

Prof. dr hab. Jacek Jemielity
Laboratorium Chemii Biologicznej
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
e-mail: j.jemielity@cent.uw.edu.pl
tel. 22 5543774

Warszawa 09.12.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Dawida Janasika

p.t. „Przełączniki molekularne jako środki kontrastowe ^{19}F NMR”

Spektroskopia NMR (Nuclear Magnetic Resonance) stanowi niezwykle potężne narzędzie w chemii i biochemii oraz diagnostyce medycznej umożliwiając badanie struktury oraz dynamiki molekuł w ich naturalnym środowisku. W szczególności, NMR fluorowe (^{19}F NMR) zyskuje na znaczeniu dzięki swoim unikalnym właściwościom. Fluor-19, ze względu na swoją wysoką czułość oraz silne oddziaływania spinowe oraz bardzo niewielkie rozpowszechnienie w organizmach żywych, pozwala na precyzyjnym śledzeniem i obrazowaniem procesów molekularnych w złożonych układach biologicznych. Z kolei przełączniki molekularne, które potrafią zmieniać swoje właściwości w odpowiedzi na zewnętrzne bodźce, znajdują coraz szersze zastosowanie w różnych dziedzinach, w tym w medycynie i technologii materiałowej. W kontekście spektroskopii NMR, ich zdolność do modulowania sygnału NMR stanowi bardzo atrakcyjne podejście do poprawy jakości obrazowania i kontrastowania w badaniach biologicznych oraz diagnostyce medycznej. Zastosowanie ^{19}F NMR w tym kontekście otwiera nowe możliwości w zakresie detekcji i analizy cząsteczek, pozwalając na uzyskanie informacji o strukturze oraz dynamice biologicznych układów molekularnych.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr. inż. Dawida Janasika, wykonana w Katedrze Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii, Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej pod kierunkiem Prof. Tomasza Krawczyka doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy, a jej celem było opracowanie hydrazonowych przełączników molekularnych do obrazowania zmian pH metodą ^{19}F MRI.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa mgr. Inż. Dawida Janasika została przygotowana w formie cyklu 4 publikacji opatrzonych 27 stronicowym komentarzem w którym zacytowanych jest 209 pozycji literaturowych. Na zbiór prac, składa się praca przeglądowa (*Chem. Eur. J.*); oraz 3 oryginalne prace eksperymentalne opublikowane w *Analytical Chemistry* oraz *ACS Sensors* (dwie prace). Należy podkreślić, że we wszystkich czterech pracach Doktorant jest pierwszym autorem. Cykl prac składających się na rozprawę doktorską rozpoczyna praca zatytułowana „*19F MRI Probes for Multimodal Imaging*” opublikowana w grudniu 2021 w *Chemistry – a European Journal*. Jest to praca przeglądowa, która pokazuje jak doktorant przygotował się do realizacji projektu doktorskiego uświadamiając czytelnikom, ale również sobie, co w kontekście tej metody jest najbardziej istotne, jakie są strategie oraz wyzwania. W pracy zaprezentowano jak multimodalne sondy *F-19 MRI* kompensują niedoskonałości innych technik obrazujących tkanki miękkie oferując lepszą czułość i/lub rozdzielczość obrazowania w porównaniu z jednomodalnymi odpowiednikami. W pracy przedstawiono strategie projektowania multimodalnych sond w odniesieniu do ich struktury, właściwości fizykochemicznych, biokompatybilności i jakości obrazów.

Na część eksperymentalną rozprawy składają się łącznie trzy prace dwie z nich opublikowane w *ACS Sensors* oraz jedna w *Analytical Chemistry*. Obydwa czasopisma są wydawane przez ACS czyli wydawcze znanego z przestrzegania najwyższych standardów w ocenie prac naukowych zarówno na poziomie deytorskim jak i recenzenckim. To w dużym stopniu zwalnia mnie z obowiązku weryfikacji poprawności zastosowanych metod oraz adekwatności wyciąganych konkluzji w świetle danych eksperymentalnych, gdyż jestem przekonany, że zostało to zrobione przez najwyższej klasy specjalistów, recenzujących ten manuskrypt i bardzo doświadczonych edytorów. Skupie się więc na osiągnięciach Doktoranta i współpracowników opisanych we wspomnianych publikacjach. Warto też podkreślić, że z oświadczeń współautorów prac oraz pozycji doktoranta na listach współautorów jednoznacznie wynika wiodący wkład mgr. Janasika w przeprowadzeniu badań eksperymentalnych, analizie wyników, przygotowaniu materiału do publikacji a także istotny wkład w planowanie badań. Niniejsza recenzja ma na celu szczegółowe omówienie postulowanych hipotez, metodologii ich weryfikacji oraz istotnych rezultatów pracy doktorskiej, a także wskazanie na możliwe kierunki dalszych badań w tej ekscytującej i dynamicznie rozwijającej się dziedzinie.

Pierwsz praca eksperymentalna zatytułowana „*Ratiometric pH-Responsive 19F Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents Based on Hydrazone Switches*” została opublikowana w *Analytical Chemistry*. W pracy tej opisano serię hydrazonowych przełączników molekularnych zawierających grupę $-CF_3$. Pozwoliły one na śledzenie zmiany konformacji cząsteczki pod wpływem pH za pomocą *19F NMR*, *1H NMR*, UV-vis i *19F MRI* w niskim (milimolarnym) zakresie stężeń z krótkim czasem akwizycji zarówno w polarnych rozpuszczalnikach organicznych, jak i emulsjach wodnych. Zwłaszcza jedna z sond opisanych w pracy wykazywała bardzo istotne zmiany przesunięcia chemicznego dla izomeru, co

otwiera możliwości zastosowania takich przełączników molekularnych jako inteligentnych czynników kontrastowych w MRI. Kolejna praca eksperymentalna opublikowana w ACS Sensors w styczniu 2023 (ACS Sens. 2023, 8, 721-727) jest niejako kontynuacja poprzedniej pracy. W tej pracy autorzy w zbliżonym układzie badają wpływ elektronowy podstawików przyłączonych do pierścienia w którym znajduje się również grupa reporterowa (CF₃) na proces izomeryzacji E/Z wiązania podwójnego C=N. Izomeryzacja napędzana była protonacją atomu azotu z podjednostce pirydynowej. Ustalono ogólną zależność między stałymi Hammetta podstawników na pK_a przełączników. Wprowadzenie silnych grup elektronodonorowych pozwoliło uzyskać przełącznik hydrazonowy o pK_a około 6, pozwalający śledzić zmiany pH znacznie bardziej fizjologiczne niż poprzednio, co czyni tego typu sondy bardziej odpowiednimi do zastosowania w ¹⁹F MRI jako środek kontrastowy. Ten przykład pokazuje również jak niewielkie zmiany w strukturze dość oddalone od miejsca gdzie dochodzi do izomeryzacji mogą istotnie wpływać na właściwości fizykochemiczne i potencjalne zastosowania.

Ostatnia z prac eksperymentalnych również opublikowana w ACS Sensors (ACS Sens. 2023, 8, 1971–1979) i również bazuje na podobnych strukturach związków chemicznych jako przełączników molekularnych. W przeciwieństwie do poprzednich prac gdzie zmiany odczytu sygnału opierały się na zmianach przesunięcia chemicznego w widmach ¹⁹F i ¹H NMR wywołanych izomeryzacją E/ Z ugrupowania hydrazonowego tym razem Doktorant chciał zbadać czy zjawisko można badać poprzez zmianę szybkości relaksacji. Pozwoliłoby to na wykorzystanie standardowych akwizycji obrazów ważonych T1 lub T2 i zapewnienie spójności, dokładności diagnostycznej, wydajności i skutecznej komunikacji w obrazowaniu medycznym. Ponieważ w poprzednich układach czasy relaksacji sygnałów fluoru nie zmieniały się pod wpływem izomeryzacji było oczywiste, że sonda wymaga odpowiedniej modyfikacji. Proponowanym rozwiązaniem było wprowadzenie paramagnetycznego centrum do przełącznika, poprzez podstawienie jednego z pierścieni aromatycznych lub etylowej grupy funkcyjnej paramagnetycznym kompleksem gadolinu (III). Powstały trzy takie sondy różniące się miejscem przyłączenia grupy CF₃ w pierścieniu fenylowym, izomery orto, meta i para. Na bazie obliczeń DFT obliczono jak izomeryzacja wpłynie na zmianę odległości grupy reporterowej (CF₃) do centrum paramagnetycznego (Gd). Największą zmianę odległości zapewniała izomeryzacja związku z podstawieniem meta grupy trifluorometylowej i okazał się najbardziej odpowiednim kompleksem do obrazowania MRI, wykazując ponad 400% zmian czasu relaksacji w zakresie pH 4-7. Wynik ten pozwalają wierzyć w wysoki potencjał aplikacyjny i mogą być wykorzystane w diagnostyce.

Z powyższego opisu przeprowadzonych badań wynika, że całość stanowi spójną całość. W pracy w przemyślany sposób pokazano jak zmiany chemiczne sond mogą wpływać na ich właściwości, a przez to również zastosowania. W publikacjach pokazano bardzo bogaty materiał badawczy od syntezy sond przez badania eksperymentalne wykorzystujące różnorodne techniki eksperymentalnych aż po

badania obliczeniowe. Nie mam wątpliwości, że otrzymane sondy przyczynią się do dalszego rozwoju technik obrazowania opartych na 19F.

Zwróciłem uwagę, że liczba otrzymanych sond molekularnych we wszystkich pracach jest stosunkowo niewielka jeśli zestawimy to efektem publikacyjnym (recenzent wyraża tu swoją zadrość związaną z efektywnością pracy), co rodzi pytanie, czy otrzymane sondy to wszystkie które otrzymano podczas realizacji doktoratu, czy tylko te które finalnie znalazły się w publikacjach?

Do obowiązków recenzenta należy również wykazanie słabości rozprawy przedstawionej do oceny, a tych na szczęście w recenzowanej pracy jest niewiele. Jak wspomniałem wcześniej nie czuje potrzeby recenzowania prac już opublikowanych gdyż one zostały już poddane odpowiedniej ocenie, przez światowych ekspertów w dziedzinie, jednak zwraca uwagę w niektórych miejscach ograniczona czytelność niektórych figur, co utrudnia interpretacje wyników, zwłaszcza przez tych badaczy, którzy poświęcili już swój wzrok na ołtarzu nauki.

Jeśli chodzi o komentarz do publikacji to jest on dość krótki, co siłą rzeczy zmniejsza ryzyko popełnienia błędów przez autora takiego tekstu. Mam pewien niedosyt co do ilości treści w nim zawartych, a skrótowa forma sprawia, że cierpi również przejrzystość i jasność przekazu. Dobrym przykładem obrazującym skrótową formułę tego tekstu jest ulubiony rozdział zapracowanych recenzentów czyli „Podsumowanie i wnioski”. Podsumowanie sprawia wrażenie bardzo ogólnikowego, zabrakło mi ilościowego podsumowania efektów pracy Doktoranta w ramach projektu doktorskiego. Zabrakło również pewnego zarysowania jak ta opracowana technologia może być wykorzystana w przyszłości. Może podczas publicznej obrony uda mi się namówić Doktoranta na popuszczenie wodzy fantazji w tym zakresie. Prosiłbym aby doktorant podczas publicznej obrony podzielił się swoją wiedzą na temat innych przełączników molekularnych pozwalających śledzić zmiany pH.

Nie mam jednak wątpliwości, że bogaty materiał doświadczalny, uzyskany podczas realizacji pracy jest cenny ze względów poznawczych, a w przyszłości z pewnością również diagnostycznych. Rozprawa wnosi bardzo istotny wkład w metodologię badań obrazowaniem przy pomocy 19F MRI i jestem przekonany, że opracowane podczas realizacji pracy narzędzia molekularne znajdą szerokie zastosowanie w albo w dalszym doskonaleniu sond, ale również w opracowaniu testów diagnostycznych do konkretnych zastosowań. Na odrębny komentarz zasługuje dorobek publikacyjny Doktoranta. Pan magister Dawid Janasik jest współautorem 7 prac opublikowanych w bardzo dobrych czasopiśmie z listy filadelfijskiej i mimo, że powstały w przeciągu ostatnich 4 lat były już zauważone przez środowisko naukowe (38 niezależnych cytowań). Sam cykl 4 prac opublikowanych w bardzo dobrych czasopiśmie naukowych wchodzących w skład rozprawy, w których Doktorant jest pierwszym autorem, robi bardzo duże wrażenie i zasługuje na autentyczny podziw.

W konkluzji z całym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszelkie warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o dopuszczenie mgr Dawida Janasika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę nowatorski charakter przedstawionych badań objawiający się opracowaniem zupełnie nowych i niezwykle cennych narzędzi molekularnych pozwalający na obrazowanie zmian pH metodami ^{19}F MRI, a co za tym idzie olbrzymi potencjał aplikacyjny tych narzędzi wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana magistra Dawida Janasika.