

Dr hab. inż. Magdalena Urbala, prof. ZUT
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Materiałów Polimerowych
Al. Piastów 42
71-065 Szczecin
mu@zut.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. ***"Badania nad syntezą i działaniem potencjalnych, bioaktywowalnych środków kontrastowych do MRI opartych na kompleksach żelaza(III)"***

autorstwa **Pani mgr inż. Marzeny Wyskockiej-Gajdy**

zrealizowanej pod kierunkiem dr. hab. inż. Nikodema Kuźnika, prof. PŚ jako promotora, w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Politechniki Śląskiej w Gliwicach.

Recenzja została przygotowana na wniosek Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej prof. dr hab. inż. Doroty Neugebauer (pismo l.dz.RDNCh/SD/68/2020)

Sylwetka Doktorantki

Pani mgr inż. Marzena Wyskocka-Gajda od początku jest związana z dziedziną chemii organicznej i bioorganicznej. Jest absolwentką Liceum Ogólnokształcącego nr 4 przy Zespole Szkół nr 1 w Tychach o profilu chemiczno-farmaceutycznym. W 2012 roku na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach ukończyła studia magisterskie inżynierskie na kierunku chemia o specjalności chemia bioorganiczna; procesy biochemiczne. Pracę dyplomową magisterską pt. „*Syntetyczne kompleksy żelaza(III)*” wykonała pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Jerzego Suwińskiego. W tym samym roku rozpoczęła Studia Doktoranckie na rodzimym wydziale, na którym realizowała pracę doktorską pod kierunkiem dr. hab. inż. Nikodema Kuźnika, prof. PŚ, pod tytułem jak wyżej. Swoją pracę naukowo-zawodową Doktorantka związała z edukacją (obecnie jest nauczycielem chemii i fizyki w klasach 7 i 8 w szkole podstawowej), ale w trakcie realizacji doktoratu w 2010 roku odbyła miesięczną praktykę w Zakładzie Chemii Molekularnej w Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, co jest istotne z punktu widzenia tematyki rozprawy doktorskiej.

Wybór tematyki rozprawy doktorskiej

Badania Doktorantki przeprowadzone w ramach przewodu doktorskiego dotyczą aktualnej tematyki badawczej, związanej z projektowaniem środków kontrastowych (ŚK), stosowanych w medycznej technice diagnostycznej obrazowania magnetyczno-rezonansowego (MRI).

Uzasadnienie podjęcia tego tematu składa się z kilku ważnych elementów. Po pierwsze metoda obrazowania MRI jest jedną z popularnych, efektywnych i nieinwazyjnych technik diagnostycznych, wykorzystywanych do wykrywania np. tkanek nowotworowych. Po drugie handlowe preparaty kontrastujące na bazie kompleksów gadolinu wykazują stosunkowo wysoką toksyczność i negatywny wpływ na środowisko, a sam gadolin został zaliczony do grupy pierwiastków krytycznych, co ma niebagatelne znaczenie z punktu widzenia idei

zrównoważonego rozwoju. Co więcej, obecnym trendem w projektowaniu środków kontrastowych jest wykorzystanie tanich i powszechnie dostępnych pierwiastków endogennych tj. miedzi, manganu, a zwłaszcza żelaza, którego rola i biochemia w organizmie jest stosunkowo dobrze poznana. Ważna jest także możliwość kontroli aktywacji ŚK za pomocą czynników zewnętrznych, tj. zmiany pH (szczególnie ważne w diagnostyce komórek nowotworowych), temperatury czy obecności enzymów hydrolizujących, innymi słowy rozwoju tzw. inteligentnych ŚK (ang. *Smart Contrast Agents*, SCA).

Zatem, obecnie niezmiernie ważne jest poszukiwanie nowych lub modyfikacja znanych kompleksów metaloorganicznych na bazie żelaza, które będą wykazywały odpowiednie właściwości fizyczne (np. relaksacyjność, możliwość aktywacji za pomocą zdefiniowanych czynników, łatwość koordynacji ligandów, w tym cząsteczek wody) i jednocześnie będą nietoksyczne lub mało toksyczne dla organizmu. Z punktu widzenia syntetycznego istotne są zagadnienia łatwego dostępu i ceny bazy surowcowej, a także sposobu prowadzenia poszczególnych reakcji z uwzględnieniem zasad zielonej chemii.

I w tym kontekście wybór tematyki i założeń badawczych doktoratu jest niezwykle trafny, bowiem badania ukierunkowane były na otrzymanie pentadentatnych amino-fenolowych (*N,O*-chelatowych) kompleksów żelaza(III), które jako inteligentne środki kontrastowe mogą stanowić atrakcyjną alternatywę do obecnie funkcjonujących na rynku kontrastów gadolinowych. Tematyka pracy jest konsekwentnie omawiana i realizowana w treści rozprawy. Warto podkreślić także interdyscyplinarność badań mieszczących się w obszarze badań podstawowych i badań aplikacyjnych.

Struktura i strona edytorska rozprawy

Opiniowana rozprawa doktorska liczy 184 strony maszynopisu w języku polskim. Tytuł rozprawy został sformułowany poprawnie i odpowiada przedstawionym w ramach pracy rezultatom badań. Dysertacja składa się z sześciu typowych głównych części zatytułowanych *Wprowadzenie i cel pracy*, *Przegląd literaturowy*, *Badania własne*, *Podsumowanie i wnioski*, *Część eksperymentalna* i *Bibliografia*. Pracę rozpoczyna *Spis treści* oraz *Wykaz skrótów i oznaczeń* (zawierający najważniejsze skróty i oznaczenia pojawiające się w pracy). Co nietypowe dla dysertacji tego typu, niniejsza rozprawa nie zawiera *Streszczenia* (streszczenie rozprawy doktorskiej napisane w języku polskim i angielskim zostało załączone do pisma przewodniego). Brakuje także *Spisu rysunków* (których w pracy jest aż 103) oraz *Spisu tabel* (w sumarycznej liczbie 35), co ułatwiałoby poruszanie się po obszernej treści rozprawy.

Mimo tych drobnych uchybień, zaprezentowana struktura pracy w pełni odpowiada oczekiwaniom stawianym pracom doktorskim, a jej strona edytorska nie budzi większych zastrzeżeń. Rozprawa napisana jest starannie, poprawnym językiem, bogato zobrazowana imponującą ilością rysunków, zawierających wzory opisywanych związków, schematy zjawisk, reakcji, zdjęć czy wykresów, które dopełniają przedstawianą treść i wskazują na łatwość poruszania się Doktorantki w podjętej przez siebie tematyce badawczej. Jednakże czytając pracę, szczególnie część *Badania własne* i *Część eksperymentalną* nie sposób oprzeć się wrażeniu pewnego pośpiechu przy jej pisaniu – nagle Autorka zaniechała cytowania w tekście przedstawianych rysunków (począwszy od Rysunku 43) i tabel (począwszy od Tabeli 10). Przywołanie rysunków w tekście pojawia się dopiero na stronie 79 pracy i jest to przywołanie błędne, ponieważ rysunek otrzymuje numer 17, mimo iż nie dotyczy on Rysunku 17 przedstawionego na str. 39 pracy, a poprzedzającym go jest Rysunek 58 (podobna sytuacja zdarza się także na str. 41 i ponownie na str. 86 – Rysunek 20). W dalszej części rozprawy Autorka

wskazuje, który fragment tekstu jest zobrazowany rysunkiem, ale jest to nadal działanie chaotyczne i niekonsekwentne. Co więcej, pojawiają się schematy bez podpisu (str. 80) i z drugiej strony tekst z przywołanymi rysunkami, np. „*Poniżej przedstawiono przykładowe chromatogramy uzyskane w czasie prowadzenia hydrolizy enzymatycznej dla liganda 7a.*”(str. 130), których nie zawarto. Co bardziej istotne dla oceny merytorycznej pracy, w tych fragmentach pojawiają się pewne nielogiczności i niezręczności językowe, które utrudniają płynność czytania pracy i pełne zrozumienie jej treści (te aspekty zostały przedstawione w dalszej części recenzji).

Bibliografia stanowi 184 pozycje stanowiące publikacje (głównie w uznanych czasopismach o cyrkulacji międzynarodowej), pozycje monograficzne (książki, dysertacje), patenty i odnośniki do stron internetowych. Dobór cytowanej literatury świadczy o doskonałej orientacji Autorki w reprezentowanej dziedzinie wiedzy. Brakuje nieco bieżącej literatury z ostatnich 5 lat, która z pewnością wzbogaciłaby zakres merytoryczny recenzowanej pracy. Dodatkowo Doktorantka wprowadziła 8 przypisów literaturowych, które przywołała w części *Wprowadzenie i cel pracy*.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Marzena Wyskocka-Gajda postawiła sobie ambitny cel zaprojektowania nowych stabilnych i biokompatybilnych kompleksów żelaza(III) o odpowiednich właściwości magnetycznych (wysokiej relaksacyjności), których strefa koordynacyjna będzie sterowana za pomocą enzymów, dzięki czemu kompleksy te mogą być zaliczone do grupy inteligentnych środków kontrastowych. Należy w tym miejscu podkreślić, że badania aplikacyjne otrzymanych kompleksów były realizowane we współpracy z Uniwersytetem w Osace (Japonia). Ponadto, wyniki prac badawczych zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych (np. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *Arabian Journal of Chemistry*, *International Journal of Nanomedicine*, *European Journal of Inorganic Chemistry*), co jasno wskazuje na ich wysoki poziom merytoryczny i tym samym recenzowanej rozprawy.

W pierwszych rozdziałach pracy Autorka jasno, czytelnie i, co ważniejsze przekonywująco przedstawiła najważniejsze aspekty podjętej tematyki badawczej z podkreśleniem znaczenia aplikacyjnego. W tym kontekście, zarówno w części *Wprowadzenie i cel pracy*, jak i części *Przegląd literaturowy* Doktorantka na 56 stronach w bardzo systematyczny i wyczerpujący sposób opracowała stan wiedzy odnośnie techniki MRI – jej podstaw fizycznych oraz stosowanych środków kontrastowych. Wnikliwie przeanalizowała czynniki wpływające na powstawanie obrazu MR, ze szczególnym podkreśleniem czasu relaksacji. Następnie szeroko przedstawiła obecnie stosowane gadolinowe środki kontrastujące, należące do grupy tzw. pozytywnych ŚK (zebrane w Tabeli 2), ze szczegółowym omówieniem mechanizmu ich działania na poziomie molekularnym i analizą aspektów ich budowy chemicznej, co jest istotne dla poprawnego projektowania przyszłych kompleksów. Dalej, wymieniając niedoskonałości układów na bazie gadolinu, Autorka omówiła niegadolinowe ŚK (Tabela 6), w tym także te wycofane z rynku i będące w fazie badań, co wskazuje na wszechstronność i dojrzałość Doktorantki w dyskusji wyników badań literaturowych. Podobnie wnikliwie i systematycznie potraktowane zostały potencjalne ŚK na bazie żelaza (podrozdział 2.6), a zwłaszcza struktury ligandów, które są brane pod uwagę przy ich projektowaniu. Tę część rozprawy zamyka rozdział poświęcony inteligentnym ŚK i badanym obecnie kompleksom aktywowanym enzymatycznie, szczególnie przez β -galaktozydazę. Pozwala to w pełni ocenić duży wkład Doktorantki w rozwój tego obszaru chemii organicznej, chemii koordynacyjnej, a także radiologii. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę, że pomimo iż tematem dysertacji była także synteza ŚK, to ten aspekt nie został poruszony w tej części

dysertacji, ale przedstawiony w kolejnej – pt. *Badania własne* – przy prezentowaniu wyników syntezy konkretnych układów żelaza(III) z wytypowanymi ligandami i ich aktywacji enzymatycznej.

Dokonany przegląd literaturowy był podstawą do zdefiniowania hipotezy badawczej i sposobu jej realizacji, która została przedstawiona w rozdziale 3.1 w części *Badania własne* (a także przywołana wyżej w niniejszej recenzji przy podaniu celu pracy). Powołując się na schematyczne przedstawienie idei prowadzonych badań z wyszczególnieniem etapów syntezy (Rysunek 41) Doktorantka podkreśla pionierski charakter koncepcji, przy czym nie wyjaśnia na czym on polega? Co więcej, na Rysunku 41 zamieszczono etapy syntezy jednej grupy otrzymanych kompleksów żelaza(III) z pominięciem tych syntetyzowanych w reakcji Katritzky'ego - dlaczego? Analogicznie, dlaczego na schemacie koncepcyjnym nie zostały zawarte badania aplikacyjne przydatności kompleksów jako ŚK, czyli ich relaksacyjności, efektu kontrastowego, cytotoksyczności?

Te niedociągnięcia nie umniejszają mojej wysokiej oceny merytorycznej wykonanych prac syntetycznych i aplikacyjnych. Część badawcza, stanowiąca najważniejszy i najobszerniejszy fragment rozprawy, zawiera aż 10 podrozdziałów, w których szczegółowo uzasadniono sposób i omówiono wykonanie syntez (1) wytypowanych dipodstawionych alkanodiamin (Etap 1), jako substratów do otrzymania (2) pentadentatnych ligandów amino-fenolowych (Etap 2), następnie (3) ich funkcjonalizacji w reakcji aminowania redukcyjnego i reakcji Katritzky'ego za pomocą zsyntetyzowanego 4-[1-β-D-(2,3,4,6-tetra-O-acetylogalaktozylo)]benzaldehydu jako fragmentu bioaktywowalnego enzymatycznie (Etap 3), i (4) dalszej funkcjonalizacji poprzez deprotekcję grup hydroksylowych galaktozy, aż (5) do momentu reakcji ich kompleksowania z jonami Fe³⁺, przy czym reakcji kompleksowania podano zarówno wyjściowe ligandy, jak i ich funkcjonalizowane pochodne. W dalszych podrozdziałach przedstawione zostały wyniki badań aplikacyjnych otrzymanych kompleksów, tj. relaksacyjności, różnicy w kontraście obrazu MRI (pomiarzy fantomowe) i cytotoksyczności. Wszystkie prace badawcze zostały rzetelnie wykonane, zebrane w postaci schematów, tabel czy wykresów i przedyskutowane z danymi literaturowymi. Należy podkreślić, że szeroki zakres badań i ich wysoki stopień skomplikowania wymagały od Doktorantki ogromnego zaangażowania w prowadzenie prac doświadczalnych. Ważne jest także to, że w pracach syntetycznych Autorka wykorzystała dobrze znane metody syntezy, które modyfikowała kierując się zasadami zielonej chemii. Tam gdzie to możliwe wprowadzała metodologię one-pot, rezygnowała z ogrzewania mieszanin reakcyjnych lub bardzo niskich temperatur rzędu -78°C na rzecz temperatury pokojowej reakcji i bardziej łagodnych temperatur ujemnych. Wykonała także wstępne optymalizacje warunków reakcyjnych, poszukując jak najlepszych wartości wydajności i/lub selektywności reakcji. Takie podejście laboratoryjne jest dobrze widziane nie tylko przez chemików organicznych, ale także technologów, co ważne dla potencjalnych wdrożeń opracowywanych związków jako ŚK. Co ciekawe, Doktorantka przedstawiła także wyniki badań, które nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, a które także są wartościowe z punktu widzenia opracowywanych metod syntezy nowych związków (np. podrozdział 3.3.1.). Do monitorowania przebiegu reakcji wykorzystano głównie metody chromatograficzne (chromatografia cienkowarstwowa, kolumnowa, cieczowa), a struktury otrzymanych produktów potwierdzano metodami spektroskopowymi, głównie ¹H i ¹³C NMR, MS, IR, UV-Vis, oraz za pomocą analizy elementarnej i wartości temperatury topnienia. Tak szeroki wachlarz wykorzystanych metod, których wyniki są adekwatnie do otrzymanych rezultatów i wnikliwie dyskutowane w pracy, świadczy o dobrym warsztacie badawczym Pani mgr Marzeny Wyskockiej-Gajdy.

Nieco słabszą stroną przedstawienia wyników tych bardzo szerokich badań jest, wspomniana wyżej, pewna nielogiczność i niekonsekwencja. Dla przykładu w podrozdziale 3.4. Autorka opisuje wyniki funkcjonalizacji atomu azotu II-rzędowego otrzymanych ligandów amino-fenolowych, przy czym najpierw omawia metodę reakcji Katritzky'ego, w wyniku której otrzymała ligandy dodatkowo rozbudowane o cząsteczkę azoli, po czym wraca do wcześniej prezentowanej metody aminowania redukcyjnego i, co więcej, podstawowych ligandów *N,O*-chelatowych, otrzymanych w poprzedzającym podrozdziale 3.3.2. Analogiczna sytuacja ma miejsce w przypadku rozdziału 3.7 pt. *Pomiary relaksacyjności otrzymanych kompleksów* i rozdziału 3.8 pt. *Bioaktywacja*. Przedstawienie wyników relaksacyjności sugeruje przejście w kierunku badań aplikacyjnych. Z kolei, bioaktywacja funkcjonalizowanych ligandów i kompleksów z obszernym opisem wyników aktywności enzymu, przebiegu reakcji hydrolizy enzymatycznej i jej kinetyki jest powrotem do aspektów syntetycznych. Co więcej, umieszczenie gdzieś pośrodku rozdziału 3.8 pomiarów relaksacyjności kompleksów, pomiędzy dyskusją nad mechanizmem reakcji a badaniami kinetycznymi, nie jest moim zdaniem właściwe, ponieważ sprawia, że czytający ma poczucie chaosu. Podobnie pewien dyskomfort sprawia wprowadzony sposób oznaczeń otrzymywanych związków w standardowej postaci „liczba + litera/litery”. Na początku z powodu pewnej systematyczności nie budzi on większych zastrzeżeń (dla związków **3a-h**), ale już przy opisie np. ligandów amino-fenolowych (związki **4a-g**), ich funkcjonalizowanych pochodnych (związki **7a**, **7b**, **7e**, **7f**), czy kompleksów, sprawa nie jest tak prosta (np. Rysunek 56, Rysunek 78, Rysunek 81). Wymaga bowiem od czytającego dużo większej uwagi, a czasem samodzielnego wydedukowania z jakich wybranych substratów przywołane związki powstały, ponieważ Autorka nie wprowadza czytelnika które związki wybrała do dalszych etapów syntezy docelowych kompleksów i dlaczego właśnie te? Pewnym usprawiedliwieniem może być duża liczba testowanych związków i wieloetapowość syntez, wymuszająca stopniowe zawężanie badanych układów, ale z drugiej strony wskazuje to na konieczność dobrego opracowania pełnego ogólnego schematu realizowanych prac badawczych, ułatwiającego zrozumienie sposobu realizacji prac doświadczalnych (Rysunek 41).

Część badawczą rozprawy wieńczy krótkie podsumowanie i wyszczególnienie szeregu wniosków ogólnych, w których Doktorantka potwierdziła słuszność stawianej hipotezy. Potwierdzają one trafność i zasadność przeprowadzonych kompleksowych badań, a przede wszystkim profesjonalizm Doktorantki w formułowaniu i rozwiązywaniu postawionych problemów badawczych. Jednakże, z punktu widzenia prac naukowych istotne jest podkreślenie nowości naukowych. A zatem, które docelowe kompleksy żelaza(III) są związkami nowymi i które byłyby najlepsze do dalszych badań aplikacyjnych i biologicznych?

W rozdziale 6 pt. *Część eksperymentalna* Autorka opisuje stosowane odczynniki, ogólnie techniki i metody analityczne i metodyki prowadzenia syntez oraz zestawia dane charakteryzujące otrzymane produkty. Ponadto, część wyników eksperymentalnych została zamieszczona w części *Badania własne*, co nie jest powszechnie spotykaną praktyką (np. Tabela 29 *Czasy retencji HPLC związków poddawanych hydrolizie oraz potencjalnych produktów hydrolizy*). Nie mam zastrzeżeń merytorycznych do tego fragmentu dysertacji, szczególnie, że większość wyników pracy została opublikowana w prestiżowych czasopismach naukowych. Nie mniej jako recenzent nie mogę nie dostrzec braku zamieszczenia niektórych danych spektroskopowych np. dla związków **3e**, **3bb**, **3ca**.

Ponadto, jak wspomniałam wcześniej, w pracy można znaleźć szereg drobnych błędów czy lapsusów językowych, które nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną pracy, ale jednak powinny być wymienione w recenzji, np.

- str. 54: „*Aby zaprzestać tej technice można wykorzystać...*” – nie umiem wskazać propozycji poprawnego sformułowania tego zdania;
- str. 69, Rysunek 46: niewłaściwa kolejność prezentowania związków: **3a**, **3b**, **3h**, **3g**, **3c**, **3d**, **3e**, **3f**;
- str. 75: „*Otrzymanie N,N'-bis(2-hydroksy-1-naftylometylo)etylenodiaminy*” – raczej N,N'-bis(2-hydroksy-1-naftylometylo)etanodiaminy;
- str. 78, Rysunek 57: niejasny schemat reakcji i mylące nadanie symboli produktów reakcji, tj. **4b** – produkt główny, **4a** - produkt uboczny;
- str. 91, Rysunek 68 „*Schemat reakcji otrzymywania w metodą Hasserotha*” – w podpisie brakuje nazwy produktu;
- str. 110, Rysunek 89: brak określenia wartości *n*, tj. liczby grup metylenowych we wzorach prezentowanych związków;
- str. 123: „*Próbki do analizy postępu reakcji pobierano w 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minucie reakcji...*” – raczej: Do zbadania/określenia stopnia postępu reakcji próbki pobierano po upływie....

Ocena końcowa rozprawy doktorskiej

Konkludując stwierdzam, że moja ocena badań naukowych przeprowadzonych w ramach przewodu doktorskiego Pani mgr inż. Marzeny Wyskockiej-Gajdy jest zdecydowanie pozytywna. Doktorantka podjęła aktualną tematykę badawczą, posiada szeroką wiedzę w dziedzinie syntezy kompleksów żelaza(III) jako użytecznych w technice MRI inteligentnych środków kontrastowych, wykazała wysokie kompetencje i umiejętności w prowadzeniu kompleksowych i interdyscyplinarnych badań naukowych, posiadających nie tylko wymiar badań podstawowych ale także, co bardzo istotne, aplikacyjnych.

Przedstawione wyniki badań własnych uważam za bardzo wartościowe, ciekawe i wnoszące istotny wkład do nauk chemicznych. Dlatego nie jest zaskoczeniem, że rezultatem tych prac badawczych są publikacje naukowe w prestiżowych czasopismach tj. *European Journal of Medicinal Chemistry* (w której Doktorantka jest pierwszym autorem), *Arabian Journal of Chemistry*, *International Journal of Nanomedicine*, *European Journal of Inorganic Chemistry*) oraz przeglądowa praca w rodzimych *Wiadomościach chemicznych*. Z drugiej strony, zważywszy na zawarte w pracy nowości naukowe, a szczególnie te o charakterze aplikacyjnym, pewien mój niedosyt budzi brak zastrzeżeń patentowych czy patentów. Pani mgr inż. Marzena Wyskocka-Gajda prezentowała wyniki swoich badań na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych oraz ogólnoakademickich seminariach i sympozjach, a także była stypendystką projektu „*Stypendia doktoranckie – inwestycja w kadrę naukową województwa opolskiego*” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej.

Wobec powyższego stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr inż. Marzeny Wyskockiej-Gajdy spełnia zwyczajowe oraz ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim i rekomenduję dopuszczenie Pani mgr inż. Marzeny Wyskockiej-Gajdy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med.
Antoni