karboksyfenylo)benzenem [14], (...)”. Czy opisywane tutaj związki to połączenia metalu (sugeruje to jego zerowy stopień utlenienia) czy połączenia jonów metali? Podobnie w zdaniu na tej samej stronie rozpoczynającym akapit (*cyt.*): „W celu określenia sposobu koordynacji karboksylanu w kompleksach metali (...)”. W zacytowanym fragmencie „kompleksy metali” są znaczącym uproszczeniem i żargonem, którego należałoby raczej unikać.

W dalszej części pracy już tego rodzaju uchybień nie napotykałem. W ostatnim zdaniu rozdziału I.1. można przeczytać (cyt.): „(...) (np. stała szybkości reakcji hydrolizy Carboplatyny wynosi $5.2 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ [20])”. Prościej byłoby spolszczyć nazwę i napisać „karboplatyna”. W języku polskim separatorem oddzielającym liczby dziesiętne jest przecinek. Ta ostatnia usterka pojawia się konsekwentnie w całym tekście rozprawy. Została ona zapewne „zaadoptowana” bezpośrednio z literatury i staje się niestety czymś powszechnym. I moja ostatnia uwaga do tej części rozprawy. Na Rys. 10 został przedstawiony wzór strukturalny związku Ru, w którym rolę mostkującego liganda pełni DMSO. Przedstawiony wzór sugeruje, iż mostkujący atom tlenu jest trójwiązalny. Prosiłbym o komentarz podczas publicznej obrony. W dalszej części tego rozdziału znajdują się dostępne w literaturze informacje nt. używanych leków antynowotworowych zawierających jony Pt(II) z ligandami O,O-donorowymi, tj. cisplatina, karboplatyna, oksaliplatina, heptaplatyna, nedaplatyna i lobaplatyna oraz kierunków badań poszukiwania nowych generacji preparatów o zastosowaniu w leczeniu nowotworów, zawierających różne typy ligandów i jony platyny w swojej budowie. Ten fragment poparty jest licznymi wynikami badań biologicznych dostępnymi w literaturze. Na tej podstawie możliwe jest określenie przydatności badanych związków w leczeniu oraz kierunków poszukiwania nowych, selektywnie działających i tym samym skuteczniejszych preparatów. Jak słusznie zauważa Autor rozprawy, w celu otrzymania dikarboksylowych połączeń kompleksowych jonów platyny(II) należy prowadzić badania w trzech kierunkach: (i) modyfikacji lub wymianie jednego z ligandów (szczawianowy lub 1R,2R-DACH), (ii) modyfikacji lub wymianie dwóch ligandów (O,O-donorowego i N-donorowego) z zachowaniem chromoforu typu PtO₂N₂, (iii) całkowitej zmiany składu sfery koordynacyjnej jonów Pt(II) poprzez wprowadzenie dodatkowego liganda S-donorowego.

Cel pracy został zdefiniowany na dwóch stronach pracy. Głównym celem zaproponowanych przez mgr. Mateusza Jakubowskiego było poszukiwanie nowych, skuteczniejszych i bardziej selektywnie działających preparatów opartych o sferę koordynacyjną związków zawierających jony Pt(II) o ogólnym wzorze [Pt(L1)(L2)(L3)], gdzie L1-3 to odpowiednio ligandy O-, N- i S-donorowe. Gdzie:

- L1 - dikarboksylany (cyklobutano-1,1-dikarboksylan, malonian);
- L2 - 5,7-dipodstawione-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirymidyny: 5,7-ditertbutylo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirymidyna (dbtp), 5,7-dimetylo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirymidyna (dmtpt), 5,7-difenylo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirymidyna (dptpt), 7-izobutylo-5-metylo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirymidyna (ibmtpt);

lub rybozydy – rybozyd kinetyny (KR), 1-β-D-rybofuranozylo-4-(2-pirydylo)-1,2,3-triazol (PTR);

- L3 – sulfotlenki – dimetylosulfotlenek (dmsO), difenylosulfotlenek (dpso), tlenek 1-tetrahydrotiofenu (tmso).

Realizacja celu została zaplanowana na kilka kroków badawczych: otrzymanie związków, ustalenie składu, określenie właściwości lipofilowych oraz przeprowadzenie dla wybranych połączeń badań biologicznych, tj.: *i)* hydroliza; *ii)* powinowactwo do glutationu i albuminy; *iii)* zdolności do indukowania apoptozy i generowania reaktywnych form tlenu; *iv)* wpływ na cykl komórkowy wybranej linii komórkowej; *v)* testy toksyczności w warunkach *in vivo*.

Część eksperymentalna dysertacji została podzielona na dwie składowe. W pierwszej z nich opisane zostały warunki syntezy ośmiu ligandów o charakterze N- i O-donorowym oraz 24 połączeń kompleksowych Pt(II), w tym po 12 pochodnych dichlorkowych i dikarboksyłowych o zmiennej sferze koordynacyjnej wokół jonu metalu. Doktorant przeprowadził badania strukturalne otrzymanych związków z wykorzystaniem analizy elementarnej, spektroskopii oscylacyjnej FTIR-ATR, analizy rentgenostrukturalnej, spektroskopii wielojądrowego rezonansu magnetycznego (¹H, ¹³C, ¹⁵N, i ¹⁹⁵Pt) NMR oraz spektrometrii mas (ESI-MS). Załączone wyniki analiz nie pozostawiają wątpliwości co do składu i struktury otrzymanych związków. Opisane procedury pozwalają na odtworzenie eksperymentu w podanych warunkach. W drugim etapie zostały opisane przez mgr. Mateusza Jakubowskiego wyniki badań biologicznych. Badania te przeprowadzone zostały w trzech etapach. Ich celem było określenie potencjału terapeutycznego otrzymanych połączeń kompleksowych Pt(II). Do badań biologicznych, ze względu na lepszą rozpuszczalność, wybrano związki **(11)-(16)** i **(22)-(24)** [numeracja związków zgodna z tą w *Pracy doktorskiej*]. Dla tych dziewięciu związków przeprowadzono testy lipofilowości (pomiar parametru *logP*) w układzie 1-oktanol-woda. Następnie tę samą grupę związków poddano testom na aktywność antyproliferacyjną na różnych liniach komórkowych. Badania te zostały wykonane przy współpracy z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu oraz Zakładem Medycyny Regeneracyjnej, Banku Komórek i Tkanek CM UMK w Toruniu. W drugim etapie badań biologicznych przeprowadzono testy kinetyki hydrolizy badanych związków [**(11)-(16)**] oraz ich powinowactwo do glutationu, by w etapie końcowym dla najlepiej rokującego połączenia kompleksowego **(15)** – [Pt(mal)(dmsO)(dptp)] przeprowadzić oddziaływania z albuminą, określenie mechanizmu śmierci

komórek A549, wpływu na cykl komórkowy linii A549, generowanie reaktywnych form tlenu (RFT) w hodowli A549 oraz toksyczność *in vivo* na 9-10 tygodniowych immunokompetentnych myszach BALB/c Nude, płci męskiej o wadze 25-30 g w odpowiednio zdefiniowanych warunkach. Badania te przeprowadzono we współpracy z zespołem dr. hab. Janusza Dąbrowskiego, prof. UJ z Wydziału Chemii UJ i Małopolskim Centrum Biotechnologii UJ.

Rozdział wyniki i ich dyskusja jest naturalną konsekwencją przeprowadzonego eksperymentu. Tylko 4 z otrzymanych połączeń kompleksowych jonów Pt(II) udało się wyizolować w postaci monokryształów nadających się do badań rentgenostrukturalnych, są to odpowiednio: **(3)**, **(5)**, **(9)** i **(13)**. Na rysunkach 49 i 51 zostały przedstawione struktury krystaliczne wymienionych połączeń wraz z wybranymi parametrami geometrycznymi – długości pomiędzy jonami metalu i atomami liganda oraz wybrane kąty płaskie. Dla lepszego zobrazowania struktury związku należałoby podać też kąty dwuścienne, które pomogłyby w zdefiniowaniu wzajemnego położenia atomów i całych fragmentów względem siebie. Umieszczenie pełnych danych z pomiarów krystalograficznych w postaci załącznika (suplementu) byłoby na pewno dobrym rozwiązaniem. Dla wszystkich otrzymanych do badań połączeń kompleksowych **(1)**-**(24)** zostały przeprowadzone bardzo szczegółowe dyskusje pomiarów fizykochemicznych, głównie spektroskopowych.

Bardzo interesujące są wyniki badań właściwości biologicznych wyselekcjonowanych połączeń kompleksowych platyny(II). Dla związków **(11)**-**(16)** i **(22)**-**(24)** zmierzone wartości współczynnika lipofilności $\log P$ były wyższe od tych służących jako punkty odniesienia dla cis-platyny, karboplatyny i oksaliplatyny. Co świadczy o ich wyższej lipofilowości. Cztery z badanych połączeń [**(12)**, **(15)**, **(16)** i **(24)**] wykazują wartości $\log P > 0$. Mogą one zatem łatwiej przenikać przez błony komórkowe, ale ze względu na gorszą rozpuszczalność w wodzie gorzej wchłaniają się w przewodzie pokarmowym. na podstawie wyników badań antyproliferacyjnych (pomiar parametru IC_{50}) wykazał Doktorant, że związki **(13)**-**(16)** są mniej toksyczne *in vitro* względem mysich fibroblastów linii BALB/3T3, niż stosowane obecnie w chemioterapii cis-platyna i karboplatyna. Doktorant udowodnił również, że połączenia kompleksowe Pt(II) zawierające w sferze koordynacyjnej jony dikarboksyłowe z triazolopirymidynami **(13)**-**(16)** wykazują najbardziej selektywne działanie na komórki nowotworowe. Badania kinetyki reakcji hydrolizy zasadowej miały na celu określenie inertności połączeń **(13)**-**(16)**, co wpływa na transport w krwioobiegu i działanie

z DNA. Badane związki ulegają szybszej hydrolizie niż cis-platyna i karboplatyna. Badane na tym etapie związki kompleksowe wykazują mniejsze powinowactwo do glutationu niż cis-platyna i karboplatyna, a tym samym powinny charakteryzować się mniejszą toksycznością względem prawidłowych komórek i tkanek. Biorąc pod uwagę wyniki wszystkich przeprowadzonych testów biologicznych, do szerszego zakresu badań biologicznych został wybrany przez Doktoranta związek kompleksowy **(15)** - $[\text{Pt}(\text{mal})(\text{dms})\text{dptp}]$. Wyniki tych badań są bardzo cenne. Okazało się, że $[\text{Pt}(\text{mal})(\text{dms})(\text{dptp})]$ posiada selektywne działanie cytotoksyczne wobec nowotworu płuc linii A549. Wykazuje on zdolność do silnego wiązania albuminy podczas transportu w układzie krwionośnym, ale jest to wiązanie na tyle słabe, że możliwe jest jego uwalnianie w miejscu docelowym. Związek **(15)** generuje RFT, determinując tym samym cytotoksyczność oraz wykazuje mniejszą toksyczność *in vivo* od karboplatyny. Enkapsulacja **(15)** w połączeniu z kopolimerem Pluronic®P123 prowadzi do długoterminowej przeżywalności myszy BALB/c Nude z indukowanym nowotworem płuc linii A549.

Kolejne strony pracy to *Wnioski i uogólnienia* (2 strony), Streszczenia w języku polskim i angielskim (2 strony), Spis tabel i rysunków (4 strony). W pracy zostały zacytowane 192 pozycje literaturowe. Należy zwrócić tutaj uwagę na fakt, iż większość z nich została opublikowana w XXI wieku. Dowodzi to aktualności prowadzonej przez Doktoranta tematyki badań. Dorobek naukowy mgr. Mateusza Jakubowskiego zawarty został na 3 stronach.

Pan mgr. Mateusz Jakubowski jest współautorem 4 prac z listy JCR, dwóch zgłoszeń patentowych (w tym jednego międzynarodowego) oraz 15 prezentacji konferencyjnych. Za swoją działalność naukową i organizacyjną był kilkakrotnie nagradzany. Podnosi swoje kompetencje, angażuje się w działalność organizacyjną, uczestniczy w realizacji projektów naukowo-badawczych.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Mateusza Jakubowskiego została napisana w języku polskim. Jest to kompletne studium nad poszukiwaniem nowych chemioterapeutyków. Doktorant nie ustrzegł się pewnych błędów, o których wspomniałem powyżej. Jednak, krytyczne uwagi zawarte w recenzji nie mają wpływu na moją bardzo pozytywną ocenę i wysoką jakość wykonanych przez Kandydata badań oraz Jego duże zaangażowanie w pracę eksperymentalną. Praca zawiera wymagane elementy nowości naukowej potwierdzone wynikami badań. Przedłożona mi do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane ustawą o tytule

i stopniach naukowych a także zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii UMK w Toruniu o dopuszczenie mgr. Mateusza Jakubowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia.

Ze względu na wysoką wartość naukową oraz znaczący dorobek naukowy Kandydata, wnoszę do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o **wyróżnienie** rozprawy doktorskiej mgr. Mateusza Jakubowskiego.

Mariusz Makowski