



UNIWERSYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego z OAM

dr hab. Justyna Brasuń, prof. nadzw.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSIEJ

mgr inż. Anny Skoczyńskiej pt.: "II-elektronowe związki kompleksowe Ru(II) z wybranymi ligandami o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej".

Promotor pracy - prof. dr hab. n.farm. Elżbiety Budzisz

Celem przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej mgr inż. Anny Skoczyńskiej pt.: "II-elektronowe związki kompleksowe Ru(II) z wybranymi ligandami o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej" było poszukiwanie związków arenowych związków kompleksowych Ru(II) z ligandami, będącymi pochodnymi kumaryny i chromonu wykazujących aktywność cytotoksyczną.

Choroby nowotworowe, to druga (po chorobach naczyniowo-sercowych) przyczyna zgonów. W związku z tym, od lat trwają intensywne badania nad poszukiwaniem leków, które mogłyby być stosowane w terapii chorób nowotworowych. Jedną z takich grup związków, są kompleksy metali przejściowych. Pierwszym kompleksem, który znalazł zastosowanie w tej terapii, jest *cisplatyna*. Kompleks ten z powodzeniem stosowany jest w leczeniu nowotworów raka jąder czy jajników. Poza tym jest wykorzystywany w terapiach skojarzonych, w tym nowotworów pęcherza moczowego, płuc, raka głowy i szyi. W związku z tym, nastąpił intensywny rozwój badań nad poszukiwaniem nowych, bardziej skutecznych i selektywnych chemoterapeutyków. Związki rutenu (II)/(III), po Pt(II)/Pt(IV), Au(I)/(III) czy Ti(IV), są najczęściej badanymi związkami, w kierunku możliwości wykorzystania ich w terapii przeciwnowotworowej. Zaletami związków rutenu w porównaniu do związków platyny jest to, iż są one mniej toksyczne i wykazują odmienny sposób działania. W chwili obecnej dwa kompleksy rutenu (III) KP1019 wykazują aktywność

przeciwnowotworową oraz NAMI-A, który charakteryzuje się aktywnością przeciwprzerzutową, przeszły do drugiej fazy badań klinicznych.

W związku z powyższym, temat podjęty przez Doktorantkę, jest tematem niezwykle istotnym i wpisuje się ogólnościowo nurt badań nad poszukiwaniem nowych związków kompleksowych, które mogłyby być stosowane w terapii. Niniejszą pracą, Doktorantka wykonała w Zakładzie Chemii Surowców Kosmetycznych kierowanym przez panią prof. dr hab. n. farm. Elżbietę Budzisz, która prowadzi badania nad kompleksami różnych metali, takimi jak Pt(II); Pd(II); Cu(II); Zn(II); Ru(II) w aspekcie zastosowania ich w leczeniu

Układ pracy jest typowy dla prac eksperymentalnych. Została ona przedstawiona w formie 195-o stronicowego opracowania, które zostało podzielone na XI głównych rozdziałów. Dodatkowym wsparciem niniejszej rozprawy jest 71 rysunków, 6 schematów oraz 18 tabel.

W rozdziale pierwszym, którym jest Wstęp, Doktorantka zwięźle wprowadza Czytelnika w problematykę stosowania kompleksów metali przejściowych w terapii przeciwnowotworowej a w szczególności kompleksów rutenu.

43-stronicowy Przegląd Literatury napisany jest starannie, a przekazywane treści mają jasny charakter. Bez wątplenia Doktorantka bardzo dobrze zna tematykę i stan dotychczasowej wiedzy dotyczący badanych przez siebie układów. Świadczyć o tym może zamieszczenie aż 233 trafnych pozycji literaturowych.

Pierwsze podrozdziały to szczegółowy opis właściwości chemicznych oraz biologicznych rutenu (II)/(III), toksyczność związków Ru(III) oraz zdolność tego pierwiastka do naśladowania jonów żelaza (III), a przede wszystkim opis właściwości znanych związków rutenu, które były otrzymane i przebadane w kierunku ich właściwości przeciwnowotworowych. Zasługującym na podkreślenie jest to, że Doktorantka nie skupiła się tylko na aktywności przeciwnowotworowej związków rutenu, ale także np. na badaniach nad ich właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, możliwością wykorzystania ich w terapii fotodynamicznej czy projektowania związków rutenu (II) do oznaczania przepływu elektronów peroksydazy cytochromu c.

W związku z tym, iż prezentowana praca dotyczy arenowych kompleksów rutenu (II) z pochodnymi kumaryn, ostatnim zagadnieniem, jaki Doktorantka omawia w tym rozdziale są pochodne kumaryny, ich występowanie, właściwości lecznicze ze

szczególnym uwzględnieniem właściwości przeciwnowotworowych oraz ich związku ze strukturą liganda.

Tak jak wspomniałam we wstępie, głównym celem niniejszej pracy było poszukiwanie nowych arenowych kompleksów rutenu (II) z ligandami będącymi pochodnymi kumaryny i chromonu. W celu realizacji założonego celu Doktorantka podzieliła pracę na dwie części. Pierwszą z nich jest część chemiczna, w której została opisana synteza odpowiednich ligandów oraz otrzymanie ich kompleksów, a także charakterystyka ich właściwości fizykochemicznych. W drugiej części pracy zostały przeprowadzone badania biologiczne polegające na oznaczeniu cytotoksyczności otrzymanych związków względem ludzkich nowotworowych linii komórkowych: białaczki szpikowej HL-60, białaczki limfoblastycznej NALM-6, czerniaka WM-115, raka okrężnicy COLO205, raka szyjki macicy HeLa, trzustki CFPAC, przewlekłej białaczki szpikowej K562 w warunkach *in vitro* za pomocą testu MTT. Ponadto została dokonana ocena procentowego stopnia uszkodzeń DNA w komórkach białaczki limfoblastycznej NALM-6 za pomocą testu kometowego dla wyselekcjonowanych związków.

Istotną częścią pracy jest 61-stronicowy rozdział „Wyniki i Dyskusja” oraz „Wnioski”, w których Autorka szczegółowo opisuje przebieg procesu otrzymania wybranych ligandów oraz kompleksów, wyniki analizy strukturalnej z zastosowaniem metody NMR, IR, MS oraz analizy elementarnej, ich właściwości fizykochemiczne oraz aktywność biologiczną.

Do badań zostało wybranych 11 ligandów, z których Doktorantka zsyntetyzowała pięć wcześniej opisanych w literaturze ligandów). Ligandy zostały podzielone na cztery grupy: Do grupy I należą aminopochodne kumaryny: 3-amino-2*H*-1-benzopiran-2-on (3-aminokumaryna) (**a**), 7-amino-4-metylo-2*H*-1-benzopiran-2-on (7-amino-4-metylokumaryna) (**b**), 6-amino-2*H*-1-benzopiran-2-on (6-aminokumaryna) (**c**). Do II grupy należą ich hydroksylowe odpowiedniki: 3-hydrokso-2*H*-1-benzopiran-2-on (3-hydroksykumaryna) (**d**), 4-hydrokso-2*H*-1-benzopiran-2*H*-1-on (4-hydroksykumaryna) (**e**); 7-hydrokso-2*H*-1-benzopiran-2-on (7-hydroksykumaryna) (**f**). Do III grupy należą związki posiadające w pozycji C-3 podstawniki aminoetylideno/amonobenzylideno-: (3-(1-aminobenzylideno)-2*H*-chromeno-2,4-(3*H*)kumaryny (**g**), (3-(1-aminometyleno)-2*H*-chromeno-2,4 (3*H*)-kumaryny (**h**), tiosemikarbazyd 3-acetylo-2*H*-1-benzopiran-2-onu (tiosemikarbazyd 3-acetylokumaryny) (**i**), natomiast do IV grupy związki nie należące do wyżej wymienionych grup: ester metylowy kwasu 5-(2-hydroksyfenylo)-3-metylo-1-

(2-pirydylo)-1*H*-pirazolo-4-karboksyłowego (**j**) oraz 6-amino-4*H*-1-benzopiran-4-on (6-aminochromon) (**k**). Doktorantka otrzymała dziewiętnaście nowych, dotychczas nie opisanych arenowych kompleksów Ru (II) z wyżej wymienionymi ligandami. Do syntezy zostały wykorzystane dimery dichloro(η^6 -*p*-cymenu)Ru(II) (**1**); dichloro(η^6 -heksametylobenzenu)Ru(II) (**2**) oraz dichloro(η^6 -benzenu)Ru(II) (**3**). Struktury kompleksów potwierdzono za pomocą metod spektroskopowych: ¹H NMR, MS, IR oraz analizy elementarnej. Natomiast struktury trzech z nich zostały potwierdzone na podstawie analizy krystalograficznej. Dla kompleksów z ligandami aminokumarynowymi (a/b) zostały także wykonane pomiary fluorescencyjne, wskazujące na tworzenie wiązania koordynacyjnego z jonem rutenu (II) oraz badania aktywności elektrochemicznej z wykorzystaniem voltamperometrii cyklicznej. Tu pojawia się moje pytanie: Na jakiej podstawie Doktorantka wybrała związki do badań fluorescencyjnych i elektrochemicznych? W jakim celu zostały wykonane badania elektrochemiczne?

Porównanie widm UV-Vis wykonanych po 0, 24 i 48 godzinach pozwoliło Doktorantce na określenie stabilności otrzymanych kompleksów. Wszystkie badane związki, za wyjątkiem trzech, były stabilne. W przypadku kompleksu (**2a**) zaobserwowano zmianę położenia maksimum absorpcji dla pasma przy 237 nm (po 24h nastąpiło przesunięcie w kierunku fal krótszych, 230,5 nm, natomiast po 48 godzinach do 239 nm). W układzie z kompleksem (**1d**) po 24 h pasmo położone przy 239,5 nm uległo przesunięciu do 230,5 nm, natomiast dalsza inkubacja związku nie spowodowała kolejnych zmian w położeniu pasma. Natomiast w przypadku (**2j**), inkubacja przez 24h i 48h wpłynęła nie na położenie pasm, ale na ich intensywność.

Kolejnym parametrem, jaki został określony dla wszystkich badanych związków, było określenie ich lipofilności, wyrażonej w postaci parametru log*P*, wyznaczonego za pomocą metody RP-TLC. Przeprowadzone badanie wykazało, iż większość kompleksów charakteryzuje się średnią lipofilnością (wartość log*P* ok. 2) natomiast dla dwóch związków 4-hydroksykumaryny z dimerami: dichloro(η^6 -*p*-cymenu)Ru(II) (**1**) oraz dichloro(η^6 -benzenu)Ru(II) ujemna wartość log*P* (-0,02) sugeruje hydrofilowy charakter tych związków.

W drugiej części przedstawionej pracy, zostały przedstawione wyniki badań biologicznych. W pierwszym etapie określono przeżywalność nowotworowych linii komórkowych HeLa, K562, CFPAC wobec wybranych związków kompleksowych z

ligandami aminokumarynowymi. Zastanawiam się, co było podstawą wyboru akurat tych kompleksów. Analiza otrzymanych wyników wykazała, że badane kompleksy nie są cytotoksyczne. Drugim etapem badań, było określenie cytotoksyczności wszystkich otrzymanych kompleksów i ligandów względem nowotworowych linii komórkowych HL-60, NALM-6, WM-115, COLO-205.


Otrzymane wyniki pokazały, iż generalnie badane związki wykazują słabą cytotoksyczność wobec wybranych linii komórek nowotworowych. Niemniej jednak, na szczególną uwagę, tak jak słusznie zauważyła Doktorantka w rozdziale V, zasługuje zsyntetyzowany tiosemikarbazyd 3-acetylokumaryny oraz trzy kompleksy. tiosemikarbazyd 3-acetylokumaryny wykazuje wyższą, w porównaniu do pozostałych badanych ligandów cytotoksyczność, ale także znacznie wyższą cytotoksyczność w porównaniu do karboplatyny w odniesieniu do linii komórkowych WM-115 oraz COLO 205. Kompleks **1h**, wykazał znacznie wyższą cytotoksyczność w stosunku do linii komórkowych WM-115 niż karboplatyna, kompleks **2c**, wykazał porównywalną do cisplatyny cytotoksyczność wobec linii komórkowych COLO-205 a znacznie wyższą w porównaniu do karboplatyny. Interesującym jest także związek **2j**, który wykazywał najwyższą aktywność cytotoksyczną w porównaniu do pozostałych kompleksów, badanych ligandów oraz zdecydowanie wyższą cytotoksyczność (w porównaniu do karboplatyny) wobec linii komórkowych WM-115 oraz COLO-205 ale także porównywalne do cisplatyny działanie wobec linii komórkowej COLO-205.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka stwierdziła, iż położenie grupy karbonylowej w cząsteczce ligandów: 6-aminokumaryny oraz 6-aminochromon nie wpływa na ich cytotoksyczność, podstawnik arenowy wpływa na aktywność cytotoksyczną badanych związków i co jest bardzo interesujące, mimo wyższej hydrofilności związków: **1e** i **3e**, wykazują one znacznie niższe wartości IC₅₀ w porównaniu do związków **1d** i **1f**, które są związkami bardziej lipofilnymi.

Na podstawie wyników otrzymanych z badań nad cytotoksycznością badanych związków, wyselekcjonowano kompleksy **2c**, **1e**, **3e**, **1i**, **1j**, **2j** oraz ligandy, w celu określenia procentowego uszkodzenia DNA. Okazało się, iż wywołują one uszkodzenia DNA w komórkach NALM-6 do określonego stężenia a wyjątkiem jest ligand **i**, dla którego procent uszkodzonego DNA wzrasta wraz ze wzrostem stężenia w całym zakresie stosowanych stężeń.

Przechodząc do końcowej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że stanowi ona wartościowy wkład do badań nad poszukiwaniem nowych kompleksów Ru(II) jako potencjalnych terapeutyków do stosowania w leczeniu chorób nowotworowych. Uzyskane wyniki są interesujące i poszerzają naszą wiedzę na ten temat. Pojawienie się w tekście drobnych niedociągnięć językowych i typograficznych takich jak np.: - we wstępie: "*Kompleksy metali przejściowych stanowią klasę chemoterapeutyków, które są wykorzystywane jako związki przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe do celów terapeutycznych.*", - wniosek 8 "*Przeżywalność związków kompleksowych 1a, 2a, 4a, 1b, 3b zbadano wobec nowotworowych linii komórkowych HeLa, K562, CFPAC i okazało się, że badane związki kompleksowe nie są w ogóle toksyczne dla badanych komórek.*" powinno być chyba "*Przeżywalność nowotworowych linii komórkowych HeLa, K562, CFPAC zbadano wobec związków kompleksowych*", - niekonsekwentny zapis struktur ligandów arenowych (np.: str 71, Rys.IV. 1.3.1. raz struktury pierścieni aromatycznych są zaprezentowane w postaci uproszczonego wzoru Kekulego a raz w postaci sekstetu zdelokalizowanych elektronów) **nie mają żadnego wpływu na stronę merytoryczną pracy.**

Oceniając wysoko poziom badań naukowych przedstawionych w rozprawie doktorskiej w konkluzji wyraźnie stwierdzam, że przedstawiona przez Doktorantkę rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie o stopniach i tytułach naukowych z dnia 14 marca 2003 r. i wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Anny Skoczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, biorąc pod uwagę nakład pracy i wartość naukową przedstawionej pracy wnioskuję do Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
CHEMII NIEORGANICZNEJ
kierownik

dr hab. Justyna Brasun, prof. nadzw.