

Załącznik 2

AUTOREFERAT W JĘZYKU POLSKIM

1. **Imię i Nazwisko:** Agnieszka Chylewska (Łapińska)
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

Przebieg rozwoju naukowego

- 2000 – 2004** studia magisterskie, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (zrealizowane w trybie 4-letnim)
- 2004** tytuł zawodowy **magistra nauk chemicznych**, Wydział Chemii UG
Tytuł pracy: „*Porównanie kinetyki i mechanizmów reakcji wychwytu rodnika tlenku azotu (IV) przez jon koordynacyjny typu: cis-[Cr(C₂O₄)(L-L)(OH₂)₂]⁺, gdzie L-L oznacza pirydoksaminy i histaminę, przy użyciu metody zatrzymanego przepływu.*” (praca otrzymała wyróżnienie w konkursie OG PTChem)
- 2004-2008** Studia doktoranckie, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
- 2008** stopień **doktora nauk chemicznych w zakresie chemii**, Wydział Chemii UG
Tytuł rozprawy: „*Synteza i badania właściwości fizyko-chemicznych modelowych układów Cr(III) i Co(III) z biologicznie aktywnymi ligandami*” (rozprawa została wyróżniona w konkursie OG PTChem)
- 2013** **menedżer badań naukowych i prac rozwojowych** (*studia podyplomowe*) MBN/13/G-Gdańsk w ramach projektu *Europejskiego Funduszu Społecznego*, Wyższa Szkoła Ekonomii i Innowacji w Lublinie

Wydarzenia/ Urlopy Specjalne

- 2006** zmiana nazwiska z Łapińska na Chylewska
- 11.2008 – 04.2009** 5-miesięczny urlop macierzyński (pierwszy)
- 01.2013 – 01.2014** 12-miesięczny urlop macierzyński i rodzicielski (drugi)

Dodatkowe umiejętności

- 2017 **patent strzelecki** na uprawianie sportu strzeleckiego w dyscyplinach: pistolet, karabin, strzelba gładkolufowa (Nr E001659)
- 2014 **patent motorowodnego sternika morskiego** (Nr 010836) uprawniający do prowadzenia jachtów motorowych po wodach śródlądowych; prowadzenia jachtów motorowych o długości kadłuba do 18 m po wodach morskich
- 2011 roczny **kurs Dydaktyki Akademickiej**, Gdańsk, Polska
- 2007 **szkolenie** z zakresu obsługi dyfraktometru Ruby CCD oraz prowadzenia pomiarów krystalograficznych kryształów firmie Oxford Diffraction, Oxford, Anglia

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

Zatrudnienie

- 2005 – 2007 **nauczyciel chemii** w Szkole Podstawowo-Gimnazjalnej II STO w Gdańsku
- 2007 – 2008 **asystent** w Katedrze Chemii Ogólnej i Nieorganicznej
- 2008 – 2013 **adiunkt** w Katedrze Chemii Ogólnej i Nieorganicznej
- od 2014 **adiunkt** w Katedrze Chemii Bionieorganicznej
- od 09.2018 **Kierownik Pracowni Oddziaływań Międzycząsteczkowych** w obrębie Katedry Chemii Bionieorganicznej Wydziału Chemii UG – decyzją Rady Wydziału Chemii UG z dnia 26.09.2018 r.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

„Znaczenie modyfikacji profili bionieorganicznych aromatycznych związków azotowych powstałych wskutek kompleksowania z jonami metali bloku d”

b) cykl publikacji powiązanych tematycznie składających się na osiągnięcia naukowe opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie JCR

W 7 pracach składających się na osiągnięcie naukowe występuję w roli pierwszego Współautora, a w 9 z nich jestem Autorką korespondencyjną.

* - oznaczenie autora do korespondencji

IF – podano wg JCR zgodnie z aktualnie obowiązującymi wskaźnikami: 2017 (5-letni)

cyt. = liczba cytowań wg Web of Science z dnia 18.02.2019

L.p.

- H1 A. Chylewska*, M. Biedulska, P. Sumczyński, M. Makowski
„Metallopharmaceuticals in therapy – a new horizon for scientific research”
Current Medicinal Chemistry, **25**: 1729-1791; 2018 (Bentham Science, 63 strony)
IF = 3,469 (3,519) cyt. 1 **PRACA PRZEGLĄDOWA**

Udział własny: 50%; wysłanie do czasopisma propozycji (inicjatywa własna) koncepcji publikacji przeglądowej; wykonanie przeglądu literaturowego obejmującego okres ostatnich 20 lat z zakresu tematyki pracy; wykonanie pełnej grafiki publikacji obejmującej rysunki, schematy, wykresy oraz abstrakt graficzny; pisanie znacznej części manuskryptu dotyczącej właściwości kompleksów jonów metali; przygotowanie i wysyłka artykułu; prowadzenie korespondencji z edytorem; redagowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; przygotowanie analizy opisowej dotyczącej pozytywnego wyniku raportu antyplagiatowego publikacji.

- H2 A. Chylewska*, M. Ogryzek, R. Hałasa, A. Dąbrowska,
L. Chmurzyński, M. Makowski
„Coordination mode and reactivity of nickel(II) with vitamin B₆”
Journal of Coordination Chemistry, **67**: 2885-2897; 2014 (Taylor & Francis, 13 stron)
IF = 1,703 (1,390) cyt. 5

Udział własny: 60%; opracowanie koncepcji pracy; zaplanowanie, wykonanie, opracowanie wyników badań spektroskopowych i potencjometrycznych obrazujących sposób oraz siłę koordynowania dwóch witamerów B₆: pirydoksaminy (PM) i pirydoksalu (PL) względem centrum metalicznego stanowiącego jon niklu(II); wykonanie pełnej grafiki publikacji (komplet rysunków, schematów i wykresów oraz abstrakt graficzny do pracy); bezpośrednie nadzorowanie pozostałych badań prezentowanych w publikacji; wykonanie analiz, obliczeń chemicznych i interpretacja wyników; pisanie manuskryptu i przygotowanie artykułu do wymogów czasopisma, prowadzenie korespondencji z edytorem, wysyłka i redagowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- H3** A. Chylewska*, M. Biedulska, M. Makowski
„Multi-analytical studies about physico-chemical properties of Ni(II)-vitamin B₆ coordination compounds and their CT-DNA interactions”
Journal of Molecular Liquids, **243**: 771-780; 2017 (Elsevier, 10 stron)
IF = 4,513 (3,929) cyt. 1

Udział własny: 70%; opracowanie koncepcji pracy; zaprojektowanie oraz wykonanie syntezy jak i kolejnych resyntezy kompleksu jonu Ni(II) z pirydoksamina (PM) jako związku do badań fizykochemicznych; zaplanowanie, wykonanie i opracowanie wyników badań prezentujących możliwości oraz charakter oddziaływań kompleksu [NiCl₂(PM)₂]Cl z CT-DNA; zaplanowanie, wykonanie i opracowanie wyników badań spektroskopowych (UV-Vis) oraz potencjometrycznych do określenia właściwości kwasowo-zasadowych i stopni jonizacji badanych kompleksów poprzez wyznaczenie wszystkich wartości stałych deprotonowania (pKa); wykonanie pełnej grafiki publikacji (komplet rysunków, schematów i wykresów oraz abstrakt graficzny do pracy); bezpośrednie nadzorowanie pozostałych badań prezentowanych w publikacji; wykonanie analiz, obliczeń chemicznych i interpretacja wyników; pisanie większości manuskryptu i przygotowanie artykułu pod wytyczne czasopisma, prowadzenie korespondencji z edytorem, wysyłka i redagowanie odpowiedzi na recenzje.

- H4** A. Chylewska*, M. Ogryzek, L. Chmurzyński, M. Makowski,
„Spectrophotometric, potentiometric and conductometric study of binary complex formation between cooper(II) ion and vitamin B₆ in solution”
Journal of Coordination Chemistry, **68**: 3761-3775; 2015 (Taylor & Francis, 15 stron)
IF = 1,703 (1,390) cyt. 6

Udział własny: 70%; opracowanie koncepcji pracy; zaplanowanie wszystkich eksperymentów; zaplanowanie, wykonanie i opracowanie części badań spektroskopowych, potencjometrycznych oraz konduktometrycznych określających możliwość, sposób oraz siłę koordynowania centrum metalicznego stanowiącego jon Cu(II) przez witamery B₆: pirydoksamina (PM) i pirydoksynę (PN); wykonanie pełnej grafiki publikacji (komplet rysunków, schematów i wykresów oraz abstrakt graficzny do pracy); bezpośrednie nadzorowanie pozostałych badań prezentowanych w publikacji; wykonanie analiz, obliczeń chemicznych i interpretacja wyników; napisanie większości manuskryptu i przygotowanie artykułu pod wytyczne czasopisma, prowadzenie korespondencji z edytorem i redagowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- H5** M. Ogryzek, A. Chylewska*, P. H. Marek, I. D. Madura,
L. Chmurzyński, M. Makowski
„Stable cationic coordination polymers of the Cu(II)-Vitamin B₆ type: structural analysis, application abilities and physicochemical properties in the solid state and solutions”
Dyes and Pigments, **136**: 278-291; 2017 (Elsevier, 14 stron)
IF = 3,767 (3,572) cyt. 1

Udział własny: 30%; opracowanie koncepcji pracy; zaprojektowanie oraz wykonanie syntezy związku Cu(II) z pirydoksamina metodą alkalicznej aktywacji liganda prowadzącej do uzyskania mono-kryształu ustalonego wskutek badań kationowego polimeru koordynacyjnego; zaplanowanie, wykonanie i opracowanie wyników badań spektroskopowych (UV-Vis) oraz potencjometrycznych do określenia właściwości kwasowo-zasadowych i stopni jonizacji badanych kompleksów poprzez wyznaczenie

wszystkich wartości stałych deprotonowania (pKa); zaplanowanie, wykonanie i opracowanie części badań spektroskopowych, potencjometrycznych identyfikujących potencjał aplikacyjny związku kompleksowego Cu(II) z pirydoksamina (wskaźnik alkacymetryczny nowej generacji); zaplanowanie wszystkich eksperymentów chemicznych; wykonanie obliczeń chemicznych i interpretacja wyników; wykonanie znacznej grafiki publikacji (rysunki, schematy, wykresy i abstrakt graficzny pracy); nadzorowanie badań prezentowanych w publikacji; napisanie manuskryptu i przygotowanie artykułu, prowadzenie korespondencji z edytorem i redagowanie odpowiedzi.

- H6** A. Chylewska*, A. Sikorski, M. Ogryzek, M. Makowski
„Attractive S \cdots π and π - π interactions in the pyrazine-2-thiocarboxamide structure: experimental and computational studies in the context of crystal engineering and microbiological properties”
Journal of Molecular Structure, **1105**: 96-104; 2016 (Elsevier, 9 stron)
IF = 2,011 (1,784) cyt. 5

Udział własny: 60%; opracowanie koncepcji pracy; otrzymanie pirazyno-2-tiokarboksamidu (PTCA) w postaci monokrystalicznej niezbędnego do badań strukturalnych i fizykochemicznych; zaplanowanie, wykonanie i opracowanie wyników badań spektroskopowych (UV, NMR, IR) do analizy strukturalnej i określenia ogólnych właściwości badanej molekuly; interpretacja i zebranie wszystkich wyników przeprowadzonych analiz; wykonanie znacznej części grafiki publikacji - rysunków, schematów i widm; nadzorowanie badań prezentowanych w publikacji; napisanie manuskryptu i przygotowanie artykułu, prowadzenie korespondencji z edytorem i redagowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- H7** A. Chylewska*, M. Ogryzek, A. Głębocka, A. Sikorski, K. Turecka, E. D. Raczyńska, M. Makowski
„Crystalline pyrazine-2-amidoxime isolated by diffusion method and its structural and behavioral analysis in the context of crystal engineering and microbiological activity”
RSC Advances, **6**: 64499-64512; 2016 (Royal Chemistry Society, 14 stron)
IF = 2,936 (3,096) cyt. 0

Udział własny: 45%; opracowanie koncepcji pracy; otrzymanie pirazyno-2-amidoksymu (PAOX) w postaci monokrystalicznej niezbędnego do badań strukturalnych i fizykochemicznych w efekcie zastosowania nowej techniki krystalizacyjnej; zaplanowanie, wykonanie i opracowanie wyników badań spektroskopowych (UV, NMR, IR), elektrochemicznych (CV) oraz potencjometrycznych do analizy strukturalnej i określenia właściwości redoks badanej molekuly; interpretacja i opracowanie wyników w sposób zbiorczy; wykonanie znacznej części grafiki publikacji - rysunków, schematów i widm; nadzorowanie badań prezentowanych w publikacji; napisanie manuskryptu i przygotowanie artykułu, prowadzenie korespondencji z edytorem i redagowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- H8** A. Głębocka, E. D. Raczyńska, A. Chylewska, M. Makowski
„Experimental (FT-IR) and theoretical (DFT) studies on prototropy and H-bond formation for pyrazine-2-amidoxime”
Journal of Physical Organic Chemistry, **29**: 326-335; 2016 (Wiley, 10 stron)
IF = 1,591 (1,312) cyt. 2

Udział własny: 20%; wykonanie resyntezy skutkujących otrzymaniem znacznych

ilości pirazyno-2-amidoksymu (*PAOX*) w postaci monokrystalicznej stanowiącego materiał do badań fizykochemicznych; wykonanie części grafiki publikacji; napisanie części artykułu, redagowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- H9** A. Chylewska*, M. Biedulska, A. Głębocka, E. D. Raczyńska, M. Makowski
„Drug-like properties and complete physicochemical profile of pyrazine-2-amidoxime: a combined multi-experimental and computational studies”
Journal of Molecular Liquids, **276**: 453-470; 2019, 2019 (Elsevier, 23 strony)
IF = 4,513 (3,929) cyt. 0

Udział własny: 60%; opracowanie planu badań prezentowanych w pracy; wykonanie resyntezy skutkującej otrzymaniem znacznych ilości pirazyno-2-amidoksymu (*PAOX*) w postaci monokrystalicznej jako materiału do badań fizykochemicznych; zaplanowanie, wykonanie i opracowanie wyników badań spektroskopowych (UV, NMR, IR), elektrochemicznych (CV) oraz potencjometrycznych do określenia właściwości kwasowo-zasadowych i stopni jonizacji badanej molekuly poprzez wyznaczenie wszystkich wartości stałych deprotonowania (pKa); zaplanowanie, wykonanie i opracowanie wyników badań spektroskopowych do określenia właściwości lipo(hydro)-filowych badanej molekuly wskutek wyznaczenia uśrednionych z trzech eksperymentów wartości logP i logD; wykonanie pełnej grafiki publikacji (komplet rysunków, schematów i wykresów oraz abstrakt graficzny do pracy); bezpośrednie nadzorowanie pozostałych badań prezentowanych w publikacji; wykonanie analiz porównawczych, obliczeń chemicznych i interpretacja uzyskanych wyników; napisanie znaczącej części manuskryptu i przygotowanie artykułu; prowadzenie korespondencji z edytorem, wysyłka i redagowanie odpowiedzi do uwag recenzentów.

- H10** M. Ogryzek, A. Chylewska*, A. Królicka, R. Banasiuk, K. Turecka, D. Lesiak, D. Nidzworski, M. Makowski,
„Coordination chemistry of pyrazine derivatives analogues of PZA: design, synthesis, characterization and biological activity”
RSC Advances, **6**: 52009-52025; 2016 (Royal Chemistry Society, 17 stron)
IF = 2,936 (3,096) cyt. 4

Udział własny: 30%; opracowanie koncepcji pracy; zaprojektowanie oraz wykonanie syntez kompleksów jonu Ru(III) z czterema pochodnymi pirazyny jako związków właściwych do badań fizykochemicznych; zaplanowanie, wykonanie i opracowanie wyników badań prezentujących możliwości oraz charakter kompleksów jednordzeniowych Ru(III) z odpowiednio: pirazyno-2-amidoksymem (*PAOX*), pirazyno-2-tiokarboksyamidem (*PTCA*), 2,3-bis(2-pirydylo)pirazyną (*DPP*) oraz 3-amino-5-bromo-2(metyloamino)pirazyną (*ABMAP*); zaplanowanie, wykonanie i opracowanie wyników badań spektroskopowych (UV-Vis) oraz potencjometrycznych do określenia właściwości kwasowo-zasadowych i stopni jonizacji badanych kompleksów poprzez wyznaczenie wszystkich wartości stałych deprotonowania (pKa); wykonanie pełnej grafiki publikacji (komplet rysunków, schematów i wykresów oraz abstrakt graficzny do pracy); bezpośrednie nadzorowanie pozostałych badań prezentowanych w publikacji; wykonanie analiz porównawczych, obliczeń chemicznych i zbiorcza interpretacja wyników; napisanie manuskryptu i przygotowanie artykułu względem wymogów czasopisma; prowadzenie korespondencji z edytorem, wysyłka i redagowanie odpowiedzi do recenzji.

Sumaryczna wartość IF = **29,142 (27,017)**
Średnia wartość IF = **2,91 (2,70)**

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

W ramach dyscypliny jaką jest chemia bionieorganiczna poznano już budowę i funkcjonowanie wielu centrów metalicznych w cząsteczkach białek, ustalono rolę metali w prawidłowym odżywianiu, ich transport, magazynowanie i toksyczność, a także przydatność w diagnostyce medycznej [1-3]. Intensywne poszukiwania innowacyjnych struktur farmaceutyków wynikają z faktu, iż standardowe leki oraz ich dawkowanie nie są już wystarczająco skuteczne. Ma to bezpośredni związek z lekoopornością i lekowrażliwością mikroorganizmów, zjawiskami wywołanymi nadmiernym i nieuzasadnionym zażywaniem np. antybiotyków lub innych leków.

W procesach, które odbywają się w komórkach żywych, współdziałają ze sobą związki wielkocząsteczkowe (np. białka, kwasy nukleinowe) z niskocząsteczkowymi (np. reaktywne formy tlenu i azotu, rodniki). Związki niskocząsteczkowe pełnią rolę różnorodnych efektorów biologicznych stanowiąc substraty reakcji enzymatycznych, aktywatory lub inhibitory. Badania nad niewystępującymi w naturze związkami kompleksowymi jonów metali przejściowych mają na celu nie tylko wyjaśnienie znaczenia, jakie ma stereochemia dla zrozumienia molekularnych oddziaływań i mechanizmów procesów komórkowych, ale obejmuje również pozyskiwanie nowych leków stanowiących metalofarmaceutyki. Potencjał farmaceutyczny połączeń koordynacyjnych jako substancji aktywnych leków przewiduje ich zwielokrotnioną aktywność działania (względem aktywności wolnego bioliganda) uzyskiwaną za sprawą wprowadzonego redoks aktywnego centrum metalicznego (lepsza efektywność przenikania leku przez błony w komórkach organizmu i możliwe procesy aktywacji działania poprzez utlenianie lub redukcję w środku wewnątrzkomórkowym).

Cel naukowy podjętych badań

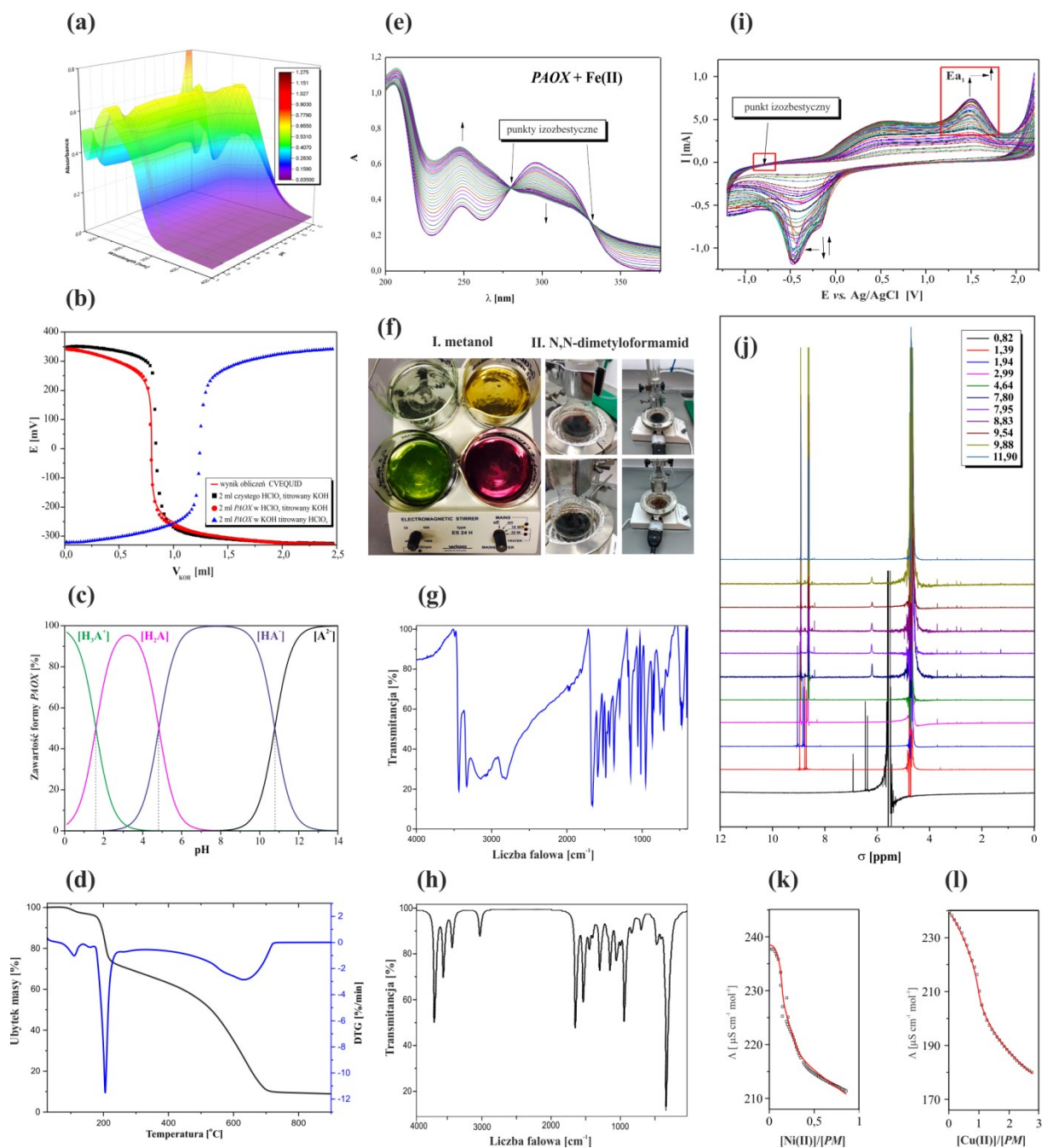
Główny cel osiągnięcia stanowiło otrzymywanie nowych, nieplatynowych połączeń koordynacyjnych dwu- oraz trójwartościowych jonów metali bloku d [Ni(II), Cu(II), Ru(III)] z układami N-heterocyklicznymi (pochodne pirydyny i pirazyny) o znaczeniu praktycznym i/lub farmaceutycznym. Tworzenie profilu bionieorganicznego obejmowało przeprowadzenie możliwie pełnej charakterystyki fizykochemicznej (badania równowag konformacyjnych i kwasowo-zasadowych, lipofilowości, zdolności oddziaływań międzycząsteczkowych, w tym

z biomolekułami i tworzenia wiązań wodorowych, a w przypadku ligandów również ich właściwości kompleksotwórczych) układów badawczych, co w konsekwencji pozwoliło tworzyć analizy porównawcze. Wspomniane porównania miały doprowadzić do rozwiązania problemów badawczych, które w moim przypadku stanowiły:

- (i) określenie optymalnych warunków prowadzenia syntez związków kompleksowych z udziałem aromatycznych ligandów azotowych (wybór jonu metalu, rozpuszczalnika, stechiometria nowych połączeń),
- (ii) określenie zmian właściwości i aktywności biologicznej ligandów N-heterocyklicznych wywołanych wskutek kompleksowania jonów metali d-elektronowych,
- (iii) wskazanie zastosowań nowych połączeń koordynacyjnych zweryfikowanych wynikami testów i analiz.

Zaplanowane i zaprezentowane (**Rys. 1**) w osiągnięciu naukowym badania eksperymentalne obejmowały realizację etapów:

- (i) projektowania, syntezy, oczyszczania i hodowli nowych materiałów krystalicznych (ligandy i połączenia koordynacyjne),
- (ii) wykonywania analiz strukturalnych,
- (iii) tworzenia profili bionieorganicznych badanych układów przy użyciu metod eksperymentalnych: spektroskopia molekularna (FT-IR, FT-Raman); elektronowa (UV-Vis); ^1H NMR, MS, krytalografia; potencjometria; konduktometria i woltamperometria cykliczna (CV),
- (iv) analizowania i przedyskutowania wyników badań biologicznych,
- (v) formułowania wniosków opartych na zgromadzonych danych w kontekście użyteczności nowych substancji.



Rys. 1. Opracowania wyników zaczerpnięte z publikacji [H2-H10] stanowiące przykłady metod eksperymentalnych, rodzajów badań i sposobów rejestracji wyników stanowiących osiągnięcie naukowe: **(a)** miareczkowania pH-metryczno-spektrofotometryczne; **(b)** metoda potencjometryczna do badania równowag kwasowo-zasadowych i tworzenia kompleksów; **(c)** wyznaczenie stopni jonizacji; **(d)** badania termogravimetryczne; **(e)** spektrofotometryczne badania kompleksotwórczości ligandów; **(f)** syntezy (preparatyka); **(g)** analizy widm oscylacyjnych (IR); **(h)** analizy wyników obliczeń teoretycznych; **(i)** badania równowag kwasowo-zasadowych metodą woltamperometrii cyklicznej; **(j)** miareczkowania kwasowo-zasadowe metodą ^1H NMR; **(k)** i **(l)** metoda konduktometryczna do badań tworzenia i określania stechiometrii kompleksów oraz przewodnictwa roztworów.

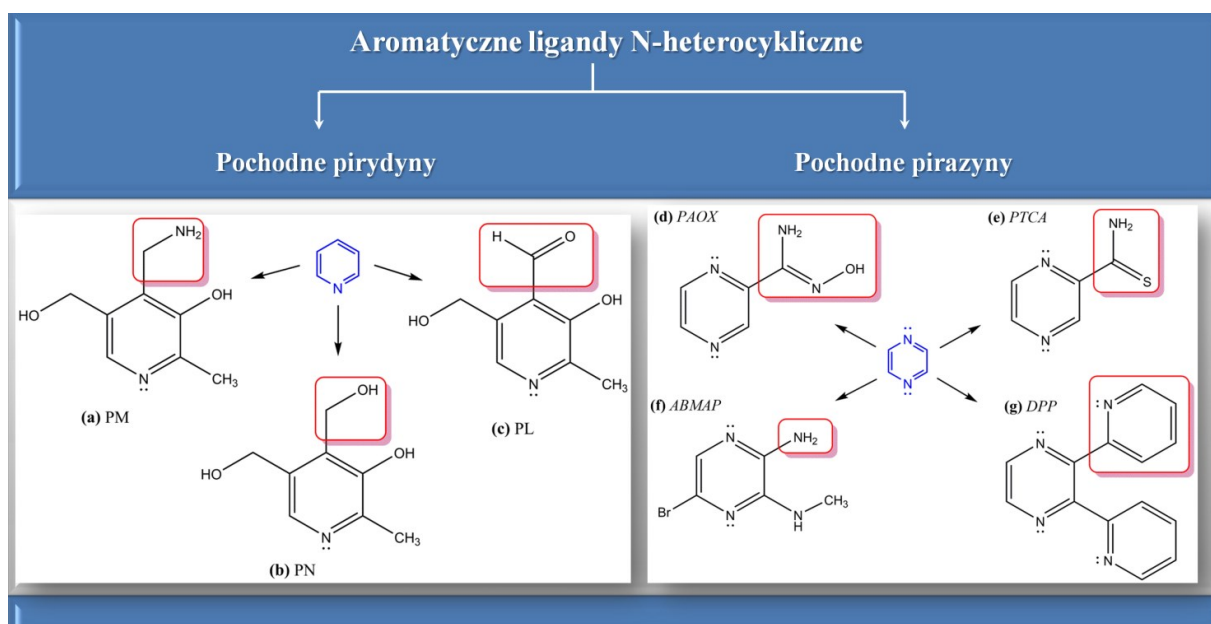
Prezentacja wyników badań stanowiących osiągnięcie naukowe

Wykaz publikacji naukowych [H1]-[H10] wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i zastosowana dla nich kolejność oznaczeń uwzględniają ich powiązanie tematyczne w obrębie trzech aspektów prezentacji: [H1] znaczenia i aktualnego stanu wiedzy dotycząca podejmowanej tematyki; [H2]-[H5] strategii i wyników uzyskanych dla pirydynowych układów badawczych; [H6]-[H10] wymiernych efektów badań z pirazynowymi układami badawczymi. Definicja użytego wyrażenia „układ badawczy” obejmuje zarówno wolne ligandy jak i ich połączenia koordynacyjne z jonami metali przejściowych. W związku z powyższym, symbole odsyłaczy do tych prac mogą pojawiać się w tekście rozdziałów w sposób nieuporządkowany w zakresie numeracji.

Aromatyczne związki N-heterocykliczne w roli ligandów

Moje badania dotyczyły dwóch grup związków (**Rys. 2**) stanowiących aromatyczne ligandy N-heterocykliczne:

1. **pochodne pirydyny** – trzy izomery znane jako witamina B₆: pirydoksamina (PM), pirydoksyna (PN) oraz pirydoksal (PL) [4]. Związki wybrano w oparciu o potwierdzoną aktywność biologiczną (PM - jeden z reagentów w powstawaniu prostaglandyn - regulatorów ciśnienia krwi i skurczy mięśni sercowych; biorące udział w tworzeniu hormonów, enzymów i hemoglobiny [5]; PN oraz PM związane z resztą fosforanową i kolejno z apoenzymem tworzą centra aktywne enzymów takich jak aminotransferazy, dekarboksylazy, desulfydrazy uczestnicząc w procesach katalitycznych aminokwasów), istotne znaczenie farmaceutyczne (zapewniają prawidłowe funkcjonowanie układu nerwowego poprzez stymulację związków wpływających na wytwarzanie serotoniny i dopaminy; pośrednio regulują pracę serca; wpływają na przemiany tryptofanu i witamin rozpuszczalnych w tłuszczach [6]) oraz zdolności tworzenia trwałych połączeń z jonami metali [7].
2. **pochodne pirazyny** (1,4-diazyny) - cztery analogi strukturalne pirazyno-2-karboskyamidu (PZA), leku przeciwprątkowego o nazwie handlowej: pirazynamid, posiadające inny podstawnik (ugrupowanie) w pozycji 2 pierścienia pirazyny: pirazyno-2-amidoksym (PAOX), pirazyno-2-tiokarboskyamid (PTCA), 2,3-bis(2-pirydył)-pirazyna (DPP) oraz 2-amino-5-bromo-3-(metyloamino)-pirazyna (ABMAP).



Rys. 2. Wybrane do badań ligandy aktywne biologicznie opisane akronimami: **(a)** pirydoksamina; **(b)** pirydoksyna; **(c)** pirydoksal; **(d)** pirazyno-2-amidoksym; **(e)** pirazyno-2-tiokarboksyamid; **(f)** 2,3-bis(2-pirydył)-pirazyna; **(g)** 2-amino-5-bromo-3-(metyloamino)-pirazyna.

Przedstawiciele powyższych klas związków wykorzystuje się w medycynie jako leki przeciwprątkowe I rzutu (doustne), np. hydrazyd kwasu 4-pirydynokarboksyłowego (izoniazyd, INH), pirazyno-2-karboksyamid (pirazynamid, *PZA*). W przypadku rozpoznania gruźlicy wywołanej patogenami lekoopornymi lub lekowrażliwymi, powyższe farmaceutyki wspomaga się dodatkowo lekami II rzutu (terapię skojarzone), stanowiącymi kolejne pochodne pirydyny, np. amid kwasu 2-etylo-4-pirydynokarboksyłowego (etionamid, ETO) lub amid kwasu 2-propylo-4-pirydyno-karboksyłowego (protionamid, PTO). Wybór substancji aktywnych w tego typu terapiach bazuje na znajomości ich różnych celów molekularnych (warstwa wolnych lipidów – INH, PTO, ETO; błona komórkowa – *PZA*) potęgując ich działanie (PTO, ETO: hamowanie biosyntezy kwasów mykoloowych; *PZA*: zaburzenia funkcji potencjału błony powodujące hamowanie biosyntezy białek i kwasów tłuszczowych) oraz skutkuje poprawą skuteczności leczenia [8].

Wybrane do badań trzy izomery witaminy B₆ (PM, PL, PN), stanowiące grupę niesymetrycznych pochodnych pirydyny i różniące się między sobą podstawnikiem w pozycji 4 pierścienia pirydyny, miały przyczynić się do otrzymania większej liczby izomerów geometrycznych tworzonych połączeń koordynacyjnych o lepszym potencjale badawczym (liczba i różnorodność możliwych produktów) oraz aplikacyjnym (różnice we właściwościach i aktywności biologicznej). Pierwsze uzyskane wyniki, składające się na osiągnięcie, dotyczyły określenia sposobu wiązania oraz charakteryzowania równowag ustalających się w trakcie

kompleksowania jonu Ni(II) – witaminą B₆ [H2], co zostało wykorzystane w planowaniu i prowadzeniu syntezy tego typu połączeń. Badania spektrofotometryczne i potencjometryczne ustalania zdolności kompleksotwórczych witamerów B₆ (PM, PL, PN) wykazały, że to PL najchętniej oddziałuje z jonem Ni(II) w roztworach wodnych.

Kontynuacja powyższej tematyki, tym razem z zastosowaniem centrum jonowego Cu(II), sprawiła, że już na etapie planowania eksperymentu natrafiłam na rozbieżne informacje prezentowane w literaturze, np. różnice w wartościach log β produktów reakcji Cu(II) z PM w wodzie wynikają z braku wiedzy na formy jonowej PM zdolnej do kompleksowania [9-11]. Dodatkowo, nie znalazłam żadnych informacji na temat zdolności kompleksotwórczych PN, pochodnej o zdecydowanie większym znaczeniu dla człowieka (suplement diety; substancja aktywna większości leków witaminowo-odpornościowych). Opierając się na trzech, niezależnych metodach eksperymentalnych, w tym nie stosowanej dotąd do określania natury kompleksotwórczej ligandów konduktometrii, ustaliłam przyczyny różnic i zaproponowałam właściwe wartości oraz dokładne miejsca donorowe poszczególnych form witaminy B₆ (PM, PN i PL) wykorzystywane podczas wiązania z jonami Cu(II) [H4]. Obecność w PM grupy aminometylowej w pozycji 4 pierścienia pirydyny, o większej zasadowości w porównaniu z podstawnikiem hydroksymetylowym w PN czy grupą aldehydową w PL, jest odpowiedzialna za tworzenie przez PM trwalszych połączeń koordynacyjnych z jonami Cu(II) w porównaniu z pozostałymi izomerami witaminy B₆ (PN, PL). Uzyskane w powyższy sposób i zaprezentowane w dedykowanym chemii koordynacyjnej czasopiśmie (*Journal of Coordination Chemistry*) wyniki uznano za mające istotny wpływ na rozwój tej dyscypliny, co pozwoliło mi (autorowi wiodącemu pracy) zostać laureatem nagrody międzynarodowej oraz dołączyć do panelu edytorskiego tego czasopisma. Warto też zauważyć, że przeprowadzone badania dotyczące charakteryzowania właściwości kompleksotwórczych układów pirydynowych względem jonów Ni(II) i Cu(II), jednoznacznie identyfikują zachodzenie procesu chelatowania centrum metalicznego z zaangażowaniem dwóch miejsc ligandów pirydynowych: (1) tlenu z grupy fenolanowej (pozycja 3) w przypadku wszystkich izomerów (PM, PL, PN) oraz (2): atomu azotu grupy aminometylowej dla PM; atomu tlenu hydroksymetylowego – PN; atomu tlenu grupy aldehydowej – PL.

Zestawienie wyników eksperymentów dla wszystkich badanych aromatycznych związków N-heterocyklicznych, opisujących rodzaj i trwałość tworzonych przez nie w wodzie połączeń koordynacyjnych z jonami metali Ni(II), Cu(II), Ru(III), przedstawia **Tabela 1**.

Tabela 1. Wyznaczone i zlogarytmowane wartości stopniowych (K) i skumulowanych (β) stałych trwałości połączeń koordynacyjnych badanych ligandów z jonami metali bloku d w wodzie (25 °C); odchylenia standardowe stanowiące błędy pomiarowe zostały podane w nawiasach; **Tab. 1** pub. [H2], **Tab. 2** pub. [H4], **Tab. 7** pub. [H10].

Kation kompleksowy	potencjometria			spektrofotometria			konduktometria		
	log K ₁	log K ₂	log β	log K ₁	log K ₂	log β	log K ₁	log K ₂	log β
[Ni(PM)(OH ₂) ₂] ²⁺	2,76 (± 0,01)	-	2,76	2,75 (± 0,02)	-	2,75			
[Ni(PL) ₂] ²⁺	3,83 (± 0,12)	5,25 (± 0,21)	9,08	3,86 (± 0,10)	5,29 (± 0,08)	9,15	nie uwzględniona w koncepcji [H2]		
[Ni(PN)(OH ₂) ₂] ²⁺	4,43 (± 0,14)	-	4,43	2,68 (± 0,05)	-	2,68			
[Cu(PM) ₂] ²⁺	6,37 (± 0,17)	11,21 (± 0,27)	17,58	6,24 (± 0,15)	11,15 (± 0,10)	17,39	6,15 (± 0,21)	11,05 (± 0,12)	17,12
[Cu(PN) ₂] ²⁺	4,41 (± 0,13)	8,29 (± 0,25)	12,70	4,53 (± 0,15)	8,08 (± 0,23)	12,73	4,33 (± 0,17)	8,17 (± 0,11)	12,50
[Cu(PL) ₂] ²⁺	2,65 (± 0,15)	7,11 (± 0,18)	9,76	2,77 (± 0,08)	6,94 (± 0,12)	9,71	2,81 (± 0,13)	6,84 (± 0,25)	9,65
[Ru(PAOX) ₂ (OH ₂) ₂] ³⁺				3,61 (± 0,07)	7,15 (± 0,12)	10,76			
[Ru(PTCA) ₂ (OH ₂) ₂] ³⁺	nie uwzględniona w koncepcji [H10]			4,79 (± 0,11)	8,54 (± 0,17)	13,33	nie uwzględniona w koncepcji [H10]		
[Ru(DPP) ₂ (OH ₂) ₂] ³⁺	nie uwzględniona w koncepcji [H10]			5,17 (± 0,16)	6,46 (± 0,19)	11,63	nie uwzględniona w koncepcji [H10]		
[Ru(ABMAP) ₂ (OH ₂) ₂] ³⁺	nie uwzględniona w koncepcji [H10]			4,65 (± 0,13)	-	4,65	nie uwzględniona w koncepcji [H10]		

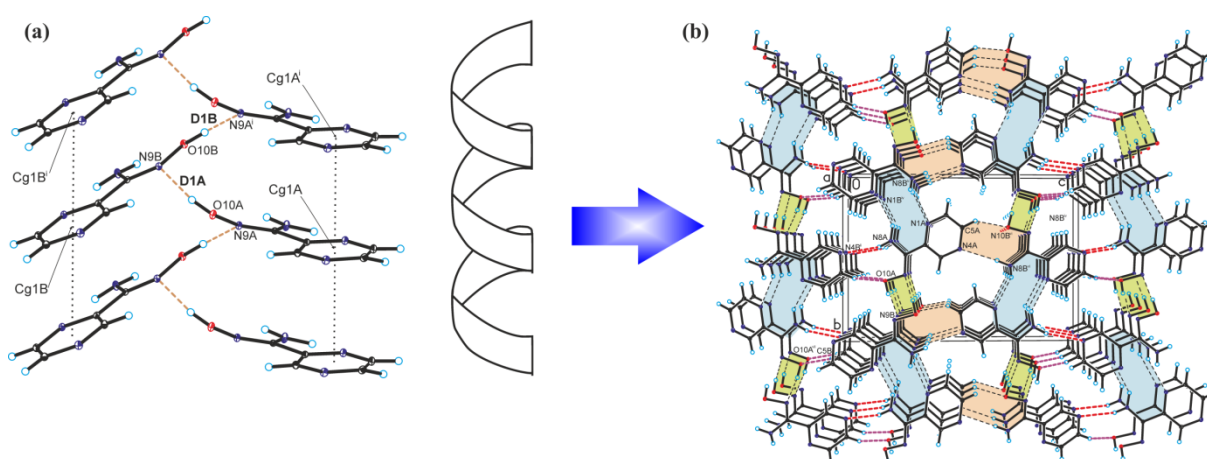
Drugi, wybrany do badań szereg to pochodne pirazyny, związki niezwykle atrakcyjne do projektowania nowych substancji aktywnych leków, z uwagi na ich łatwo modyfikowalny szkielet stanowiący układ farmakoforowy [12]. Większość substancji aktywnych z fragmentem pirazyny stanowią biernie, ale łatwo absorbowane formy proleków [13], których aktywność farmakologiczna pojawia się wskutek konwersji wewnątrzkomórkowej. Przykładem takiej biotransformacji jest przeciwprątkowa, bierna forma proleku o handlowej nazwie pirazynamid (*PZA*), która ulega reakcji deaminacji pod wpływem pirazynamidazy (obecna w genie *pncA* bakterii) przekształcając się w postać aktywną - kwas pirazynowy (*POA*) [14]. Dobra absorpcja *PZA* z przewodu pokarmowego, jego metabolizm w wątrobie, usuwanie przez nerki i hepatotoksyczność zostały poznane, ale znalezione w literaturze opisy mechanizmu jego działania nie są do końca potwierdzone i wyjaśnione [15]. Równowagi kwasowo-zasadowe ustalające się w układach biologicznych, przebiegające z udziałem obydwu form leku, absorbowanej *PZA* i czynnej *POA*, nie były dotąd rozważane we wspomnianych opisach. Najnowsze raportowane odkrycia podejmujące się ustalania

mechanizmu działania pirazynamidu [16,17] dowodzą, że aktywność bakteriobójcza *PZA* jest właściwością zależną od pH i temperatury.

Pracę naukową związaną z pochodnymi pirazyny rozwijam od 2015 roku, od czasu wyhodowania monokryształu i zaprezentowania rozwiązanej struktury pirazyno-2-tiokarboksyamidu (*PTCA*) stabilizowanej niekowalencyjnymi oddziaływaniami typu $S \cdots \pi$ [H6]. Te nietypowe i rzadko spotykane oddziaływania (Rys. 3 publikacji [H6]), potwierdzone i scharakteryzowane eksperymentalnie, mogą stanowić układ modelowy lub narzędzie pozwalające na badanie fizyki niekowalencyjnego oddziaływania $S \cdots \pi$ w niskocząsteczkowym układzie. Przeniesienie uzyskanych w ten sposób informacji na układy większe może okazać się pomocne w zrozumieniu tworzenia struktury białek lub innych większych układów. Podstawowa molekula *PTCA* to dwa konformery *syn*- i *anti*- (skutek obrotu wiązania $C_{\text{pierścień}}-C_{\text{podstawnik}}$; Rys. 5 publikacji [H6]), przy czym badania dowiodły większej trwałości układu z grupą aminową związaną z atomem N(1) pierścienia pirazyny poprzez wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe. Badaną pochodną tioamidową cechuje odporność na działanie temperatury (trwała do 224 °C w analizie termogravimetrycznej), zdolność chelatowania jonu Ru(III), a wyniki testów jej aktywności mikrobiologicznej wykazały 10-krotnie wyższą aktywność hamującą wzrost grzyba (*Candida albicans*) w stosunku do wykazywanej aktywności względem bakterii Gram dodatnich (*Escherichia hirae*, *Streptococcus aureus*) i Gram ujemnych (*Proteus vulgaris*, *Proteus aeruginosa*). Prace dotyczące właściwości kwasowo-zasadowych, tworzonych form jonowych zależnych od pH, rozpuszczalności i lipofilowości *PTCA* zostały już ukończone i stanowią materiał kolejnej przygotowywanej w grupie publikacji.

Szczególnie intensywnie badanymi w kontekście projektowania i odkrywania nowych farmaceutyków są układy amidoksymowe [18]. Obecność tego ugrupowania (np. ximelagatran [19,20]; amidoksymowa pochodna BGP-15 [21]) w strukturze proleku jest uważana za istotny, zredukowany element odpowiedzialny za tworzenie postaci aktywnej leku o funkcji inhibitora enzymów (np. trombiny = melagatran [22,23]; poli(ADP-rybozo)polimerazy = oseltamivir [24,25]). Zebrana wiedza literaturowa dotycząca pochodnych amidoksymowych była jedną z przyczyn wyboru liganda *PAOX* do badań. Prezentacja kompletnej analizy strukturalnej pirazyno-2-amidoksymu, uzyskanej rentgenograficznie z użyciem wyhodowanych monokryształów, została opisana w pracy [H7] osiągnięcia. Podstawowa jednostka strukturalna *PAOX* stanowi dwie molekuly (A i B), różniące się między sobą wykazywanym kątem pomiędzy płaszczyzną tworzoną przez pierścień pirazyny, a płaszczyzną wytyczaną przez ugrupowanie amidoksymowe. Molekuly A i B tworzą trwałe dimer (D1) (Rys. 3 publikacja

[H7]) stabilizowany wiązaniami wodorowymi, wewnątrz- i międzycząsteczkowymi. Te z kolei, tworzą większe motywy helikalne (helisa prawoskrętna), w których na jeden skręt przypadają cztery molekuly (dwie A i dwie B), przy czym są one ściśle uporządkowane, **Rys. 3(a)**. Struktura przestrzenna *PAOX* jest skomplikowana i powstała dzięki obecności jeszcze czterech, innych rodzajów dimerów (D2)-(D5) (**Rys. 5** praca [H7]). Najciekawszym z nich wydaje się dimer (D5), który jest utrzymywany w rezultacie oddziaływań typu $\pi \cdots \pi$ pierścieni pirazyny leżących pomiędzy kolejnymi skrętami helisy, **Rys. 3(b)**. Poznana struktura *PAOX* stanowiła wstęp charakterystyki tego liganda.



Rys. 3. Struktura przestrzenna liganda *PAOX*: (a) tworzenie motywu helikalnego wskutek oddziaływań monomerów (**Rys. 4** praca [H7]); (b) upakowanie krystaliczne *PAOX* tworzone przez 5 typów dimerów oznaczonych na rysunku różnymi kolorami (**Rys. 6** praca [H7]).

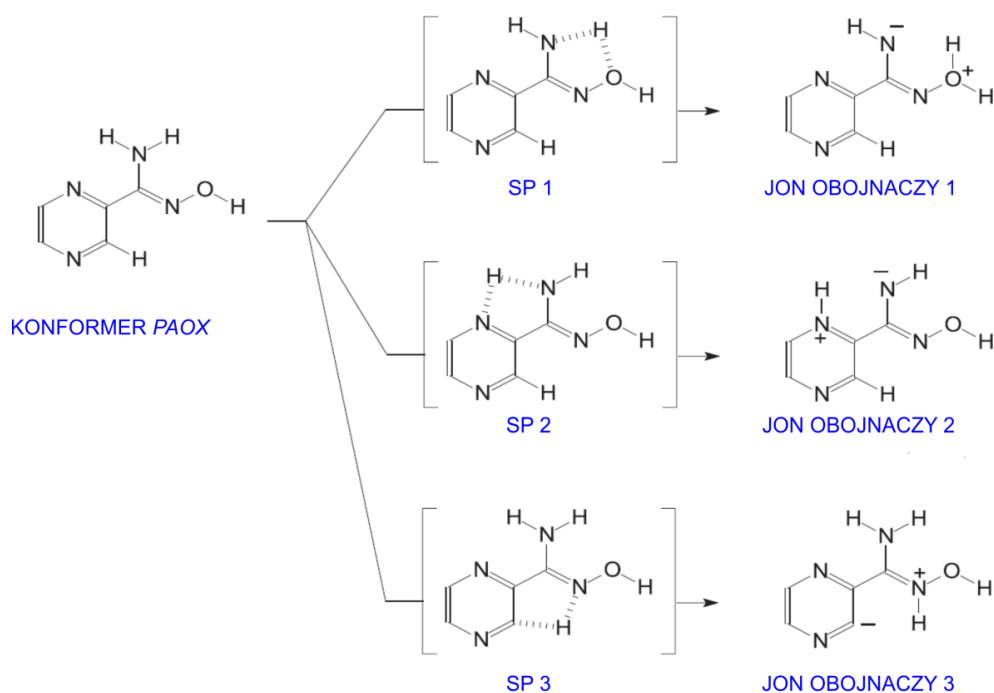
Kolejny etap badań z udziałem *PAOX* dotyczył profilowania jego roztworów [H7]. Wyniki eksperymentów elektrochemicznych metodą woltamperometrii cyklicznej (CV) umożliwiły zaproponowanie mechanizmu reakcji odwracalnych zachodzących z udziałem pierścienia pirazyny (**Schemat 4** w [H7]) oraz procesów nieodwracalnych, którym ulega ugrupowanie amidoksymowe molekuly *PAOX* (**Schemat 2** w [H7]). Potwierdzony w tego typu trwałych transformacjach udział podstawnika amidoksymowego pochodnej pirazyny jest odpowiedzialny za określoną, wysoką aktywność przeciwgrzybiczą *PAOX*. Co więcej, aktywności o naturze wybiórczej, tj. selektywnym hamowaniu wzrostu oraz niszczeniu komórek *Candida albicans*, grzyba z rodzaju drożdżaka o charakterze pasożytniczym. Do określania właściwości kompleksotwórczych *PAOX* w acetonitrylu i w wodzie wybrane zostały jony: Mn(II), Fe(II), Cr(III) oraz Co(II). Wyznaczone w obydwu rozpuszczalnikach wartości skumulowanych stałych trwałości amidoksymowych kompleksów pozwoliły na ich uszeregowanie względem wykazywanej trwałości, w tendencji malejącej:

woda: $[\text{Cr}(\text{PAOX})_2]^{3+}_{\text{hydr.}} > [\text{Co}(\text{PAOX})_2]^{2+}_{\text{hydr.}} > [\text{Mn}(\text{PAOX})_2]^{2+}_{\text{hydr.}} > [\text{Fe}(\text{PAOX})]^{2+}_{\text{hydr.}}$

acetonitryl: $[\text{Co}(\text{PAOX})_2]^{2+} > [\text{Fe}(\text{PAOX})_2]^{2+} > [\text{Cr}(\text{PAOX})_2]^{3+} > [\text{Mn}(\text{PAOX})_2]^{2+}$.

Powyższe zmiany trwałości pirazyno-2-amidoksymowych kompleksów jonów metali bloku d są zgodne z teoretycznym szeregiem Irvinga-Williamsa, przy uwzględnieniu wpływu wartości potencjału jonowego centrum (wyższa jego wartość oznacza trwalszy kompleks).

Przed przystąpieniem do badań natury kwasowo-zasadowej pirazyno-2-amidoksymu, wykonano badania teoretyczno-eksperymentalne określające szczegółowo sposób i naturę stabilizacji struktury *PAOX*, obliczenia przeprowadzono w fazie gazowej oraz w wodzie. Analiza konformacyjna badanego liganda uwzględniająca zachodzenie tautomerii protonowej pozwoliła zaproponować możliwe ścieżki dowiedzionej wewnątrzcząsteczkowej stabilizacji trwalszego konformeru *PAOX* z dodatkową prezentacją rozważanych w tym procesie jego stanów przejściowych oraz jonów obojnaczych (*zwitterions*) (**Rys. 4**).



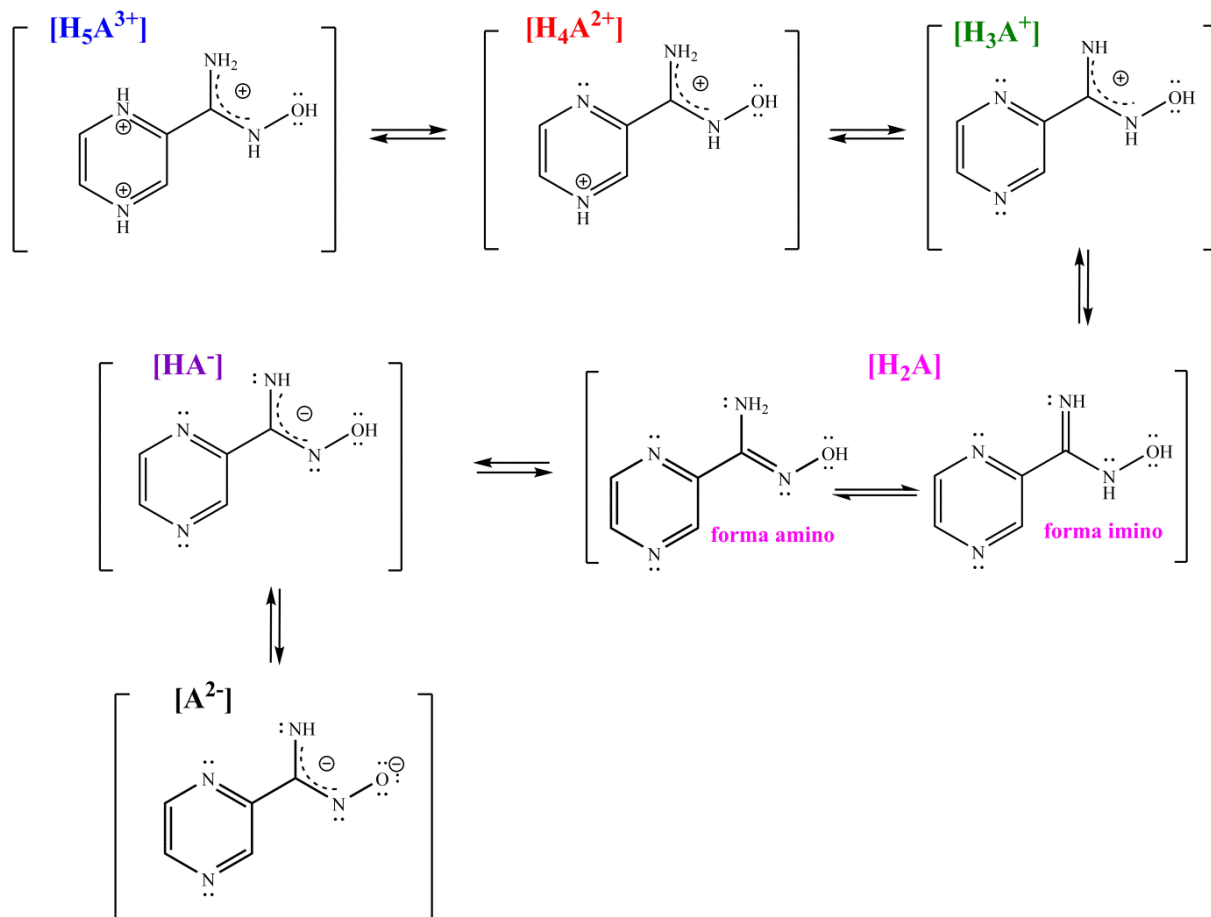
Rys. 4. Teoretycznie ustalone oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe stabilizujące trwalszy *anti*-konformer *PAOX* z tworzonymi stanami przejściowymi i jonami obojnaczymi (**Rys. 9** w pracy **[H8]**).

Opisane w **[H8]** wyniki okazały się być niezwykle pomocne przy ustalaniu form jonowych *PAOX* zależnych od pH układu, tworzonych w roztworach wodnych oraz w silnie kwasowym środowisku. Molekuła *PAOX* może ulegać protonowaniu w trzech etapach. Pierwsze miejsce przyłączenia protonu stanowi heteroatom N(4), drugie: azot N(1) pierścienia pirazyny, trzecie: N(iminowy). Dodatkowo, amidoksymowa pochodna pirazyny może również ulegać

dwustopniowemu procesowi deprotonowania, odpowiednio: jako pierwsza deprotonowana jest grupa hydroksylowa -O(H), druga w kolejności: grupa -NH(H). Opisana kolejność i odpowiednie miejsca w przypadku obydwu typów procesów zostały usystematyzowane w oparciu o wyniki przeprowadzonych doświadczeń oraz wyniki obliczeń. Dowiedziono wynikami badań własnych (12 rodzajów eksperymentów z zarejestrowanymi: widmami UV i ^1H NMR, krzywą potencjometryczną oraz woltamperogramami – **Rys. 4-11** pracy [H9]) mechanizm przebiegu deprotonowania maksymalnie sprotonowanej formy $PAOX - [\text{H}_5\text{A}]^{3+}$ został zaprezentowany przeze mnie po raz pierwszy w literaturze [H9]. Tworzenie form $[\text{H}_5\text{A}]^{3+}$ i $[\text{H}_4\text{A}]^{2+}$ odbywa się w wyniku reakcji z 70% kwasem chlorowym(VII), a wartości stałych opisujących te równowagi ustala się wskutek zastosowania funkcji kwasowości Hammetta. Ponadto, w badaniach wykorzystałam aktualne doniesienia z zakresu ilościowego oznaczania elektrochemicznego nowym typem elektrod, który zaprezentowano w 2016 roku dla *PZA* [26]. W związku z trudnościami zarejestrowania w obrębie jednego eksperymentu wszystkich ustalających się równowag procesu deprotonowania formy $[\text{H}_5\text{A}]^{3+}$, w badaniach przetestowałam elektrody szkliste węglowe, których powierzchnie zmodyfikowałam warstwą poliglicynową otrzymaną wskutek przeprowadzonej w fazie wstępnej elektropolimeryzacji. Udowodniłam, że rejestrowane przy użyciu nowych sensorów zmiany potencjału (zależne od pH układu) nie wyróżnia specjalna dokładność czy powtarzalność oznaczeń względem tych samych eksperymentów prowadzonych z zastosowaniem elektrod platynowej i szklistej węglowej podstawowej (2 mm). Wyniki przeprowadzonych badań miareczkowych roztworów *PAOX* pozwoliły zebrać wszystkie pięć wartości stałych deprotonowania ($\text{pK}_{\text{a}1-5}$ odpowiednio: -4,78, -1,69, 1,63, 4,89, 10,75) wraz z potwierdzeniem (wsparcie eksperymentu metodami teoretycznymi) odpowiednich miejsc deprotonowania *PAOX* i jego poszczególnych stopni jonizacji. Należy zauważyć, że tylko trzy reakcje deprotonowania opisane stałymi $\text{pK}_{\text{a}3-5}$ przebiegają w roztworze wodnym i są związane z formami $[\text{H}_2\text{A}]$, $[\text{HA}]^-$ oraz $[\text{A}]^{2-}$, **Schemat 1** (szczegółowe struktury zostały zaprezentowane na **Schemacie 1** publikacji [H9]).

Ustalanie profilu bionieorganicznego liganda *PAOX* uwzględniało również ustalanie jego natury i rozpuszczalności. Charakter hydrofilowo-lipofilowy i jonizacja są właściwościami fizykochemicznymi leku, od których w dużej mierze zależy dotarcie leku do miejsca jego działania. Efekt eksperymentów z ekstrahowaniem próbek *PAOX* w układzie oktanol/woda, z rejestracją widm elektronowych faz rozdzielonych, wsparte wynikami uzyskanymi z obliczeń teoretycznych (**Rys. 12** pracy [H9]), wykazał hydrofilowy charakter badanej molekuly ($\log P = -0,32$; $D = 0,59$) i brak tendencji do tworzenia asocjatów w układach oktanolowych. Eksperymentalne oznaczenie temperatury topnienia monokrystalicznego *PAOX* i jego znane

(na tym etapie badań) wartości pKa wygenerowały kolejne informacje dotyczące ustalania rozpuszczalności *PAOX* w wybranych układach, przy czym największą jej wartość (14,52 g/ml) ustaliłam w roztworach o pH 7,4 (pH fizjologicznym; krew).



Schemat 1. Ustalone struktury pośrednie form jonowych *PAOX* ulegające kolejnym reakcjom deprotonowania.

Przedstawione w pracy [H9] wyniki pozwalają również na przewidywanie dominującego udziału, tj. określenia stanu zjonizowania *PAOX* w układach biologicznych (np. w płynach ustrojowych) o specyficznym pH. Pozyskana wiedza pozwoliła mi na dopasowanie warunków pracy z drobnoustrojami w testach mikrobiologicznych, w których już na etapie namnażania mikrobów stosuje się pożywkę zakwaszającą badane układy do pH 5,5, co z kolei generuje występowanie innej formy jonowej badanego związku i może dostarczać cennych informacji w procesie wyjaśniania mechanizmu jej działania.

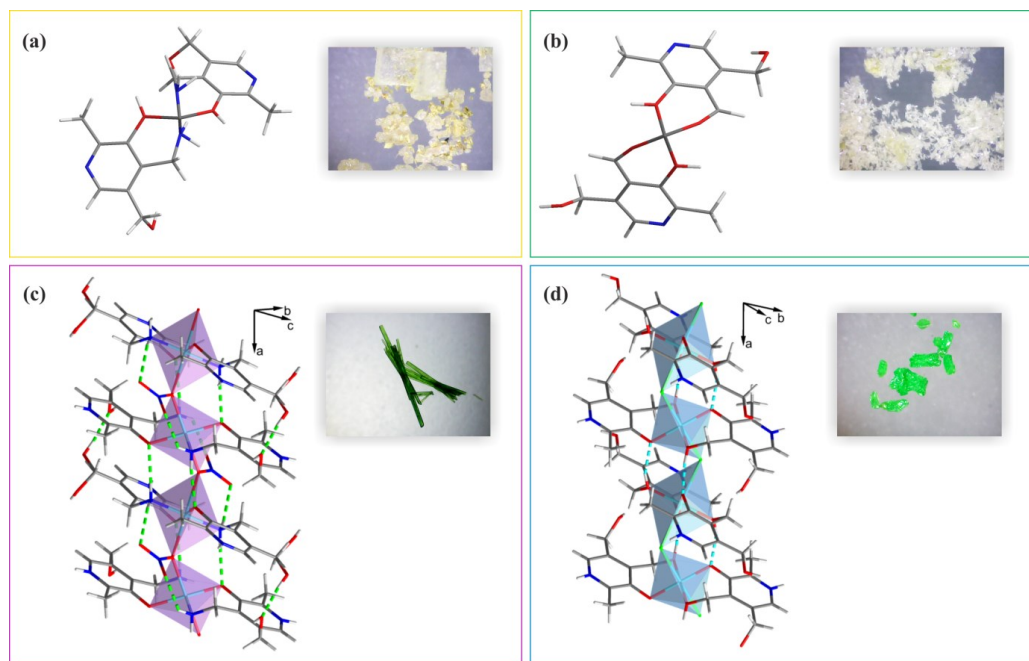
Połączenia koordynacyjne jonów metali bloku d z ligandami N-hetrocyklicznymi

Tematyka projektowania i otrzymywania nowych metalofarmaceutyków stanowi jeden z najbardziej rozwijanych zagadnień naukowych chemii nieorganicznej i koordynacyjnej raportowanych w ostatnich dwóch dekadach. Ma to bezpośredni związek z ich praktycznym wykorzystaniem w terapiach leczniczych (przeciwnowotworowa; przeciwzapalna; antydiabetyczna; przeciwdrobnoustrojowa), profilaktyce (suplementy diety; transportery mikroelementów i pierwiastków śladowych) oraz diagnostyce medycznej (radiofarmaceutyki; czynniki kontrastowe lub chelatujące jony metali).

Umieszczenie pracy przeglądowej [H1] w spisie publikacji osiągnięcia naukowego stanowi przedstawienie istoty i znaczenia prowadzenia badań naukowych związanych z tworzeniem, charakterystyką fizykochemiczną i potencjałów badawczo-aplikacyjnych związanych z połączeniami koordynacyjnymi jonów metali z aktywnymi biologicznie ligandami. Praca przeglądowa [H1] to zwięzły opis najważniejszych, w mojej ocenie, praktycznych wskazówek związanych z projektowaniem nowych metalofarmaceutyków. Publikacja winna być rozważana w charakterze obszernego wstępu literaturowego dowodzącego rzetelnego znajomienia z aktualnym stanem wiedzy w zakresie tematyki podejmowanej w prezentowanym osiągnięciu i jej zasadności. Określenie trwałości potencjalnego metalofarmaceutyku wobec czynników chemicznych, jego odporność na przemiany metaboliczne, charakter hydrofilowo-lipofilowy, jonizacja i wielkość cząsteczki określają rolę farmakokinetyki w projektowaniu leków oraz dowodzą znaczenia ustalania profilu bionieorganicznego nowych substancji aktywnych. Możliwość zachodzenia reakcji konkurencyjnych, typu wymiana (substytucja) ligandów w metalofarmaceutyku wskutek obecnych w otoczeniu molekuł, jest również brana pod uwagę na etapie planowania eksperymentów. Określenie zmian w szkieletach węglowych wybranych ligandów i nowych właściwości, możliwości i rodzaju oddziaływań z biomolekułami oraz nowej aktywności powstałych w efekcie kompleksowania z jonami metali bloku d związków miało ułatwić zrozumienie przebiegu niektórych reakcji biochemicznych.

Wybór centrum metalicznego kompleksu stanowi równie ważne kryterium otrzymywania substancji aktywnej biologicznie co dobór liganda w metalofarmaceutyku. W przypadku pierwszego badanego szeregu – pochodnych pirydyny, do badań tworzenia kompleksów w roztworach oraz pracy preparatywnej wybrałam dwa centra metaliczne tj. jony Ni(II) i Cu(II), z uwagi na ich znaczenie dla organizmów żywych (mikroelementy; skutki nadmiarowych ilości: jonu Ni(II) – choroba wieńcowa jonu lub Cu(II) - choroba Wilsona).

Wymiernym efektem badań dotyczących ustalania profili witamerów B₆ (właściwości kwasowo-zasadowe i kompleksotwórcze PM, PL, PN w publikacji [H2]) jest zaprezentowana po raz pierwszy synteza skutkująca otrzymaniem dwóch, trwałych w wodzie (zgodnie z przewidywaniami i ustalonymi wartościami stałych trwałości tworzenia układów w trakcie miareczkowania) związków koordynacyjnych [Ni(PM)₂]Cl₂ (**1**) oraz [Ni(PL)₂]Cl₂ (**2**), **Rys. 5**.



Rys. 5. Struktury i zdjęcia mikroskopowe (40-krotne przybliżenie) otrzymanych pirydynowych połączeń koordynacyjnych: [Ni(PM)₂]Cl₂ (**1**); [Ni(PL)₂]Cl₂ (**2**), **Rys. 1** w [H3]; {[Cu(NO₃)(PM)₂]_nNO₃·H₂O (**3**) oraz {[Cu(Cl)(PN)₂]_nNO₃ (**4**), **Rys. 1-5** w [H5].

Badania eksperymentalne z udziałem połączeń koordynacyjnych jonu Ni(II) z PM oraz z PL, klasyfikujące je pod względem wykazywanych właściwości zostały przedstawione w pracy [H3]. Profil bionieorganiczny ustalony dla pirydynowych kompleksów Ni(II) obejmował: wyznaczenie wartości stałych deprotonowania roztworów kompleksów wstępnie zakwaszonych wraz z przedstawieniem kolejnych form jonowych związków tworzonych w trakcie miareczkowań; określenie trwałości względem temperatury oraz ustalenie możliwości i natury oddziaływania z biomolekułą (*CT*-DNA) – potencjalnym celem molekularnym tych związków. W efekcie potwierdzono słaby charakter zasadowy obydwu związków (**1**) i (**2**), a tworzone maksymalnie sprotonowane ich formy opisano poprzez różne (zgodne pomimo wyznaczania ich dwiema, niezależnymi metodami eksperymentalnymi) wartości pK_{a1} i pK_{a2} – niższe o około jednostkę dla formy [Ni(HPM)₂]⁴⁺, co dowodzi silniejszych właściwości kwasowych tej formy w stosunku do [Ni(HPL)₂]⁴⁺ (**Tabela 1**). Zdecydowanie bardziej trwały temperaturowo okazał się być kompleks (**1**), a badania spektroskopowe i elektrochemiczne

metodą woltamperometrii cyklicznej (CV) dowiodły możliwości wiązania obydwu kompleksów **(1)** i **(2)** z CT-DNA poprzez oddziaływania w małym rowku stabilizowane wiązaniami wodorowymi i siłami van der Waalsa ze wskazaniem zaangażowania N-7* guaniny w DNA (*oparte o analizę danych literaturowych wiążących obserwowane zmiany spektralne z tym miejscem) [H3].

Materiał pracy [H5] przedstawia opracowany przeze mnie sposób prowadzenia syntezy i hodowli monokryształów kationowych polimerów koordynacyjnych (**Rys. 5**): $\{\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{PM})_2\}_n\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ **(3)** oraz $\{\text{Cu}(\text{Cl})(\text{PN})_2\}_n\text{NO}_3$ **(4)**. Badania rozpoczęły się od ustalenia warunków tworzenia takich układów, którą poprzedza faza wstępna - alkaliczna aktywacja liganda witaminowego (PM lub PN). W kolejnym etapie pirydynowe kompleksy Cu(II) zostały przebadane rentgenostrukturalnie potwierdzając obecność w ich układach anionowych ligandów mostkujących: NO_3^- dla **(3)** oraz Cl^- dla **(4)**. Profilowanie układów polimerycznych rozpoczęłam od ustalenia ich charakteru kwasowo-zasadowego, poprzez wyznaczenie metodami potencjometryczną i spektrofotometryczną wartości pKa ich form sprotonowanych (**Tabela 2**), których tworzenie uwzględnia stosowana przeze mnie metodologia pomiarów. Znajomość wartości pKa związku pozwala przewidzieć jaka forma będzie dominowała w danym środowisku.

W przeciwieństwie do połączeń Ni(II), to forma $[\text{Cu}(\text{Cl})(\text{HPN})_2]^{3+}$ jest charakteryzowana przez niższe wartości pKa (silniejsze właściwości kwasowe) względem wartości dla jonu $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{HPM})_2]^{3+}$.

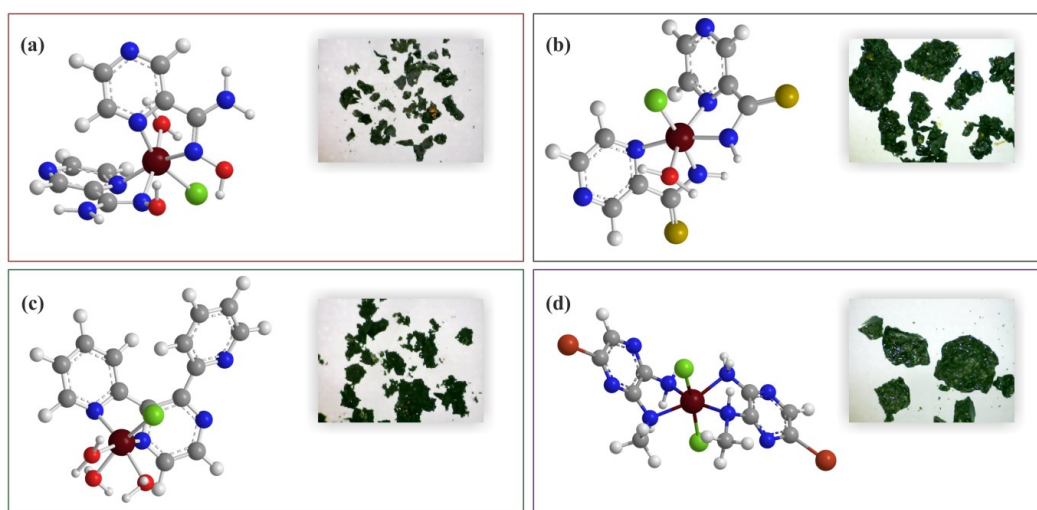
Tabela 2. Uzyskane, ujemnie zlogarytmowane wartości stałych deprotonowania kationowych form pirydynowych kompleksów z n liczby miareczkowań ($I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$; $n \geq 3$); odchylenia standardowe podano w nawiasie (**Tab. 2** w [H3] oraz **Tab. 4** w [H5]).

Forma kationowa kompleksu	metoda spektrofotometryczna		metoda potencjometryczna	
	pKa1	pKa2	pKa1	pKa2
$[\text{Ni}(\text{HPM})_2]^{4+}$	3,71 ($\pm 0,09$)	8,80 ($\pm 0,05$)	3,65 ($\pm 0,07$)	8,96 ($\pm 0,12$)
$[\text{Ni}(\text{HPL})_2]^{4+}$	5,23 ($\pm 0,06$)	9,71 ($\pm 0,11$)	5,41 ($\pm 0,09$)	9,48 ($\pm 0,10$)
$[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{HPM})_2]^{3+}$	5,87 ($\pm 0,06$)	8,17 ($\pm 0,04$)	6,01 ($\pm 0,02$)	8,65 ($\pm 0,07$)
$[\text{CuCl}(\text{HPN})_2]^{3+}$	4,07 ($\pm 0,06$)	7,55 ($\pm 0,03$)	4,30 ($\pm 0,26$)	7,47 ($\pm 0,12$)

Do wyznaczenia wartości pKa z potencjometrii wykorzystałam program STOICHIO, który wykonuje szczegółową analizę konfluentną wyników eksperymentu i uwzględnia wszystkie rodzaje błędów pomiarowych. Istotny jest zadawany model reakcji równowagowych ustalających się w trakcie indywidualnego pomiaru, nieograniczony co do ich postaci.

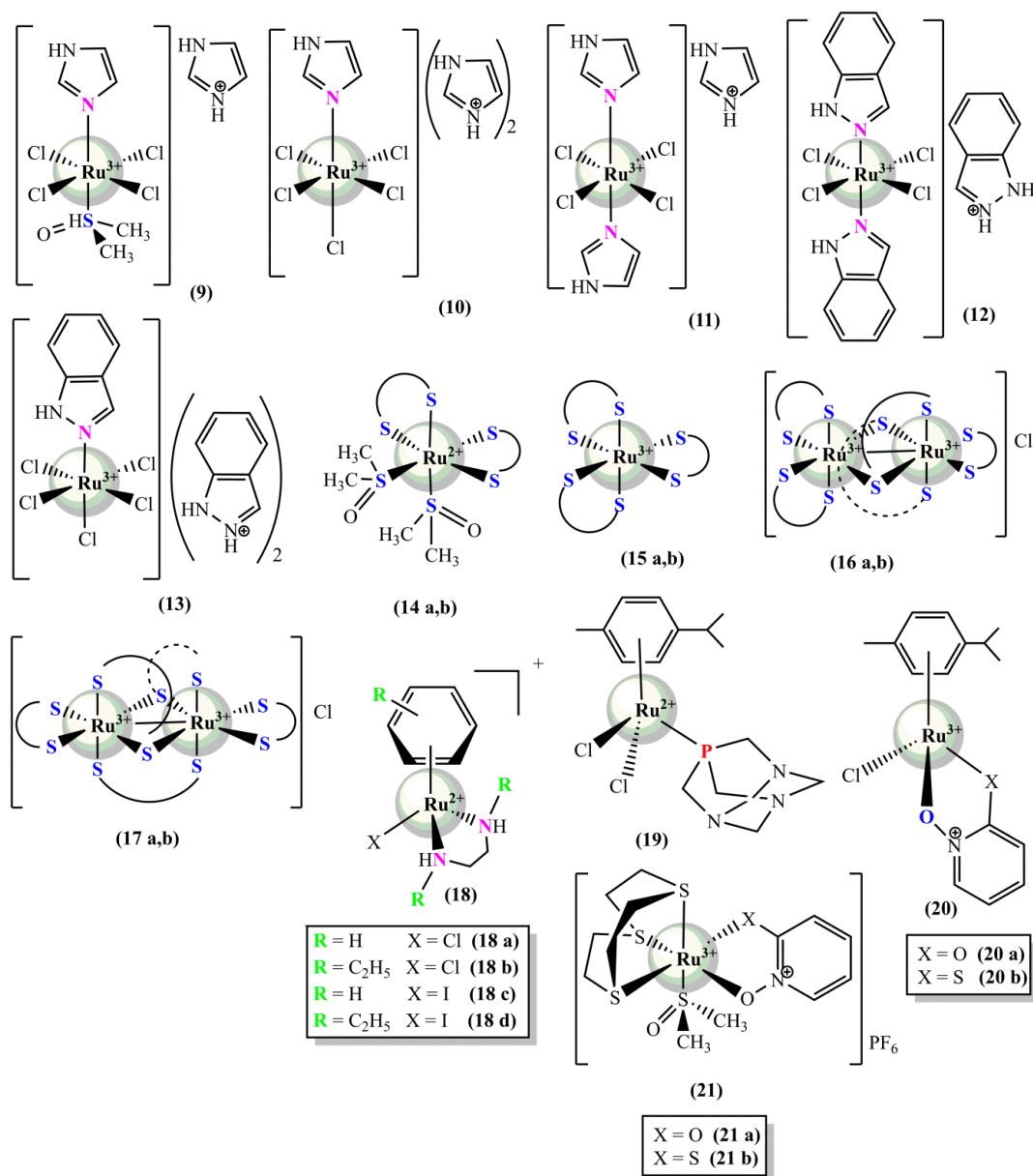
Działanie programu wykorzystuje: nieliniową metodę najmniejszych kwadratów z iteracyjnymi procedurami do obliczania stężeń równowagowych; średniokwadratową metodę do ustalania parametrów równowagowych oraz metodę wielowymiarowej regresji liniowej do wyznaczenia wartości stałych równowag [27-30]. Z kolei, badania prowadzone z detekcją spektrofotometryczną, opracowywałam w programie Origin. Sposób wyznaczenia wartości pKa w tym przypadku, opierał się na wykorzystaniu równania Hendersona-Hasselbacha, zadanego przeze mnie w formie algorytmu określającego efektywność, dokładność i poprawność obliczanych wartości pKa tworzących się form jonowych kompleksów w stosunku do danych wejściowych (wartości mierzalnych). W rezultacie, wykazałam zgodność prezentowanych wartości pKa opisujących charakter kwasowo-zasadowy nowych związków kompleksowych Ni(II) i Cu(II) z pochodnymi pirydyny. Zastosowanie dwóch, niezależnych metod i uzyskana zbieżność wartości dowodzi poprawności stosowanej metodologii, prawidłowości zadawanych modeli reakcji równowagowych oraz przeprowadzonych obliczeń (nieznaczne różnice liczbowe mieszczą się w zakresach odchyżeń standardowych).

Wyboru jonu rutenu(III), jako redoks-aktywnego centrum metalicznego i centrum wiążanego przez pochodne pirazyny (**Rys. 6**), dokonałam w oparciu o literaturowe przykłady pirazynowych rutenofarmaceutyków stosowanych w medycynie jako leki przeciwpłytkowe [31-33], modulatory reakcji immunologicznych [34] lub czynniki wychwytyjące NO [35] (**Rys. 7**).



Rys. 6. Wzory przestrzenne badanych pirazynowych kationów kompleksowych z Ru(III), **Rys. 4** w publikacji [H10]: (5) $[\text{RuCl}(\text{PAOX})_2(\text{OH}_2)]^{2+}$; (6) $[\text{RuCl}(\text{PTCA})_2(\text{OH}_2)]^{2+}$; (7) $[\text{RuCl}(\text{DPP})_2(\text{OH}_2)_3]^{2+}$; (8) $[\text{RuCl}_2(\text{ABMAP})_2]^+$ ze zdjęciami produktów syntetycznych w 40-krotnym przybliżeniu.

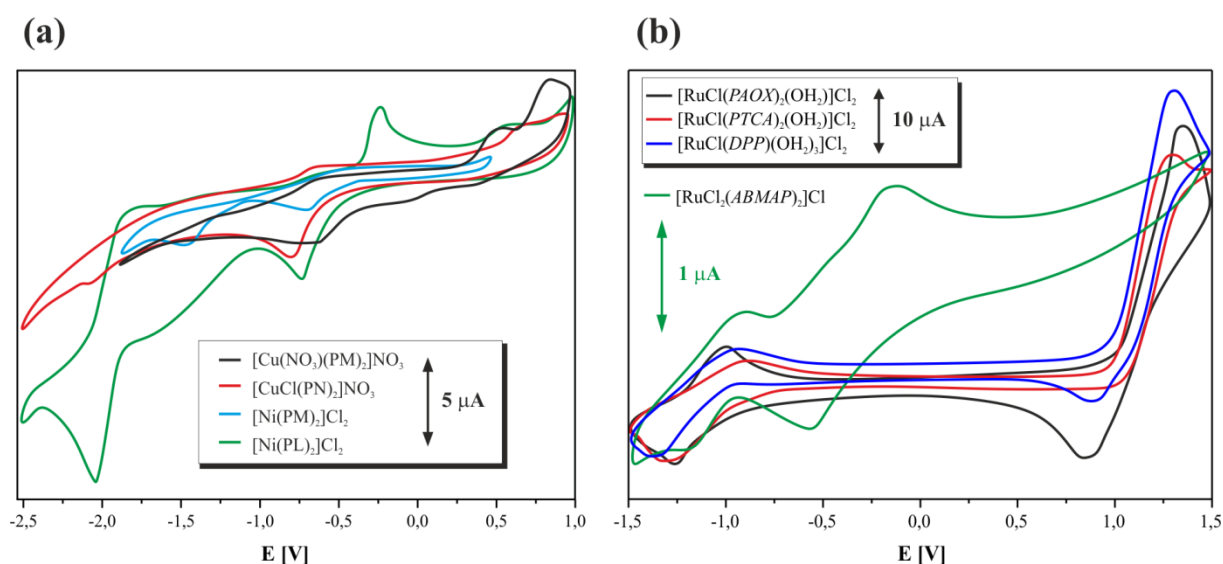
Dodatkową motywacją wykorzystania jonu Ru(III) były dane dotyczące znanych celów molekularnych oraz potwierdzony mechanizm działania substancji aktywnych stanowiących rutenowe(III) połączenia koordynacyjne. Przeprowadzone w acetonitrylu i wodzie badania właściwości kompleksotwórczych ligandów pirazynowych względem jonu Ru(III) dały ciekawe rezultaty [H10]. Przeciwnie do innych układów, trwalsze połączenia koordynacyjne Ru(III) z pirazynami, charakteryzowane przez ich wyższe wartości skumulowanych stałych trwałości ($\log\beta$), uzyskiwałam w wodzie.



Rys. 7. Przykłady rutenofarmaceutyków, **Rys. 5** w [H1]: (9) (H₂Im)[*trans*-Ru^{III}(DMSO)Cl₄(Im)] NAMI-A; (10) (HIm)₂[Ru^{III}Cl₅(Im)], (11) *trans*-HIm[Ru^{III}Cl₄(Im)₂, (12) *trans*-(HInd)[Ru^{III}Cl₄(Ind)₂] - KP1019, (13) (HInd)₂[Ru^{III}Cl₅(Ind)], (14 a) i (14 b) izomery Ru^{II}(ditiokarbamato)₂(DMSO)₂, (15) izomery [Ru^{III}(ditiokarbamate)₃], (16) izomery α-[Ru^{III}₂(dithiocarbamate)₅]Cl, (17) izomery β-[Ru^{III}₂(ditiokarbamate)₅]Cl, (18) [Ru^{II}(η⁶-arene)(en)X]⁺, (19) [Ru^{II}Cl₂(η⁶-*p*-Cymene)(PTA)] RAPTA-C, (20 a) i (21 a) kompleksy Ru^{III} z N-tlenkiem 2-hydroksypirydyny i ich analogi; (20 b) i (21 b) z pirytionem.

Znajomość natury hydrofilowej ligandów pirazynowych oraz przewidywana stabilizacja ich kompleksów wiązaniami wodorowymi mogą tłumaczyć otrzymaną i odbiegającą od normy trwałość takich układów w roztworach wodnych. Warunki pracy preparatywnej wstępnie zweryfikowane wskutek opracowanych miareczkowań spektrofotometrycznych (układy wodne; prognozowana stechiometria połączeń Ru(III) : ligand pirazynowy = 1 : 2) zastosowałam do wszystkich ligandów pirazynowych: *PAOX*, *PTCA*, *DPP*, *ABMAP* uzyskując produkty koordynacyjne w fazie skondensowanej, niezbędne do realizacji założonego celu osiągnięcia naukowego.

Dopełnieniem tworzonych profili bionieorganicznych wszystkich zsyntezowanych połączeń koordynacyjnych aromatycznych ligandów azotowych z jonami Ni(II), Cu(II) i Ru(III) było scharakteryzowanie ich właściwości redoks, **Rys. 8**. Ustalony w powyższy sposób charakter nowych połączeń stanowi jedną z możliwości przewidywania procesów, którym będą one ulegać w obecności utleniaczy i/lub reduktorów w układach biologicznych.



Rys. 8. Woltamogramy cykliczne: (a) pirydynowych związków kompleksowych (1)-(4), ujęte [H3] jako Tabela 4 oraz w [H5] jako Tabela 2; (b) pirazynowych związków koordynacyjnych Ru(III) (5)-(8), w [H10] jako Rys. 3.

W rezultacie zbadanego przewodnictwa wodnych roztworów nowych związków (1)-(8) (pomiary konduktometryczne, Tabela 3) sklasyfikowałam je jako roztwory elektrolitów mocnych (związki jonowe), a ich maksymalnie sprotonowane kationowe formy kompleksowe jako indywidua kwasowe dysocjujące ze średnią mocą (na podstawie ustalonych wartości pKa). Powyższe wyniki zostały ujęte w pracach stanowiących osiągnięcie naukowe, w tym [H2] jako rozdział 3.5., [H5] podrozdział 3.4. oraz w [H10] jako Tab. 4.

Tabela 3. Wartości przewodnictwa produktów kompleksowych **(1)-(8)**, oraz dodatkowych związków jonowych do porównań, w roztworze wodnym o stężeniu 1 mM (25 °C).

Związek	Przewodnictwo ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
[Ni(PM) ₂]Cl ₂	244,00
[Ni(PL) ₂]Cl ₂	144,00
[Cu(NO ₃)(PM) ₂]NO ₃	125,49
[CuCl(PN) ₂]NO ₃	87,77
[RuCl(PAOX) ₂ (OH ₂)]Cl ₂	686,50
[RuCl(DPP)(OH ₂) ₃]Cl ₂	580,60
[RuCl ₂ (ABMAP) ₂]Cl	127,50
AgNO ₃	91,70
NaCl	133,70
NiCl ₂	713,00

Aktywność biologiczna badanych układów

Drobnoustroje stanowią ważny element wszystkich ekosystemów, ale to odporne szczepy mikroorganizmów chorobotwórczych stanowią dla nas poważne zagrożenie. Ich ciągły wzrost generuje pilną potrzebę projektowania i tworzenia bardziej skutecznych leków przeciwdrobnoustrojowych. Osiągnięcia chemii koordynacyjnej w projektowaniu nowych związków o potencjalnym działaniu farmakologicznym stanowią istotny wkład w zwalczanie mikroorganizmów patogennych (metalofarmaceutyki, materiały nanotechnologiczne). Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej z udziałem kompleksów metali skupiają uwagę na spełnianiu przez nie 4 głównych warunków strukturalnych generujących ich kolejną aktywność: (i) efekt chelatowy (posiadanie ligandów bidentnych w kompleksie implikuje wykazywanie większej aktywności mikrobiologicznej związków w stosunku do kompleksów z ligandami monodentnymi); (ii) charakter ligandów (pożądane są ligandy posiadające już udokumentowaną aktywność); (iii) ładunek kompleksu (efektywność przeciwdrobnoustrojowa wzrasta w szeregu kationowy > obojętny > anionowy); (iv) charakter przeciwjonu w przypadku kompleksów jonowych (preferowane chlorki lub chlorany(VII)) [H1]. Aktywność mikrobiologiczna związków kompleksowych zależy w głównej mierze od typu zastosowanego centrum metalicznego. Dodatkową zaletą związków kompleksowych jest ich niska masa molowa (400-500 g/mol) i przeważnie dobra rozpuszczalność w wodzie, co identyfikuje dobrą rozpuszczalność w większości środowisk oraz zapewnia możliwość przenikania przez błony biologiczne, na zasadzie dyfuzji pasywnej. Otrzymywanie połączeń kompleksowych, które spełniać będą powyższe warunki oznacza ich przemyślane projektowanie oraz badania dotyczące ustalania profilu bionieorganicznego takich związków (znajomości struktury

oraz sprecyzowanych właściwości: charakteru kwasowo-zasadowego, przewodnictwa, powinowactwa względem reduktorów/utleniaczy czy możliwości oddziaływania z biomolekułami).

Analiza porównawcza testów mikrobiologicznych, wykonanych w ramach osiągnięcia, dla wolnych, aromatycznych ligandów N-heterocyklicznych prezentuje zdecydowanie wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową pochodnych pirazyny. W związku z powyższym, moja uwaga skupi się na omówieniu wyników otrzymanych z użyciem tych układów oraz ich związków kompleksowych z jonem Ru(III) - układów, których potencjał farmaceutyczny wykazałam w ocenianym osiągnięciu.

W pierwszym etapie badań ustalono aktywność przeciwdrobnoustrojową wolnych ligandów pirazynowych względem dwóch rodzajów bakterii G(+): paciorkowca kałowego (*Enterococcus faecalis*) i gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*); dwóch rodzajów bakterii G(-): pałeczek ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) i pałeczek zapalenia płuc (*Klebsiella pneumoniae*) oraz jednego szczepu grzyba: *Candida albicans*. Porównanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej *PTCA* wykonane względem standardowo stosowanych antybiotyków (gentamycyny i nystatyny) pozwala scharakteryzować badaną pochodną tioamidową jako substancję aktywną i wybiórczo działającą (grzybobójcza i hamująca wzrost) tylko na drożdżaka (*Candida albicans*), wyniki ujęte w **Tabeli 8** pracy [H6]. Analiza struktur *PZA* i *PTCA* i uzyskane dane z badań mikrobiologicznych pozwalają stwierdzić, że zamiana silnie elektroujemnego atomu tlenu (*PZA*) na mniej elektroujemny atom siarki (*PTCA*) zaledwie w obrębie podstawnika w tych pochodnych generuje kaskadę zmian w aktywności mikrobiologicznej. Odpowiednio, *PTCA* wykazuje: (i) znikomą aktywność bakteriobójczą względem bakterii G(+) - w przeciwieństwie do leku przeciwprątkowego *PZA*; (ii) selektywną aktywność antymikotyczną, która nie jest obserwowana w przypadku *PZA*.

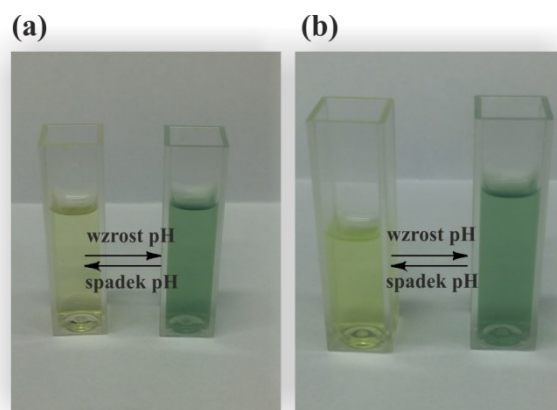
Podobne wyniki testów mikrobiologicznych dotyczących oznaczeń najmniejszego stężenia bakterio- i grzybobójczego uzyskano dla drugiej badanej pochodnej pirazyny, to jest dla pirazyno-2-amidoksymu (*PAOX*), wyniki ujęte w formie opisu **Badania mikrobiologiczne** w pracy [H7]. Potwierdzona, wysoka aktywność antymikotyczna *PAOX*, większa niż wykazywana przez *PTCA*, może być spowodowana obecnością ugrupowania amidoksymowego w jego strukturze, podstawnika łatwo ulegającego redukcji. Co ciekawe, dopiero wskutek przebadania wszystkich (5)-(8) pirazynowych kompleksów Ru(III) [H10] zauważyłam, że jeden z nich, $[\text{RuCl}(\text{PAOX})_2(\text{OH}_2)]\text{Cl}_2$ (5), wyróżnia niskie stężenie bakteriobójcze wykazywane (podobnie do *PZA*) tylko względem bakterii G(+) (40 µg/ml (5) względem *E. faecalis* oraz 100 µg/ml (5) względem *S. aureus*). Jednak najlepsze efekty

mikrobójcze związku (**5**) uzyskano określając najniższe stężenie przeciwwgrzybicze - stężenie 5 µg/ml ma zdolność niszczącą i hamującą wzrost tego drożdżaka, *C. albicans*. Zauważony i potwierdzony potencjał farmaceutyczny kompleksu (**5**) wygenerował potrzebę ustalenia jego właściwości cytotoksycznych, które zostały wykonane we współpracy z naukowcami Wydziału Biotechnologii UG-GUMed. Do badań użyto dwie linie komórkowe: (i) fibroblasty bydłące (skóra właściwa) oraz (ii) komórki nabłonka (nerka) – miejsca szczególnie narażone na grzybicę wywoływaną przez *Candida albicans*. Wyniki potwierdziły niską cytotoksyczność (**5**), nawet w najwyższych badanych stężeniach (150 µg/ml) wywołujących spadek przeżywalności komórek zaledwie w 8-10%. Użyty do porównań, wolny ligand *PAOX* wykazywał działanie toksyczne względem obydwu linii komórkowych, obserwowane nawet w niskich zakresach stężeń jego roztworów (40-100 µg/ml), i dowodzi jego zdolności stymulujących zachodzenie procesu proliferacji komórek (ponad 15% spadek przeżywalności), ujęte jako **Rys. 9** w publikacji [H10].

Znajomość profilu bionieorganicznego związków umożliwiła zaplanowanie eksperymentu określającego możliwości i naturę oddziaływań tego związku z erytrocytami zaprezentowanego w artykule [H10]. Dowiedziono, że roztwór $[\text{RuCl}(\text{PAOX})_2(\text{OH}_2)]\text{Cl}_2$ (**5**) wykazuje wysokie powinowactwo [stężenie 4-krotnie niższe niż stężenie charakteryzujące jego aktywność bakteriobójczą (40 µg/ml)] do tych bio-układów, za które odpowiedzialne jest centrum jonowe kompleksu. Jon Ru(III) posiada zdolności mimikowania jonów Fe(II) przez co może łatwo wiązać się z układami hemowymi.

Potencjał aplikacyjny badań

Warto podkreślić znaczenie ustalania profilu bionieorganicznego w aspekcie znaczenia praktycznego tworzonych związków koordynacyjnych. Jeden z jego etapów zakłada ustalenie charakteru kwasowo-zasadowego produktu badanego. W trakcie wykonywania miareczkowań spektrofotometrycznych dla roztworów witaminowych kompleksów Cu(II) zaobserwowałam intensywne zmiany pozycji oraz intensywności maksimum absorpcji na widmach zależnych od wartości pH układu [H5]. Zjawiska te były bezpośrednio związane ze zmianami barwy tworzących się form jonowych związków (**3**) i (**4**) (**Rys. 9**).



Rys. 9. Zaobserwowane zmiany barwy wodnych roztworów Cu(II) (a) z pirydoksamina (3); (b) z pirydoksyną (4) związane ze zmianą pH układu.

Moja uwaga skupiła się na możliwości wykorzystania obserwowanego zjawiska i potencjale zastosowania tych kationowych polimerów koordynacyjnych jako wskaźniki alkacymetryczne. Eksperymentalna weryfikacja propozycji zastosowania polegała na przeprowadzeniu oznaczeń potencjometrycznych (miareczkowania) z dodatkiem koordynacyjnych indykatorów (3) i (4). Próbkę wybrane do oznaczeń analitycznych stanowiły wodne roztwory: (i) mocnych; (ii) słabych kwasów oraz (iii) ich mieszanin, które poddawałam titrowaniu wodnym roztworem wodorotlenku sodu. Uzyskana baza wyników kolejnych oznaczeń pozwoliła stwierdzić, że szczególnie dobrym kandydatem do pełnienia funkcji wskaźnika dwubarwnego (Rys. 8) jest kationowy kompleks jonu miedzi(II) z pirydoksamina, który jest zdolny do wykrywania próbek silnie kwasowych (niskie pH) lub obecności kwasów ($pK_a < 2,5$).

Najciekawszymi z użytych obiektów badawczych są pirazyno-2-amidoksym (*PAOX*) i tworzony przez niego kompleks z jonami Ru(III) (5). Skomplikowana struktura wolnego liganda (faza stała), jego specyficzne właściwości kwasowo-zasadowe, redoks, hydrofilowe, kompleksotwórcze i potwierdzona aktywność przeciwgrzybicza (średniej mocy) zostały szczegółowo zbadane, opisane i ujęte jako ustalony profil bionieorganiczny *PAOX* [H7-H9]. Na przykładzie tego liganda pirazynowego można było dokonać uzasadnienia tematu osiągnięcia, tj. podać związek przyczynowo-skutkowy podjętej tematyki oparty na wynikach badań. Wymiernym efektem modyfikacji liganda azotowego *PAOX* uzyskanej poprzez związanie z rutenowym centrum metalicznym, są:

- wzmożony (względem wolnego liganda) i selektywny charakter antymikotyczny kompleksu $[RuCl(PAOX)_2(OH_2)]Cl_2$ (aktywność kompleksu $[5 \mu g/ml]$ identyczna z aktywnością flukonazolu względem grzyba *Candida albicans*, szczep ATCC 10231);

- niska cytotoksyczność $[\text{RuCl}(\text{PAOX})_2(\text{OH}_2)]\text{Cl}_2$ wobec komórek fibroblastów i nabłonka, nawet w najwyższych badanych stężeniach [150 $\mu\text{g/ml}$] oraz odpowiednio w porównaniu z substratami, z których powstał – RuCl_3 i *PAOX*;
- wykazywanie powinowactwa wodnego roztworu $[\text{RuCl}(\text{PAOX})_2(\text{OH}_2)]\text{Cl}_2$ (o niskim stężeniu [10 $\mu\text{g/ml}$] do silnego wiązania z erytrocytami.

Otrzymane wskutek przeprowadzonych eksperymentów chemiczno-biologicznych wyniki, związane z pirazyno-2-amidoksymowymi układami badawczymi, prezentują wzmożenie aktywności mikrobiologicznej i nowe właściwości biologiczne (silne oddziaływania wiążące względem erytrocytów) produktu koordynacyjnego. Materiał wynikowy, stanowiący w mojej opinii efekt najważniejszy, został ujęty w 4 pracach wykazanych w osiągnięciu [\[H7\]](#)-[\[H10\]](#) wraz z propozycją zastosowania $[\text{RuCl}(\text{PAOX})_2(\text{OH}_2)]\text{Cl}_2$ jako nowej generacji metaloantymikotyku.

Zwięzłe podsumowanie osiągnięcia naukowego

Na osiągnięcie naukowe w mojej opinii składają się:

- opracowanie procedury syntetycznej pirydynowych kompleksów uwzględniającej nie stosowany wcześniej etap alkalicznej aktywacji liganda witaminowego;
- opracowanie warunków prowadzenia syntezy pirazynowych kompleksów Ru(III) w *N,N*-dimetyloformamidzie;
- zaprojektowanie, otrzymanie kompleksów Cu(II) z pirydoksamina (**3**) i pirydoksyną (**4**) oraz zaproponowanie wykorzystania ich jako wskaźników alkacymetrycznych nowej generacji;
- zaprojektowanie i otrzymanie metalofarmaceutyku (**5**) o selektywnych właściwościach antymikotycznych;
- eksperymentalne potwierdzenie teorii w chemii koordynacyjnej dotyczące efektu wzmocnienia aktywności biologicznej aktywnych w stanie wolnym ligandów uzyskanego wskutek ich kompleksowania z jonami metali bloku d;
- zebranie dowodów badań naukowych stanowiących obszerną bazę danych (wiedzy) na temat profili bionieorganicznych (opisów właściwości) aromatycznych układów *N*-heterocyklicznych i ich nowych połączeń koordynacyjnych z jonami metali bloku d, to jest nowe struktury i profile dwóch pochodnych pirazyny oraz ośmiu nowych, w pełni scharakteryzowanych związków kompleksowych (**1**)-(8).

Perspektywy naukowo-badawcze zainicjowane wynikami osiągnięcia naukowego

Realizacja zadań badawczych pracy [H9] stała się inspiracją tematyki nowego wniosku projektowego (MINIATURA) złożonego przeze mnie do NCN. Zastosowanie typowych elektrod, platynowa (Pt) i szklista węglowa (GCE), oraz nowego, czułego sensora elektrochemicznego, elektroda szklista węglowa zmodyfikowana poliglicyną, w woltamperometrii cyklicznej wykazała wysoką zbieżność wyników (w aspektach wartości oraz kierunku zmian potencjału) dotyczących przebiegu równowagowych procesów deprotonowania tworzących się kolejno form jonowych *PAOX*. Problem badawczy, którego rozwiązania się podjęłam w projekcie, dotyczył ustalenia kryteriów doboru aminokwasu i określenia warunków prowadzenia elektropolimeryzacji prowadzących do otrzymania sensora/-ów czułego/-ych względem pochodnych pirazyny (wybranych analogów strukturalnych pirazynamidu i bortezomibu (*BM*) leku przeciwnowotworowego. Główny cel projektu to opracowanie metodologii do analiz ilościowych połączone z ustaleniem progów detekcji tej klasy związków. Tworzenie nowych rozwiązań, jak proponowane modyfikacje GCE, może prowadzić do pozyskania wiedzy na temat sposobu projektowania kolejnych powierzchni sensorów, ich trwałości i użyteczności w analizach diagnostycznych. Rozwój powtarzalnych, czułych oraz niezawodnych metod analitycznych do oznaczania leku w płynach biologicznych i/lub preparatach farmaceutycznych wydaje się kluczowy do monitorowania skuteczności leczenia lub ustalania właściwej dawki substancji aktywnej w leku/preparacie. Literatura oferuje w tym zakresie różne rozwiązania: aktywny film zawierający poli-L-metioninę i elektrochemicznie zredukowany tlenek grafenu/GCE do wykrywania *PZA* w moczu, osoczu, farmaceutykach; analiza ilości *PZA* w surowicy krwi przy użyciu tlenu grafenu na zmodyfikowanej poli-L-argininą GCE czy oznaczanie *PZA* w farmaceutykach, moczu, surowicy krwi przy użyciu GCE zmodyfikowanej tyrozyną. W roku 2016 zaprezentowano sensor woltametryczny uzyskany w wyniku elektropolimeryzacji L-GLY na GCE, który pomyślnie wykorzystano do określania śladowych ilości *PZA* metodą SWV. Wstępne badania tą metodą dowiodły elektrokatalityczną aktywność poli(GLY)/GCE w układzie redoks *PZA* (pH 7,5) stanowiącym proces kontrolowany dyfuzyjnie, a optymalizacja warunków metody SWV dała liniową odpowiedź ($R=0,998$) w zakresie stężeń pirazynamidu od 0,47 do 6,15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ z granicą wykrywalności leku już na poziomie 0,035 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ oraz limitem ilościowym równym 0,12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Ponadto, nie odnotowano ingerencji matrycy rzeczywistych próbek w woltametryczną reakcję *PZA*, a sposób oznaczeń (bez utraty próbki!)

uznano za wysoce selektywny, szybki i tani w porównaniu z innymi, znanymi i rutynowo stosowanymi procedurami analitycznymi.

Realizacja wspomnianego projektu pozwoliłaby więc na wstępne opracowanie uniwersalnej metody oznaczeń aktywnych pochodnych pirazyny, możliwej do wykorzystania w przyszłości jako procedura stosowana w diagnostyce medycznej (ustalanie skuteczności leczenia lub minimalizowanie skutków ubocznych wynikających z zastosowania niewłaściwej dawki substancji czynnej). Omówiony projekt uzyskał pełną akceptację i przychyłność ze strony zarówno Ekspertów jak i Recenzentów Narodowego Centrum Nauki lecz wskutek braku funduszy nie został skierowany do finansowania.

Leki przeciwbakteryjne, antybiotyki stosowane w leczeniu lub nowo odkryte substancje, mogące pełnić rolę ligandów wiążących metaliczne centra jonowe, to mój kolejnym obiekt zainteresowań naukowych. Wykazanie spotęgowanej aktywności tego typu metalofarmaceutyku to wyzwanie naukowe podejmowane przez badaczy (chwilowo bez sukcesów w pozyskaniu monokryształu takiego połączenia koordynacyjnego) z zakresu chemii koordynacyjnej.

Równowagowe reakcje chelatowania jonów metali zachodzące w naszym otoczeniu to kolejna, rozważana przeze mnie tematyka badawcza. Trwałe wiązanie toksyn (usuwanie nadmiarowych ilości jonów metali lub toksycznych metabolitów powstałych z dodatków do żywności) obecnych w organizmie połączone z ich wydalaniem w formie kompleksu lub trwałe wiązanie (organicznych lub nieorganicznych) zanieczyszczeń środowiskowych skutkujące ich neutralizacją to niektóre z pozytywnych aspektów kierunków badań rozważanych przeze mnie do realizacji.

Potencjał badawczo-aplikacyjny powyższej tematyki oraz wykorzystanie posiadanych, na tym etapie rozwoju naukowego, umiejętności eksperymentalnych i wiedzy praktyczno-teoretycznej prowadzenia syntez metalofarmaceutyków może być pomocne w uzyskaniu pożądanego monokryształu antybiotykowego kompleksu jonu metalu celem przeprowadzenia analiz strukturalnych i badań opisujących jego nowe właściwości, działanie oraz aktywność.

Cytowana literatura

- [1] M. J. Clarke, *Ruthenium metallopharmaceuticals*, *Coord. Chem. Rev.*, 232: 69-93 (2002).
- [2] A. Jurowska, K. Jurowski, J. Szkarlarzewicz, B. Buszewski, T. Kalenik, W. Piekoszewski, *Molybdenum Metallopharmaceuticals Candidate Compounds – The “Renaissance” of Molybdenum Metallodrugs?*, *Curr. Med. Chem.*, 23: 3322-3342 (2016).
- [3] C. R. Munteanu, K. Suntharalingam, *Advances in cobalt complexes as anticancer agents*, *Dalton Trans.*, 44: 13796-13808 (2015).
- [4] J. Esteve-Romero, M. E. Caplla-Peiro, L. Monferrer-Pons, M. Gil-Agusti, *Micellar liquid chromatography in clinical chemistry: application to the monitorization of B₆ vitamins*, *Clin. Chim. Acta*, 348: 69-77 (2004).
- [5] M. M. Manore, *Vitamin B₆ and exercise*, *Int. J. Sport Nutr.*, 4: 89-103 (1994).
- [6] M. Parra, S. Stahl, H. Hellmann, *Vitamin B₆ and Its Role in Cell Metabolism and Physiology*, *Cells*, 7: 84 doi: 10.3390/cells7070084 (2018).
- [7] A.-Ch. Chamayou, M. A. Neelakantan, S. Thalamuthu, Ch. Janiak, *The first vitamin B₆ zinc complex, pyridoxinato-zinc acetate: a 1D coordination polymer with polar packing through strong inter-chain hydrogen bonding*, *Inorg. Chim. Acta*, 365: 447-450 (2011).
- [8] M. Stehr, A. A. Elamin, M. Sigh, *Pyrazinamide: the importance of uncovering the mechanism of action in mycobacteria*, *Expert Rev. Anti Infect Ther.*, 13: 1-11 (2015).
- [9] E. T. Stiller, J. C. Keresztesy, J. R. Stevens, *Structure of vitamin B₆. I*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 61: 1237-1242 (1939).
- [10] S. A. Harris, T. J. Webb, K. Folkers, *Chemistry of vitamin B₆. I. Tautomerism*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 62: 3198-3203 (1940).
- [11] M. Hochberg, D. Melnick, B. L. Oser, *Chemical determination of pyridoxine. Reactions in pure systems*, *J. Biol. Chem.*, 155: 109-117 (1944).
- [12] V. Oplajewa, J. Hartel, A. Patel, K. Jr. Palat, V. Buchowa, *Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents*, *II Farmaco*, 57: 135-144 (2002).
- [13] A. T. Balaban, D. C. Oniciu, A. R. Katritzky, *Aromaticity as a cornerstone of heterocyclic chemistry*, *Chem. Rev.*, 104, 2777-2812 (2004).
- [14] A. Somoskovi, M. M. Wade, Z. Sun, *Iron enhances the antituberculous activity of pyrazinamide*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 53: 192-196 (2004).
- [15] Y. Zhang, W. Shi, W. Zhang, *Mechanism of pyrazinamide action and resistance*, *Microbiol. Spectr.*, 2: 1-12 (2013).
- [16] N. A. Dillon, N. D. Peterson, B.C. Rosen, *Pathothenate and panthetheine antagonize the antitubercular activity of pyrazinamide*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58: 7258-7263 (2014).
- [17] Y. Zhang, D. Mitchison, *The curious characteristics of pyrazinamide: a review*, *J. Tuberc. Lung Dis.*, 7: 6-21 (2003).
- [18] A. Katirtzi, *Amidoximes as intermediates for the synthesis of potential drugs*, rozprawa doktorska, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis, (2015).
- [19] C. Vaughan, *Ximelagatran (Exanta): Alternative to warfarin?*, *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.*, 18: 76-80 (2005).
- [20] P. P. Dobesh *Ximelagatran: Pharmacology, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics*, *Pharmacotherapy*, 24: 169S-178S (2004).
- [21] D. Schade, J. Kotthaus, L. Riebling, J. Kotthaus, H. Muller-Fielitz, W. Raasch, O. Koch, N. Seidel, M. Schmidtke, B. Clement, *Development of novel potent orally bioavailable oseltamivir derivatives active against resistant influenza*, *Am. J. Med. Chem.*, 57: 759-769 (2014).

- [22] H. Southworth, *Predicting potential liver toxicity from phase 2 data: a case study with ximelagatran*, *Statist. Med.*, 33: 2914-2923 (2014).
- [23] R. J. Fontana, *Pathogenesis of idiosyncratic drug-induced liver injury and clinical perspectives*, *Gastroenterology*, 146: 914-928 (2014).
- [24] G. Bardos, K. Moricz, L. Jaszlits, G. Rablocky, K. Tory, I. Racz, S. Bernath, B. Sumegi, B. Farkas, B. Lietrati-Nagy, *BGP-15, a hydroximic acid derivative, protects against cisplatin- or taxol-induced peripheral neuropathy in rats*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 190: 9-16 (2003).
- [25] Z. Sarszegi, E. Bognar, B. Gaszner, A. Konyi, F. Jr. Gallyas, Z. Berente, *BGP-15, a PAPR-inhibitor, prevents imatinib-induced cardiotoxicity by activating Akt and suppressing JNK and p38 MAP kinases*, *Mol. Cell Biochem.*, 365: 129-137 (2012).
- [26] P. V. Narayana, T. M. Reddy, P. Gopal, G. R. Maidu, *Electrochemical sensing of paracetamol and its simultaneous resolution in the presence of dopamine and folic acid at a multi-walled carbon nanotubes/poly(glycine) composite modified electrode*, *Anal. Methods*, 6: 9459-9468 (2014).
- [27] J. Kostrowicki, A. Liwo, *DECFAM - A new computer-oriented algorithm for the determination of equilibrium constants from potentiometric and/or spectrophotometric measurements - II*, *Comput. Chem.*, 8: 101-105 (1984).
- [28] J. Kostrowicki, A. Liwo, *A general method for the determination of the stoichiometry of unknown species in multicomponent systems from physicochemical measurements*, *Comput. Chem.*, 11: 195-210 (1987).
- [29] J. Kostrowicki, A. Liwo, K. Sokolowski, *A comparative study on some methods for computing of equilibrium concentrations*, *Comput. Chem.*, 12: 293-299 (1988).
- [30] J. Kostrowicki, A. Liwo, *Determination of equilibrium parameters by minimization of an extended sum of squares*, *Talanta*, 37: 645-650 (1990).
- [31] B. Serli, E. Iengo, T. Gianferrara, E. Zangrando, E. Alessio, *Novel unsymmetrical Ru(III) and mixed-valence Ru(III)/Ru(II) dinuclear compounds related to the antimetastatic Ru(III) drug NAMI-A*, *Met. Drug.*, 8: 9-18 (2001).
- [32] R. L. Williams, N. H. Toft, B. Winkel, K. J. Brewer, *Synthesis, characterization, and DNA binding properties of a series of Ru, Pt mixed-metal complexes*, *Inorg. Chem.*, 42: 4394-4400 (2003).
- [33] A. Gomathi, P. Vijayan, P. Viswanathamurthi, S. Suresh, R. Nandhakumar, T. Hashimoto, *Organoruthenium(II) compounds with pyridyl benzoxazole/benzthiazole moiety: Studies on DNA/protein binding and enzyme mimetic activities*, *J. Coord. Chem.*, 70: 1645-1666 (2017).
- [34] M. Pongratz, P. Schluga, M. A. Jakupec, V. B. Arion, Ch. G. Hartinger, G. Allmaier, *Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy*, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 19: 46-51 (2004).
- [35] M.G. Sauaia, R.G. de Lima, A.C. Tedesco, R.S. da Silva, *Photoinduced NO release by visible light irradiation from pyrazine-bridged nitrosyl ruthenium complexes*, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 14718-14719 (2003).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)

Chemia koordynacyjna i osiągnięcia bezpośrednio z nią związane stanowią obiekt moich zainteresowań od czasu studiów, ukończonych w trybie przyspieszonym (4-letnim) w efekcie fascynacji podjętą tematyką badawczą oraz chęcią dalszego rozwoju naukowego. Pierwszy etap kształcenia dotyczył badań kinetyki i mechanizmu reakcji wychwytu rodnika tlenu azotu(IV) przez jon koordynacyjny typu: $cis-[Cr(C_2O_4)(L-L)(OH_2)_2]^{3+}$ z pirydoksaminą oraz histaminą (L-L) metodą zatrzymanego przepływu. Uzyskane wyniki przyczyniły się do sformułowania kolejnych celów i problemów badawczych, rozwiązania których podjęłam się w rozprawie doktorskiej. Obiekt badawczy stanowiły konsekwentnie eksperymentalne pomiary reakcji wiązania rodnika tlenu azotu(IV), odpowiedzialnego za powstawanie ostrego zapalenia trzustki, przez mieszanoligandowe połączenia jonów Cr(III) i Co(III) z ligandami aktywnymi biologicznie (aminocukry, 1,10-fenantrolina, 2,2'-bipirydył, histamina, pirydoksamina, aniony szczawianowe). Efektem realizacji powyższej tematyki rozprawy doktorskiej było opracowanie i zweryfikowanie procedury analitycznej ilościowego oznaczania rodnika tlenu azotu(IV) w materiale biologicznym. Detekcja wykorzystywała aminocukrowy związek kompleksowy jonu Cr(III) jako biosensor reagujący stechiometrycznie z czynnikiem wychwytywanym.

Badania naukowe realizowane po doktoracie mogę sklasyfikować jako: (i) interdyscyplinarne, stanowiące pogranicze chemii, farmacji i biotechnologii; (ii) wykorzystujące najnowsze osiągnięcia chemii koordynacyjnej, bionieorganicznej, organicznej i analitycznej oraz (iii) dostosowane do aktualnych trendów w nauce, ceniących wyniki o zastosowaniu praktycznym i posiadające charakter wdrożeniowy. Udokumentowany, wynikami badań wstępnych, potencjał aplikacyjny projektów to wymóg formalny instytucji finansujących obecnie badania naukowe i prace rozwojowe. W związku z powyższym, koncepcja i tematyka badań ocenianego etapu rozwoju naukowego uwzględniła: (i) zastosowanie większej ilości układów badawczych, w tym liczby ligandów aktywnych oraz tworzonych przez nie kompleksów z jonami metali bloku d; (ii) wykorzystanie nowych metod eksperymentalnych charakteryzujących naturę badanych układów i rozwijających umiejętności eksperymentalne; (iii) nawiązanie współpracy z innymi ośrodkami naukowymi w celu wypracowania nowatorskiego charakteru badań i ustalenia potencjału aplikacyjnego układów badawczych zaplanowanych do otrzymania (aktywności mikrobiologicznej, cytotoksyczności, interakcji z biomolekułami).

Prowadzona bezpośrednio po uzyskaniu stopnia doktora praca eksperymentalna dotyczyła otrzymywania związków kompleksowych Co(III) z chelatującymi ligandami

N,N-donorowymi; 1,2-diaminoetanem (en) oraz 1,3-diaminopropanem (dap). Wyniki badań chemicznych w postaci pełnego opisu właściwości fizykochemicznych nowo otrzymanych związków wykorzystano jako wstępne dane pomocne w wyborze metodologii prowadzenia pomiarów mikrobiologicznych z ich udziałem. Co ciekawe, wykazywana aktywność obydwu połączeń koordynacyjnych Co(III) dotyczyła tworzonego przez mikroorganizmy bakteryjne – biofilmu. Tematyka opisana w artykule, **A. Chylewska et al.**, *Inter. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.*, 2: 454-464; 2013, jest nadal kontynuowana przez grupę farmaceutów z GUMed-u.

Kolejne syntezy doprowadziły do uzyskania monokryształów związku koordynacyjnego Co(II) z dwoma, anionami szczawianowymi. Wykonana pełna analiza strukturalna połączona z opisem właściwości fizyko-chemicznych nowego materiału została opublikowana w pracy **A. Chylewska et al.**, *Centr. Europ. J. Chem.*, 11: 1, 8-15; 2013. Wyniki opisane w artykule pozwoliły na ustalenie warunków syntezy otrzymywania kompleksów z jonem kobaltu na +II stopniu utlenienia, którego związki są rzadko spotykane z uwagi na niską stabilność. Warto zauważyć, że substratem stosowanym w omawianej preparatyce jest chlorek kobaltu(III), a do redukcji centrum koordynacji dochodzi w momencie wiązania się z formą anionową ligandów szczawianowych.

Realizowane badania eksperymentalne obejmowały też krótkie projekty zlecone w zakresie nawiązanej współpracy naukowej. Jeden z rozwiązanych przeze mnie problemów badawczych dotyczył ustalenia metody jakościowego oznaczania nanocząstek srebra tworzonych z udziałem ekstraktów roślinnych. Synteza nanoproductów była prowadzona na dwa sposoby, z temperaturą lub z mikrofalową inicjacją reakcji. Zaproponowana, wykonana i potwierdzona przeze mnie metoda spektrofotometrycznej (UV-Vis oraz IR) charakteryzacji układów badawczych wraz z zarejestrowanym całkowitym przebiegiem reakcji tworzenia nanocząstek srebra wykazały brak rozróżnialności produktów w obrębie syntez inicjowanych różnymi czynnikami, co zostało opisane w publikacji **R. Banasiuk et al.**, *Arab. J. Chem.*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.11.013>, ujętej w dorobku naukowym.

Ostatni z opublikowanych materiałów to praca przeglądowa na temat technik detekcji i separacji mikroorganizmów w diagnostyce medycznej. Praca **A. Chylewska et al.** *Curr. Med. Chem.*, doi: 10.2174/0929867324666171023164813; 26: 1-45 (2019), jest efektem moich zainteresowań procedurami analitycznymi oraz nabytego doświadczenia w pracy z mikroorganizmami.

Agnieszka Chylewska