



**Centrum Badań Molekularnych  
i Makromolekularnych PAN  
Zakład Chemii Bioorganicznej,  
Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź**

---

Dr hab. Piotr Guga,  
tel: 42-6803248;  
e-mail: pguga@cbmm.lodz.pl

**Recenzja  
rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Skoczyńskiej  
z tytułem „II-elektronowe związki kompleksowe Ru(II) z wybranymi ligandami  
o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej”**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr inż. Anny Skoczyńskiej została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Elżbiety Budzisz w Zakładzie Chemii Surowców Kosmetycznych Katedry Kosmetologii na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595) „Rozprawa doktorska, przygotowywana pod opieką promotora, powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego lub artystycznego oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej lub artystycznej, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej.”, zatem moja opinia dotyczy tych właśnie aspektów dysertacji.

Rozprawa obejmuje syntezę związków kompleksowych Ru(II) z pochodnymi kumaryny (amino- i hydroksykumaryny) i pirazolu, w których jon rutenu zaangażowany jest w oddziaływanie z elektronami  $\pi$  cząsteczki p-cymenu, benzenu lub heksametylobenzenu, a także określenia ich struktury metodami spektralnymi, ustalenia wybranych właściwości fizykochemicznych, jak również określenia ich aktywności cytotoksycznej. Waga tego zagadnienia nie podlega dyskusji, ponieważ od wielu lat w obszarze chemii metaloorganicznej prowadzone są badania nad syntezą i właściwościami kompleksów, które rozszerzyłyby listę obecnie dostępnych i stosowanych związków p/nowotworowych lub nakierowanych na zwalczanie bakterii, wirusów lub zakażeń grzybiczych. Termin *cis*-platyna jest chyba najbardziej rozpoznawanym w społeczeństwie pojęciem związanym z chemią metaloorganiczną, chociaż zetknięcie się z nim zwykle odbywa się w przykrych albo nawet dramatycznych okolicznościach. Jak ogromna większość chemoterapeutyków stosowanych w

terapiach p/nowotworowych również kompleksy metali przejściowych mają niesatysfakcjonujący indeks terapeutyczny i ich stosowanie nieuchronnie prowadzi do trudnych do zaakceptowania skutków ubocznych. Dlatego też trwa wyętzona praca chemików, biochemików, biologów molekularnych i lekarzy w celu znalezienia związków o cytotoksyczności wysokiej, ale jednocześnie selektywnie nakierowanej na komórki nowotworowe, aczkolwiek wiele jest też do zrobienia dla efektywniejszego stosowania już znanych leków. Toksyczność i aktywność związków rutenu(III) i rutenu(II) oraz mechanizmy ich działania, aspekty strukturalne, oddziaływania z białkami, a także występowanie i lecznicze właściwości kumaryn (stosowanych w pracy jako ligandy) omówione są w prawie pięćdziesięciostronicowej części literaturowej. Oczywiście nie ma sensu spierać się o dobór wątków, bo jest to sprawa osobistego stosunku Autorki do tego ogromnego obszaru poszukiwań i dokonań. O kilku usterkach będę pisał nieco dalej, natomiast w tym miejscu ograniczę się do stwierdzenia, że rozdział czytałem z przyjemnością, bo jest napisany w przemyślany i usystematyzowany sposób i świadczy o dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktorantki.

W pracy obecne są trzy wątki – syntetyczny, fizykochemiczny i biochemiczny. We wszystkich trzech Doktorantka wykonała dużą pracę i chociaż nie udało się uzyskać związków o ponadprzeciętnych właściwościach biologicznych (w tym obszarze badań jest to raczej reguła) to wyniki zebrane dla 19 nowych, dotychczas nie opisanych w literaturze, arenowych związków kompleksowych Ru(II), poszerzyły naszą wiedzę, a to jest przecież istotą badań podstawowych. W wątku fizykochemicznym mgr Skoczyńska określiła trwałość kompleksów, wpływ powstania wiązania koordynacyjnego na zmianę intensywności ich pasm fluorescencji, za pomocą metody RP-TLC wyznaczyła lipofilowość otrzymanych związków kompleksowych oraz zbadala ich aktywność elektrochemiczną z wykorzystaniem woltamperometrii cyklicznej. Ten zestaw technik i wykonanych pomiarów dokumentuje kompleksowe podejście Doktorantki (i Promotora) do badanego zagadnienia. W wątku biochemicznym zbadano cytotoksyczność wobec nowotworowych linii komórkowych HeLa, K562, CFPAC, HL-60, NALM-6, WM-115 i COLO205. Przyznaję, że ten obszar wiedzy jest mi mniej znany, ale Doktorantka ułatwiła mi zapoznanie się z tą częścią rozprawy stosując logiczną i przemyślaną narrację.

Podsumowując osiągnięcia mgr Skoczyńskiej mogę stwierdzić, iż wykonała zadanie badawcze przed nią stojące, jednocześnie budując dający powody do dumy dorobek publikacyjny. W moim przekonaniu wypełnienie pozostałych wymagań ustawowych dotyczących ogólnej wiedzy teoretycznej oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej również nie budzi zastrzeżeń.



Powyższe stwierdzenia jednoznacznie wskazują, jaki będzie końcowy wniosek recenzji, ale zanim do niego dojdę chciałbym podzielić się kilkoma uwagami krytycznymi, jakie nasunęły mi się podczas lektury. Jak w każdym dziele o dużej objętości, w przedłożonej rozprawie (liczącej prawie 200 stron) można znaleźć błędy redaktorskie, jak błędy literowe, składniowe i interpunkcyjne, lub wyrażenia zbyt mocno osadzone w żargonie albo skrótów myślowe prowadzące czasem do zaskakujących efektów. Te sprawy zatem pomijam, chociaż określenia „bidentatny” (np. na str.25), „abundancja” (str. 90), „białko wiążące nukleotydy triady histydynowej” (Wykaz skrótów) lub informacja, że „Przeżywalność związków kompleksowych **1a**, **2a**, **4a**, **1b**, **3b** zbadano wobec nowotworowych linii komórkowych” (pkt.8 we Wnioskach) nie brzmią dobrze. Termin PARPs dotyczy enzymów (polimeraz) produkujących poli(ADP-rybozę) a nie tegoż produktu, co zresztą wprost wynika z angielskiego rozwinięcia tej nazwy zamieszczonego przez Autorkę. Termin „tumor targeting group” obecny w pracy oryginalnej, a w dysertacji umieszczony na Rys. II.8.1., nie powinien być przetłumaczony jako „grupy docelowe dla nowotworów”. Szkoda, że (wbrew zapowiedzi) związki **20** i **21** (str. 28) nie zawierają ligandu dapta. Na Rys. II.13.2.2. tylko jeden związek (substrat) jest narysowany poprawnie. Takich uchybień jest trochę więcej, ale skupię się na kilku elementach, które są na tyle dyskusyjne, iż oczekiwałbym komentarza ze strony Doktorantki. Pozwalam sobie wypisać je w kilku punktach.

1. Autorka podaje na str. 52, że – cytuję - „Stan wzbudzony Ru(II)\*, spowodowany przeniesieniem ładunku z metalu do liganda, jest silnym czynnikiem redukującym, który szybko przenosi elektrony z centrum białkowego (jak np. Fe(III) hemu w cytochromie c (CC))”. Przyznaję, że Rys.II.13.2.1. nie przybliżył mnie do zrozumienia tego procesu. Według mojej tradycyjnej wiedzy, stan wzbudzony spowodowany przeniesieniem ładunku do innej cząsteczki (tu do liganda) to już nie stan wzbudzony tylko stan zjonizowany, a zabranie elektronów (tu z centrum białkowego) to utlenienie a nie redukcja, czyli byłby to czynnik utleniający a nie redukujący. Jeżeli rysunek mówi prawdę, to kwant energii (zapisany jako  $h\nu$ ) powoduje przeniesienie elektronu na wyższy poziom energetyczny (fotowzbudzenie), ale w tym samym atomie. Uprzejmie proszę o wskazanie mi poprawnej drogi rozumowania.
2. Na stronie 76 jest dyskutowane widmo  $^1\text{H}$  NMR związków **1g** i **1h**. Wprawdzie nie udało mi się zlokalizować potrzebnych rysunków IV.2.2.1 i IV.2.2.2, ale uwagę moją przykuł (nieprzywołany w tekście rozprawy) rysunek IV.2.1.8. Najpierw kilka uwag ogólnych. Multiplet obserwowany dla grupy metinowej w *p*-cymenie to septet, bo powstaje na

skutek sprzężenia spinowo-spinowego z 6 jądrami atomów wodoru obecnymi w dwóch magnetycznie równocennych grupach metylowych podstawnika 2-propylowego. Na aparacie 300 MHz taki septet powinien być dobrze widoczny. Po drugie – teoria i praktyka magnetycznego rezonansu jądrowego uczy, że dla systemu AA'BB' w *p*-cymentie dublet dubletów nie jest obrazem oczekiwanym, a ten postulat Autorka umieszcza w dysertacji w kilku miejscach. Na aparacie o częstotliwości podstawowej 300 MHz prędzej będzie to para trypletów, chyba że wystąpi bardzo silny efekt „dachowy” i skrajne linie będą słabo widoczne. Tym niemniej nie można wtedy tego systemu opisywać jako „dublet dubletów”, bo nie ma to fizycznego uzasadnienia. Na marginesie, w *o*-chloro-bromobenzenie (ale i w izomerze *para*), który zawiera klasyczny system AA'BB', można się doszukać ponad 10 linii rezonansowych w jednej połówce centrosymetrycznego klastra (nikomu nie życzę zadania polegającego na rozrysowaniu wszystkich obecnych tam rozszczepionych poziomów energetycznych) i jest to związek często używany do sprawdzenia poprawności pracy spektrometru. Wreszcie problem najważniejszy. Wprawdzie na widmie nie są pokazane „schodki integracyjne”, to na rysunku nie przypisano, a w części doświadczalnej (w opisie na str. 151) nie wykazano sygnałów dla 4 atomów wodoru układu chromenowego. Jest tylko pięcioprotonowy multiplet w zakresie 7,43-7,60 ppm, który ze względu na obecność 5 atomów wodoru należy raczej przypisać podstawnikowi fenyłowemu. Analogiczny problem istnieje w dyskusji struktury związku **1i** na stronie 83, a następnie na stronie 153, gdzie w tych dwóch miejscach nie ma opisanego sygnału odpowiadającego grupie metylowej ugrupowania iminowego. O związku **1i** będzie jeszcze wzmianka w dalszej części recenzji. Myślę, że byłoby z korzyścią, gdyby Doktorantka zaprezentowała odpowiednie widma, ponieważ właściwe udokumentowanie struktur otrzymanych związków to element pracy naukowej, z którego nie można zrezygnować.

3. Niestety, niedostatecznie staranna edycja tekstu daje się zauważyć w znacznej części opisów zamieszczonych w części doświadczalnej. Autorka w opisie widma <sup>1</sup>H NMR ligandu **e** (4-hydroksykumaryny) umieściła sygnał rezonansowy o przesunięciu chemicznym  $\delta$  2,64 ppm. Niestety, cząsteczka 4-hydroksykumaryny nie zawiera żadnego atomu wodoru, który mógłby absorbować w tak wysokim polu, a potwierdza to widmo tego związku, również zarejestrowane w DMSO-*d*<sub>6</sub>, pokazane na stronie o adresie [http://www.sigmaaldrich.com/spectra/fnmr/FNMR\\_010614.PDF](http://www.sigmaaldrich.com/spectra/fnmr/FNMR_010614.PDF). W opisie analogicznego widma dla liganda **i** podane są przesunięcia chemiczne dla 3 atomów wodoru w układzie aromatycznym, podczas gdy powinno ich być 5. Opis widma dla liganda **j** zawiera



przypisanie sygnału dla zaskakującej liczby 1,5 atomu wodoru. Wbrew umieszczonej nazwie, ligand **h** nie zawiera podstawnika „1-aminometylen” tylko „1-amino-etylidenyl”. Dla związku **1a** sygnał atomów wodoru grupy metylowej (s, 3H, CH<sub>3</sub>) o przesunięciu  $\delta$  2,16 ppm znowu przypisano układowi kumaryny. Opis widma dla związku **2a** (str. 142) zawiera aż dwa komplety protonów aromatycznych kumaryny (oba sporo za duże, bo aż po 7 H), a sygnał  $\delta$  3,73 (przedstawiony jako kwartet) nie da się przypisać żadnemu elementowi struktury tego liganda, a już na pewno nie kumarynie. Opis widma związku **1b** pokazuje za to zbyt mało, bo tylko dwa atomy wodoru w kumarynie. Opis widma związku **3b** zawiera informację o tryplecie ( $\delta$  0,90 ppm) i kwartecie ( $\delta$  3,73 ppm) sprzęgających się ze stałą sprzężenia 6 Hz, których to sygnałów nie jestem w stanie przypisać żadnemu elementowi strukturalnemu tego związku. Gdyby w reakcji wykorzystano eter dietylowy (ewentualnie etanol), to te sygnały (jeżeli wykonano nieco niedokładną integrację) odpowiadałyby jego pozostałości w próbce, ale w przepisie preparatywnym nie ma o tych rozpuszczalnikach wzmianki.

4. Pomijając kilka podobnych nieścisłości na kolejnych stronach dysertacji chcę zwrócić uwagę na opis widma dla związku **3e** (str. 149), w którym brak jest sygnału rezonansowego pochodzącego od 6 protonów cząsteczki benzenu. Czyżby benzen został usunięty z kompleksu podczas zatężania lub późniejszego suszenia w eksykatorze? Można sobie wyobrazić, że widmo masowe wykryło oczekiwany produkt nawet jeżeli było go w próbce kilka-kilkanaście procent, bo nie jest to technika pozwalająca określić składniki w sensie ilościowym, a jedynie jakościowym. Podobne problemy są w opisach widm związków **1i** oraz **1j** (str. 153 i 154), gdzie na postulowane, odpowiednio, 25 i 29 atomów wodoru „odliczyło się” jedynie 17 i 19, a brakuje charakterystycznych sygnałów od *p*-cymenu. W związku **1i** sygnał od dwóch grup metylowych obecnych w *p*-cymenie ma intensywność jedynie 1H a nie 6H, co stanowi ok. 15% deklarowanej zawartości. Dalej problem staje się jeszcze poważniejszy, ponieważ w opisie związku **2j** na stronie 155 formalnie brakuje już 17 protonów, co wskazuje, że heksametylobenzen mógł także w ogromnej części opuścić próbkę, bo 18-protonowego singletu po prostu nie da się nie zauważyć. Niestety, również w opisie widma związku **3j** brakuje sygnałów związanych z 10 atomami wodoru. Pewien niepokój wzbudza fakt, że absolutnie nieoczekiwanie **3e** ma właściwości hydrofilowe ( $\log P = -0,09$ ), a dla kompleksów **1i**, **1j** i **3j** współczynników podziału nie dało się wyznaczyć. Można sobie wyobrazić, że jeżeli te kompleksy straciły aromatyczne „czapeczki”, to przyjęta metodologia oznaczenia lipofilowości mogła być nieadekwatną.

5. W widmie związku **4a** integracja skalibrowana na atomach wodoru *p*-cymenu pozwoliła stwierdzić obecność jedynie 3 atomów wodoru pochodzących od 3-aminokumaryny, podczas gdy postulowana jest obecność dwóch cząsteczek tego liganda, więc liczba tych atomów wodoru powinna wynosić 10.

Jeżeli czas pozwoli, to będę prosił Doktorantkę o krótkie ustosunkowanie się do pytań umieszczonych poniżej:

- a) Na stronie 48 z zainteresowaniem przyjrzałem się strukturze związku **57**. Jaka jest liczba utlenienia/wartościowość atomów siarki tam obecnych?
- b) Gdzie związki **9-11** (str. 22) posiadają wzmacniającą ich cytotoksyczność „alkilową część fosfiny”?
- c) Co to są „hormony katalizowane jonami  $\text{Ca}^{+2}$ ” (str. 37)?

Ufam, że powyższy spis usterek świadczy głównie o pewnej niedostatecznej dozie skrupulatności w redagowaniu pracy i że odpowiednie widma  $^1\text{H}$  NMR (wzmiankowane w pkt. 3-5) zostaną zaprezentowane podczas publicznej obrony i uczynią moje wątpliwości bezprzedmiotowymi. Ale nawet gdyby 3-4 związki kompleksowe rzeczywiście nie odpowiadały postulowanym dla nich strukturom, to i tak wyniki uzyskane zgodnie z zasadami sztuki dla pozostałych kompleksów stanowią istotny wkład do wiedzy o tej klasie związków metaloorganicznych. Mogę zatem stwierdzić, że cel naukowy rozprawy został przez mgr inż. Annę Skoczyńską osiągnięty i **rozprawa spełnia wymogi ustawowe**. Przedstawione w dysertacji prace syntetyczno-analityczne i badania fizykochemiczne wymagały szerokiej wiedzy, wytrwałości i zaangażowania. Dowodzą, że Doktorantka jest gotowa do dalszej kariery zawodowej. Dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Anny Skoczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Łódź, 6.11.2017r.