



Kraków, 26 lipca 2022 roku

dr hab. Małgorzata Brindell, prof. UJ
Zakład Chemii Nieorganicznej
Wydział Chemii UJ

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Chrzanowskiej
zatytułowanej
„Reaktywność metalonieorganicznych polipirydylowych kompleksów rutenu(II) i ich
zastosowanie jako katalizatory w procesie transferu jonu wodorkowego”**

Praca doktorska Pani mgr Marty Chrzanowskiej została przygotowana pod kierunkiem Pani dr hab. Anny Katafias profesora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika (UMK) w Toruniu. Badania zostały wykonane w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Koordynacyjnej Wydziału Chemii UMK. Obliczenia teoretyczne zostały przeprowadzone we współpracy z drem Ralphem Puta z Wydziału Chemii i Farmacji Uniwersytetu w Erlangen-Nürnberg w Niemczech.

Jednym z wyzwań współczesnej medycyny jest zwiększenie skuteczności leczenia nowotworów, które są jedną z głównych przyczyn zachorowalności i umieralności ludzi na całym świecie. Pomimo wielu sukcesów obecnie stosowanych chemioterapeutyków wciąż ich skuteczność pozostaje zbyt mała, aby osiągnąć znaczący postęp w leczeniu chorób nowotworowych. Jedną z głównych przyczyn porażki jest duża złożoność i heterogeniczność nowotworów. Zatem podejście inne niż klasyczne wykorzystywane w znanych chemioterapeutykach opartych na związkach alkilujących, kompleksach platyny, antymetabolitach czy inhibitorach topoizomerazy, może przynieść dodatkowe korzystne działanie. Takim innym podejściem terapeutycznym jest np. indukowanie zmian redoksowych w komórce, w głównej mierze polegające na wywoływaniu stresu oksydacyjnego, co często jest wykorzystywane w projektowaniu m.in. związków do terapii fotodynamicznej. Z drugiej strony możliwa jest ingerencja w homeostazę redoksową komórki poprzez wywołanie stresu redukcyjnego. Ta ścieżka jest dużo mniej zbadana i prace nad możliwością przesunięcia równowagi jednego z podstawowych związków odpowiedzialnych za równowagę redoksową tj. NAD^+ w kierunku powstawania jego zredukowanej formy, czyli NADH należą do badań pionierskich. W projektowaniu leków niewątpliwie prym wiodą związki organiczne, jednak wykorzystanie jonów metali w połączeniu z różnorodnymi ligandami organicznymi wydaje się być bardzo interesującą ścieżką badawczą wnoszącą dodatkowe możliwości. Tematyka przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej p. mgr Marty Chrzanowskiej doskonale wpisuje się w ten obszar badawczy. Należy podkreślić, iż mimo wielu prac naukowych nad możliwością wykorzystania związków kompleksowych rutenu, jako katalizatorów w procesie transferu jonu wodorkowego prowadzącego do powstania NADH większość badanych kompleksów to związki metaloorganiczne. Natomiast układy zaprojektowane w niniejszej



pracy oparte są o metalonieorganiczne polipirydylowe kompleksy rutenu(II) co sprawia, iż temat wybrany przez Doktorantkę jest aktualny a zarazem pionierski.

Przedstawiona do oceny rozprawa rozpoczyna się wykazem stosowanych skrótów, a następnie zaprezentowane jest streszczenie pracy w języku polskim oraz angielskim. Dalej w pracy znajduje się wprowadzenie, w którym Doktorantka krótko zarysowuje historię badań nad wykorzystaniem kompleksów metali w terapii przeciwnowotworowej, w tym również kompleksów rutenu. Kolejny rozdział jest dość obszerny i zawiera on przegląd literatury. Został on podzielony na trzy zagadnienia tematyczne. Pierwsze z nich dotyczy zastosowania kompleksów metali przejściowych jako potencjalnych leków o działaniu katalitycznym. Omówione jest wykorzystanie związków metali w terapii fotodynamicznej, jako mimetyków dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalizatorów przeniesienia jonu wodorkowego w układach biologicznych. Temu ostatniemu tematowi poświęcone jest szersze opracowanie, gdyż jest on bezpośrednio związany z problemem badawczym podjętym w niniejszej pracy. Kolejno Doktorantka omówiła wykorzystanie kompleksów metaloorganicznych rutenu w projektowaniu potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Ta część opisana jest bardzo gruntownie pod kątem związków badanych przez grupę Prof. Sadlera, jednak zabrakło tutaj wzmianki o drugim bardzo ważnym pionierze badań nad wykorzystaniem związków metaloorganicznych rutenu jako leków przeciwnowotworowych, a mianowicie o Prof. Dysonie i jego związkach typu RAPTA. W ostatni rozdziale Doktorantka skupiła się na przedstawieniu wybranych aspektów biologii redoksowej komórki ze szczególnym uwzględnieniem stresu redukcyjnego i jego wykorzystania do projektowania leków. Jest to temat rzadziej poruszany w pracach i wydaje się być obiecującym kierunkiem rozwoju prac nad projektowaniem leków o odmiennym mechanizmie działania. Część literaturowa oparta jest na około 100 pozycjach literaturowych i może ona stanowić doskonałe kompendium wiedzy o obecnie panujących trendach, a licznie przytoczone dane wskazują na dogłębną analizę tej tematyki przez Autorkę.

W kolejnym rozdziale pracy Doktorantka przedstawia cel oraz plan swoich badań. Przygotowany wstęp literaturowy świetnie uzasadnia potrzebę podjętych przez Doktorantkę prac badawczych. Główny celem recenzowanej pracy było sprawdzenie możliwości wykorzystania metalonieorganicznych związków kompleksowych Ru(II) do katalizowania transferu wodorków w kontekście biologii redoksowej. Aby zrealizować założony cel badawczy Doktorantka zaprojektowała serię kompleksów rutenu o ogólnym wzorze $[Ru^{II}(terpy)(N^{\wedge}N)Cl](Cl/ClO_4)$, pozwalającą na sprawdzenie możliwości sterowania reaktywnością w kierunku substytucji liganda jednokleszczowego zachodzącej w roztworach wodnych, kluczowego parametru w procesie katalizy. Doktorantka wskazała szczegółowe cele swojej pracy oraz plan badań pozwalający na ich realizację.

Kolejny rozdział pracy „Część eksperymentalna” jest świetnie przygotowany. Doktorantka przedstawia w nim stosowane odczynniki, a następnie opisuje wykorzystywaną aparaturę



badawczą. Dalej w sposób bardzo szczegółowy opisane są wszystkie syntezy, a dla każdej z grup związków dodatkowo został umieszczony schemat przedstawiający warunki syntezy co bardzo ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z przedstawianymi preparatami. Każdy z otrzymanych związków został dokładnie scharakteryzowany za pomocą analizy elementarnej oraz spektroskopii NMR i UV-Vis, a także spektrometrii mas. Wszystkie związki zostały otrzymane z bardzo dużymi wydajnościami, co niewątpliwie jest dużym sukcesem Doktorantki. Oprócz standardowych widm ^1H NMR i ^{13}C NMR wykonane zostały również ^{15}N NMR co pozwoliło wskazać atomy azotu liganda skoordynowane do jonu centralnego. Kolejno omówiona została metodyka otrzymywania wodorkowych i mrówczanowych pochodnych wybranych kompleksów rutenu, wraz z opisem identyfikacji powstałego produktu w reakcji *in situ*, bez izolacji powstałego produktu. Otrzymane związki były również scharakteryzowane pod kątem ich struktury z wykorzystaniem metod krystalograficznych. W części eksperymentalnej znajduje się również informacja o widmach korelacyjnych NMR jednak w części opisującej wyniki oraz ich dyskusję brak jest wzmianki o nich. Kolejno Doktorantka opisała sposób prowadzenia pomiarów kinetycznych dla poszczególnych reakcji, wyznaczenia stałych dysocjacji kwasowej oraz obliczeń metodą DFT. Przedstawione odpisy są bardzo rzetelne, wskazują na bardzo dobrą znajomość warsztatu badawczego Doktorantki.

Następny rozdział rozprawy zatytułowany „Wyniki i dyskusja” został podzielony na cztery podrozdziały. Pierwszy z nich dotyczy charakterystyki kompleksów. Dla wszystkich otrzymanych kompleksów zostały wyizolowane monokryształy, co pozwoliło na dogłębną analizę strukturalną zsyntetyzowanych związków. Jest to duże osiągnięcie Doktorantki biorąc pod uwagę fakt, iż dwa z syntetyzowanych kompleksów zawierające jako ligandy bidentne bipirydynę i etylenodiaminę były wcześniej już znane i badane, ale do tej pory ich struktury krystaliczne nie były opublikowane. Otrzymane widma masowe potwierdziły koordynację poszczególnych ligandów jednak ze względu na dużą labilizację ligandów oprócz jonu molekularnego uzyskano wiele innych fragmentów kompleksów, co jest typowe w analizie związków kompleksowych przy użyciu ESI-MS.

Kolejny podrozdział dotyczy substytucji liganda monodentnego w związkach typu $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{terpy})(\text{N}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}](\text{Cl}/\text{ClO}_4)$. Jest to kluczowy proces, który musi być uwzględniony w projektowaniu związków wykorzystywanych do katalizowania transferu jony wodorkowego, dlatego został on zbadany przez Doktorantkę bardzo dogłębnie. W swojej pracy pokazała, że poprzez dobór ligandów bidentnych można sterować reaktywnością tych związków. Wykazała szereg korelacji, a także ustaliła mechanizmy molekularne zachodzących reakcji wykorzystując narzędzia kinetyczne do określenia parametrów aktywacji (entropii oraz objętości aktywacji), jak i obliczenia teoretyczne do wyznaczenia stanów przejściowych badanych układów. Należy nadmienić, iż badania zależności ciśnieniowych należą do rzadkości i stanowią świetnie wsparcie dla badań mechanizmów reakcji opartych o badania kinetyki reakcji prowadzonych w funkcji temperatury.



Z kolei trzeci podrozdział skupia się już na głównym celu badań tj. wykorzystaniu związków rutenu do katalitycznej redukcji NAD^+ do NADH . Do badań wybrano dwa związki, które wykazywały największą reaktywność tj. kompleks zawierający etylenodiaminę oraz 2-(aminometylo)pirydynę. Badania nad właściwą reakcją katalityczną były poprzedzone szeregiem prób mających na celu lepsze poznanie produktów pośrednich i reakcji ślepych. Doktorantka bardzo dobrze zaplanowała doświadczenia tak, aby wykluczyć wyniki fałszywie pozytywne. Odpowiednie kompleksy wodorkowe były otrzymywane *in situ* w reakcji z reduktorem NaBH_4 a ich charakterystyka oraz potwierdzenie tożsamości odbywało się w roztworze. Kolejno otrzymano kompleksy mrówczanowe. Transfer jonu wodorkowego do NAD^+ był badany w roztworach wodno-etanolowych w obecności mrówczanu jako donora jonu wodorkowego i kompleksów rutenu w roli katalizatorów tej reakcji. Gruntownie przeprowadzone badania pozwoliły Doktorantce na zaproponowanie mechanizmu badanej reakcji co uważam za jej duże osiągnięcie.

Należy podkreślić, że otrzymane przez Doktorantkę dane eksperymentalne są starannie opracowane i opatrzone odpowiednim komentarzem. Na wyróżnienie zasługuje ogrom pracy włożonej w analizę otrzymanych danych oraz ich skrupulatną dyskusję. Doktorantka wykazała się tutaj dużą umiejętnością w interpretacji otrzymanych danych oraz ich wzajemnemu powiązaniu znalezienia pewnych korelacji. Świadczy to o Jej dojrzałości naukowej. Warsztat badawczy Doktorantki jest bardzo zaawansowany. Posługuje się ona różnymi technikami z dużą biegłością.

Ostatnia część rozdziału „Wyniki i dyskusja” to „Podsumowanie i wnioski”. Właściwie mógłby to być osobny rozdział. W części tej Doktorantka przedstawiła najważniejsze wnioski, które w sposób pełny i zwięzły przedstawiają wyniki jej pracy. Określiła też, w sposób bardzo trafny, największe sukcesy i osiągnięcia swojej pracy tj. wykazanie, iż wybrane do badań metalonieorganiczne kompleksy Ru(II) są zdolne do katalizowania redukcji NAD^+ oraz przedstawienie mechanizmu cyklu katalitycznego. Dużym sukcesem Doktorantki jest też otrzymanie dla wszystkich badanych związków monokryształów.

W dalszej części rozprawy została umieszczona bibliografia obejmująca 160 pozycji, aneks zawierający liczne dodatkowe tabele i wykresy oraz wykaz osiągnięć naukowych Doktorantki.

Większość wyników umieszczonych w pracy została już opublikowana, a więc poddana wnikliwej ocenie przez specjalistów, niewątpliwie stanowią one cenny zbiór informacji na temat reaktywności kompleksów rutenu z ligandami polipirydyłowymi posiadającymi jedno labilne miejsce koordynacyjne. Z obowiązków recenzenta wymienię kilka punktów do przedyskutowania podczas obrony pracy doktorskiej.



1. W „Części teoretycznej” zabrakło informacji dotyczących związków metaloorganicznych rutenu zaprojektowanych w grupie prof. Dysona - proszę, aby Doktorantka krótko wypowiedziała się w tej kwestii.
2. Czym kierowała się Doktorantka przy wyborze buforów dla prowadzonych reakcji? Dla reakcji prowadzonej w pH 7,1 wybrano bufor MES, którego pKa jest ok. 6,15; proszę o wyjaśnienie.
3. Czy Doktorantka mogłaby przedstawić kierunki dalszych badań, które mogłyby stanowić kontynuację prac badawczych ujętych w pracy doktorskiej, czy też propozycję innych tematów badawczych, które byłyby zainteresowania.

Podsumowując moją ocenę rozprawy doktorskiej pani mgr Marty Chrzanowskiej chciałabym podkreślić wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań. Wskazują one na kompetencje Doktorantki w zakresie chemii koordynacyjnej, metod spektroskopowych, badań strukturalnych oraz kinetycznych, jak i na otwartość w kierunku wiedzy o biologicznych aspektach swojej pracy. Wyniki badań recenzowanej pracy doktorskiej zostały w większości już opublikowane w czasopismach z listy JCR: *Dalton Transaction*, *Journal of Coordination Chemistry*, *Inorganica Chimica Acta* i *Inorganic Chemistry*, gdzie Doktorantka jest pierwszym współautorem co świadczy o jej dużym zaangażowaniu w powstanie tych prac oraz w pracy opublikowanej w *Journal of Computational Chemistry*, gdzie jest czwartym współautorem. Swoje badania doktorantka prezentowała na licznych konferencjach krajowych jak i międzynarodowych. Na finansowanie badań uzyskała grant Preludium przyznawany na drodze konkursu organizowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Doktorantka jest również współautorką 7 innych publikacji, co stanowi ogromny dorobek naukowy i świadczy o jej dojrzałości naukowej.

Ja niżej podpisana stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Marty Chrzanowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdzając wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę, zatem spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art.13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami). Wnoszę więc do Rady Naukowej Wydziału Chemii Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Marty Chrzanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników, omówioną przeze mnie we wcześniejszej części rozprawy oraz ich opublikowanie w uznanych czasopismach, stawiam wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.

Karolina Brinell

