



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Adriany Kaszuby
pt. „Nowe azolowe związki koordynacyjne platyny(II) i rutenu(II): synteza, charakterystyka
strukturalna i ocena potencjału przeciwnowotworowego”
promotor: prof. dr hab. Iwona Łakomska

Podstawa formalna opracowania recenzji

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi decyzja Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w sprawie wyznaczenia recenzenta w osobie prof. dr hab. Doroty Kołodyńskiej w postępowaniu doktorskim Pani mgr Adriany Kaszuby. Praca doktorska jest realizowana w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne.

Przedmiot recenzji i zawartość rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Adriany Kaszuby została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w ramach Szkoły Doktorskiej. Opiekę merytoryczną nad pracą sprawowała prof. dr hab. Iwona Łakomska - uznana liderka oraz wybitna ekspertka w dziedzinie chemii koordynacyjnej i bionieorganicznej, w szczególności w zakresie projektowania związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym.

Dokonując oceny rozprawy doktorskiej jako recenzent brałam pod uwagę nowatorski charakter badań i ich oryginalność, trafność wyboru problemu badawczego, metodologię wraz z doбором wykorzystanych metod i technik badawczych oraz poprawność interpretacji uzyskanych wyników z uwzględnieniem aktualnego stanu wiedzy.

Manuskrypt posiada układ typowy dla tego rodzaju opracowań i obejmuje: spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, część teoretyczną, a także część eksperymentalną zawierającą cel pracy, wykaz odczynników chemicznych, opis preparatyki, metodykę badań oraz charakterystykę wykorzystanej aparatury. Kolejne rozdziały poświęcono dyskusji wyników, którą zamykają podsumowanie i wnioski, a także omówienie dalszych perspektyw badawczych. Całość uzupełniają bibliografia oraz wykaz dorobku naukowego. Przedłożona do recenzji praca została przygotowana w języku polskim, w formie jednostronnego wydruku na arkuszach A4. Jej całkowita objętość wynosi 150 stron, z czego zasadnicza część rozprawy, obejmująca prezentację i analizę wyników badań, liczy 97 stron. Praca zawiera 55 rysunków oraz 30 tabel, a także bogaty zestaw starannie dobranych 191 pozycji literaturowych, stanowiących kompendium wiedzy w zakresie



poruszanej problematyki. W mojej ocenie dobór literatury jest w pełni wystarczający i umożliwia czytelnikowi właściwe zrozumienie istoty rozwiązań zaproponowanych w badaniach własnych.

Cel rozprawy i ocena stopnia jego osiągnięcia

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska dotyczy aktualnego i istotnego zagadnienia z pogranicza chemii koordynacyjnej oraz chemii medycznej, jakim jest poszukiwanie nowych związków o potencjalnym zastosowaniu przeciwnowotworowym, stanowiących alternatywę dla powszechnie stosowanych cytostatyków opartych na platynie(II). Pomimo szerokiego wykorzystania takich leków jak cisplatyna, karboplatyna oraz oksaliplatyna ich stosowanie wiąże się z licznymi ograniczeniami, w tym wysoką toksycznością względem zdrowych komórek oraz rozwijającą się opornością nowotworów, co uzasadnia potrzebę dalszych badań w tym obszarze.

Od szeregu lat wiadomo, że cisplatyna działa przede wszystkim przez uszkodzenie DNA komórek nowotworowych: po aktywacji w komórce tworzy kowalencyjne wiązania z zasadami purynowymi, głównie z guaniną, a to prowadzi do powstawania wewnątrz- i międzyłańcuchowych mostków DNA, zahamowania replikacji i transkrypcji oraz apoptozy. W praktyce cisplatyna „krzyżowo skleja” DNA komórek nowotworowych, przez co nie mogą się one prawidłowo namnażać i wchodzi na drogę apoptoz. Karboplatyna jest pochodną cisplatyny drugiej generacji i działa podobnie, ale zwykle jest lepiej tolerowana pod względem nefrotoksyczności. Po aktywacji w komórce reaguje z DNA, przez co blokuje jego syntezę i podziały komórkowe. W praktyce jej ważnym ograniczeniem bywa mielosupresja, a zwłaszcza trombocytopenia. W przypadku oksaliplatyny tworzą się addukty z DNA, szczególnie z guaniną i cytozyną, co zaburza replikację, transkrypcję i naprawę DNA i w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki. Należy dodać, że w/w związki nie tylko dezaktywują komórki nowotworowe, ale też uszkodzają tkanki prawidłowe, zwłaszcza te o dużej aktywności metabolicznej lub wysokiej ekspozycji na lek. Różnice toksyczności wynikają głównie z innej kinetyki aktywacji, dystrybucji do tkanek i zdolności do tworzenia konkretnych adduktów. Dlatego tematyka pracy wpisuje się w intensywnie rozwijany nurt badań nad nową generacją chemioterapeutyków, w szczególności kompleksów metali przejściowych o zmodyfikowanych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych. W tym kontekście szczególnie interesujące wydaje się wykorzystanie zarówno kompleksów platyny(II), jak i rutenu(II), które dzięki odmiennym mechanizmom działania oraz potencjalnie korzystniejszemu profilowi toksykologicznemu stanowią obiecującą alternatywę dla klasycznych terapii.

Opracowanie teoretyczne mgr Adrian Kaszuby przedstawia biologiczną aktywność związków koordynacyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem kompleksów platyny(II) stosowanych w terapii przeciwnowotworowej oraz przyczyn ich rozwoju badawczego. W tej części pracy omówiono właściwości triazoli, w tym ich aktywność przeciwnowotworową i zdolności koordynacyjne, które czynią je atrakcyjnymi ligandami. Kluczową część stanowi przegląd kompleksów platyny(II) z ligandami triazolowymi, obejmujący strategie zwiększania ich skuteczności, takie jak ograniczanie dezaktywacji przez glutation, sprzężanie z bioaktywnymi cząsteczkami oraz modyfikację mechanizmu działania.

W dalszej części zaprezentowano różnorodne typy tych kompleksów oraz ich potencjalne cele biologiczne. Na końcu omówiono związki rutenu(II) jako obiecującą alternatywę dla leków platynowych, w tym ich kompleksy z ligandami triazolowymi i bioaktywnymi cząsteczkami.

Głównym celem rozprawy było otrzymanie nowych azolowych kompleksów platyny(II) (osiem związków koordynacyjnych platyny(II) i trzech rutenu(II)), określenie ich struktury oraz ocena ich potencjału przeciwnowotworowego. Cel ten został sformułowany w sposób jasny i logiczny, a jego realizacja obejmowała zarówno syntezę nowych związków koordynacyjnych, jak i ich wszechstronną charakterystykę z wykorzystaniem nowoczesnych metod eksperymentalnych oraz obliczeń teoretycznych. W ramach pracy zsyntetyzowano bowiem szereg kompleksów platyny(II) o zróżnicowanej budowie, w tym układy $[PtCl_2(N\text{-donor})_2]$, $[PtCl_2(DMSO)(N\text{-donor})]$ oraz $[Pt(N\text{-donor})_2(ox)]$, jak również kompleksy rutenu(II) zawierające ligand aryłowy typu η^6 -biphenyl. Dobór ligandów azolowych oraz strategia syntezy wskazują na dobrze przemyślaną koncepcję badawczą, ukierunkowaną na modulowanie właściwości biologicznych otrzymanych związków.

Na szczególne podkreślenie zasługuje szeroki wachlarz zastosowanych metod badawczych w celu określenia czystości produktów oraz składu sfery koordynacyjnej i sposobu koordynacji ligandów w nowo otrzymanych związkach kompleksowych Pt(II) i Ru(II). Obejmuje on zarówno techniki spektroskopowe (1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{195}Pt NMR, IR), jak i analizę strukturalną z wykorzystaniem dyfrakcji rentgenowskiej XRD (5 monokryształów związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II)) oraz obliczeń DFT. Pozwoliło to na wiarygodne określenie geometrii sfery koordynacyjnej badanych kompleksów, odpowiednio płasko-kwadratowej dla związków platyny(II) oraz pseudooktaedrycznej dla kompleksów rutenu(II).

Istotnym elementem rozprawy są również badania biologiczne, obejmujące ocenę lipofilowości, reaktywności względem glutationu, aktywności cytotoksycznej oraz wpływu na cykl komórkowy i oddziaływanie z DNA. Tak kompleksowe podejście badawcze znacząco podnosi wartość pracy, umożliwiając wieloaspektową ocenę potencjału terapeutycznego otrzymanych związków.

Na podstawie przeprowadzonych badań wytypowano cztery związki koordynacyjne jako szczególnie obiecujące do przyszłego zastosowania jako leki przeciwnowotworowe. W porównaniu z cisplatyną wykazują one korzystniejsze właściwości, takie jak wyższa lipofilowość, obniżona reaktywność względem glutationu oraz mniejsza toksyczność wobec komórek prawidłowych, a także odmienny mechanizm działania. Dodatkowym atutem pracy jest uwzględnienie nowoczesnych strategii dostarczania leków, takich jak enkapsulacja w micelach polimerowych, co prowadzi do istotnej poprawy aktywności biologicznej badanych kompleksów.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma charakter interdyscyplinarny i aplikacyjny, wpisujący się w aktualny nurt badań nad projektowaniem nowoczesnych związków koordynacyjnych jako potencjalnych alternatyw dla klasycznych leków przeciwnowotworowych opartych na platynie(II). Praca obejmuje zarówno racjonalne projektowanie i syntezę nowych azolowych kompleksów platyny(II) i rutenu(II), jak i ich wszechstronną charakterystykę strukturalną z wykorzystaniem zaawansowanych

metod spektroskopowych, dyfrakcyjnych oraz obliczeń teoretycznych. Istotnym elementem dysertacji są również badania biologiczne, pozwalające na ocenę potencjału przeciwnowotworowego otrzymanych związków względem trzech ludzkich linii komórek nowotworowych: piersi (T47D), płuca (A549), jelita grubego (LoVo) oraz linii komórkowej prawidłowych mysich fibroblastów (BALB3T3), analizę ich mechanizmu działania oraz selektywności wobec komórek nowotworowych. Badania biologiczne obejmowały analizę zdolności do akumulacji wewnątrzkomórkowej zależnej pośrednio od lipofilowości kompleksów Pt(II) i Ru(II) i ich reaktywność wobec GSH, ocenę aktywności przeciwnowotworowej, określoną na podstawie badań cytotoksyczności i zdolności hamowania proliferacji komórek *in vitro* również po enkapsulacji w micelach kopolimerów Pluronic®, a także określenie mechanizmu działania, poprzez analizę wpływu na przebieg cyklu komórkowego i reaktywność względem DNA. Moim zdaniem, uwzględnienie strategii enkapsulacji w polimerowych układach nanonośnikowych znacząco podnosi wartość aplikacyjną pracy, wskazując na możliwość opracowania nowych, bardziej efektywnych i bezpieczniejszych chemioterapeutyków.

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska stanowi spójne i wartościowe opracowanie naukowe, podejmujące aktualny problem badawczy i prezentujące wysoki poziom merytoryczny oraz metodologiczny. Zakres przeprowadzonych badań oraz uzyskane wyniki wskazują na znaczący wkład Autorki w rozwój chemii koordynacyjnej o potencjalnych zastosowaniach medycznych.

Oryginalne osiągnięcia oraz znaczenie uzyskanych wyników

Biorąc pod uwagę analizę rozprawy doktorskiej najważniejszymi osiągnięciami Doktorantki, które w mojej opinii zasługują na wyróżnienie są:

- 1) fakt wytypowania ligandów organicznych zawierających w swojej strukturze pierścień triazolowy do badań nad mechanizmem działania przeciwnowotworowego oraz jego oddziaływania z inhibitowanymi enzymami tj. wykazanie dla kompleksów Pt1 i Pt3, że wymiana odchodzącego liganda chlorkowego na dikarboksylan prowadzi do wzrostu charakteru lipofilowego związków koordynacyjnych, a więc rzutuje na biodostępność w miejscu docelowego działania. Dla kompleksów Pt4, Pt5, Pt6 i Pt7 zaobserwowano zależność wartości logP od rodzaju ligandów nieodchodzących. Ponadto układy Pt4 i Pt5 z dwoma ligandami N-heterocyklicznymi wykazują wyższe logP niż Pt6 i Pt7 tj. zawierające DMSO. Obecność cząsteczki DMSO w sferze koordynacyjnej Pt(II) zmniejsza zatem lipofilowość kompleksów. Dla kompleksów Ru1, Ru2 i Ru3 stwierdzono korelację pomiędzy wartościami logP kompleksów Ru(II) a wielkością podstawników w 5,7-podstawionych triazolopirymidynach. Zwiększenie zawady przestrzennej liganda (dmtp>ibmtp>dptp) powoduje wzrost wartości współczynnika podziału logP oraz postawienie wniosku końcowego, że lipofilowość wszystkich przebadanych związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) znajduje się w zakresie uznawanym za korzystny z farmakologicznego punktu widzenia.

- 2) wykazanie, że nowo otrzymane związki kompleksowe Pt(II) charakteryzują się mniejszą reaktywnością względem glutationu niż cisplatyna. Z kolei mniejszym powinowactwem do GSH charakteryzują się kompleksy dikarboksylanowe niż dichlorkowe. Obecność dwóch ligandów N-heterocyklicznych w sferze koordynacyjnej sprzyja mniejszej dezaktywacji przez GSH niż w przypadku kompleksów z mieszaną sferą koordynacyjną typu N-donor i S-donor (DMSO).
- 3) wyselekcjonowanie obiecujących połączeń Pt(II) i Ru(II): Pt1 (*trans*-[PtCl₂(ffeo)₂]), Pt4 (*cis*-[PtCl₂(bffe)₂]), Pt8 ([Pt(bffe)₂(ox)]) i Ru2 ([(η^6 -bip)RuCl₂(dptp)]), których potencjał przeciwnowotworowy potwierdzono w badaniach cytotoksycznych i antyproliferacyjnych.
- 4) wykazanie znacznej poprawy cytotoksyczności kompleksów Pt1, Pt4 i Ru2 po ich zamknięciu w micelach Pluronic®P123.

Jak podkreśla sama Doktorantka uzyskane wyniki wpisują się w aktualne trendy badawcze dotyczące projektowania związków o zwiększonej selektywności wobec komórek nowotworowych, obniżonej toksyczności oraz ograniczonych skutkach ubocznych. Jednocześnie odpowiadają one na potrzebę opracowywania nowych mechanizmów działania, ukierunkowanych na poprawę skuteczności terapeutycznej oraz omijanie mechanizmów oporności na stosowane obecnie leki przeciwnowotworowe.

Uwagi o charakterze dyskusyjnym

Rozprawa doktorska przedstawiona do recenzji odpowiada przyjętym standardom. Pomimo wysokiej wartości naukowej rozprawy oraz szerokiego zakresu przeprowadzonych badań, w pracy można wskazać kilka kwestii wymagających doprecyzowania bądź dyskusji na którą liczę w trakcie obrony.

Autorka przedstawia wyniki badań biologicznych dla szeregu związków, to jednak interpretacja tych danych w kontekście wpływu konkretnych elementów strukturalnych (np. rodzaju liganda, obecności DMSO itd.) na obserwowaną aktywność przeciwnowotworową mogłaby zostać rozszerzona. W pracy wskazano, że wytypowane związki, a w szczególności Pt1, Pt4, Pt8 oraz Ru2 wykazują mechanizm odmienny od cisplatyny i nie oddziałują bezpośrednio z DNA. Jednak nie zaproponowano jednoznacznej hipotezy alternatywnego mechanizmu oprócz oddziaływań enzymatycznych. Warto byłoby rozważyć możliwe cele molekularne, takie jak białka, mitochondria czy szlaki redoks, co pozwoliłoby lepiej osadzić uzyskane wyniki w szerszym kontekście biologicznym.

Moim zdaniem porównanie aktywności otrzymanych kompleksów z innymi znanymi związkami platyny(II) i rutenu(II) o podobnej strukturze umożliwiłoby pełniejszą ocenę ich potencjału aplikacyjnego. Czy rozważane było podejście w kontekście badań biologicznych związane z rozszerzeniem zakresu testowanych linii komórkowych? Zastosowanie większej liczby modeli nowotworowych, w tym linii opornych na cisplatynę, mogłoby dostarczyć dodatkowych, istotnych informacji na temat skuteczności badanych związków. Ciekawe jest także zagadnienie związane ze stabilnością badanych kompleksów w warunkach fizjologicznych. Informacje dotyczące ich trwałości w środowisku wodnym lub w obecności

biomolekuł byłyby cennym uzupełnieniem pracy, szczególnie w kontekście potencjalnych zastosowań medycznych. W związku z powyższym nasuwają się następujące pytania do Doktorantki:

- ✓ Jakie konkretne elementy strukturalne badanych kompleksów mają kluczowy wpływ na obserwowaną aktywność przeciwnowotworową?
- ✓ Czy można zaproponować bardziej szczegółowy mechanizm działania wytypowanych związków, w szczególności w kontekście ich ograniczonego oddziaływania z DNA?
- ✓ Jak oceniana jest stabilność badanych kompleksów w warunkach zbliżonych do fizjologicznych?
- ✓ Czy planowane są dalsze badania *in vivo* lub rozszerzenie testów biologicznych o dodatkowe linie komórkowe, w tym modele oporności na cisplatinę?
- ✓ W jaki sposób enkapsulacja w micelach polimerowych wpływa na biodostępność oraz mechanizm działania badanych kompleksów?

Pytania te mają charakter uzupełniający i nie umniejszają wysokiej wartości naukowej rozprawy, a ich uwzględnienie mogłoby dodatkowo podnieść znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników. Oczywiście jak każdemu czytelnikowi nasuwają się także pewne uwagi o charakterze redakcyjny. Przy wysokim poziomie opracowania, jedynie w niektórych fragmentach można dostrzec drobne nieścisłości językowe oraz sporadyczną niekonsekwencję zapisu. Nie mają one istotnego wpływu na całościową ocenę pracy. Dlatego przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Świadczy ona o solidnej i ugruntowanej wiedzy teoretycznej Kandydatki w reprezentowanej dyscyplinie naukowej. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu badawczego z obszaru chemii medycznej, ukierunkowanego na projektowanie i charakterystykę nowych związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej. Jednocześnie podejmuje zagadnienia o wyraźnym znaczeniu aplikacyjnym, gdyż uzyskane wyniki mogą przyczynić się do rozwoju skuteczniejszych i bardziej selektywnych leków antynowotworowych oraz lepszego zrozumienia mechanizmów ich działania.

Na szczególne wyróżnienie zasługuje również przejrzyste, uporządkowane i syntetyczne zaprezentowanie uzyskanych wyników wraz z ich wnikliwą interpretacją i rzetelną dyskusją, co znajduje odzwierciedlenie m.in. w dorobku publikacyjnym Doktorantki, obejmującym współautorstwo 3 artykułów naukowych z bazy JCR (Dalton Transactions, Polyhedron, International Journal of Molecular Sciences), 1 pracy w druku (Dalton Transactions), 1 patentu (PL 449369 A1), 7 prac w recenzowanych materiałach konferencyjnych. W większości z tych opracowań jest Ona pierwszą autorką - zapewne z wiodącym udziałem. Aktywnie uczestniczyła także w krajowych i międzynarodowych konferencjach, na których prezentowała 6 wystąpień ustnych i 12 posterowych. Odbyla także krótkoterminowe staże naukowe na Uniwersytecie Jagiellońskim, 1-miesięczny staż na Uniwersytecie w Pizie, praktyki zawodowe w firmach branżowych. Na podstawie zawartych w pracy doktorskiej informacji należy podkreślić zaangażowanie Doktorantki w pozyskiwanie finansowania na działalność naukową. Mgr Adriana Kaszuba uzyskała prestiżowe wsparcie międzynarodowe (NAWA PROM oraz grant STSM w ramach COST Action), co potwierdza Jej zaangażowanie w rozwój współpracy zagranicznej i mobilności naukowej. Dodatkowo skutecznie aplikowała o środki krajowe i wewnętrzne, w tym grant dla młodych naukowców oraz

minigranty szkoły doktorskiej. Aktywnie uczestniczyła w działalności organizacyjnej i szkoleniowej. Świadczy to o Jej samodzielności, inicjatywie oraz umiejętności planowania i realizacji badań. Co istotne, wykazuje również znaczące zaangażowanie dydaktyczne, prowadząc zajęcia i wspierając proces kształcenia studentów.

Wniosek końcowy

Biorąc powyższe pod uwagę oraz fakt, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wykonana przez mgr Adrianę Kaszubę w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki chemiczne, w mojej opinii w pełni spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dn. 20.07.2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.Ust. 2020 poz. 85 z późn. zm.) stawiam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Adriany Kaszuby do dalszych etapów przewidzianych niniejszą procedurą. Jednocześnie, uwzględniając wysoki poziom merytoryczny rozprawy, oryginalność i znaczenie uzyskanych wyników, a także ich potwierdzoną wartość naukową wyrażoną publikacjami w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu, wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne UMK o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Lublin, 20.04.2026 r.

