

Wrocław, 28.08.2023

**Prof. dr hab. Elżbieta Gumienna-Kontecka**

Zespół Biologicznej Chemii Nieorganicznej

e-mail: [elzbieta.gumienna-kontecka@chem.uni.wroc.pl](mailto:elzbieta.gumienna-kontecka@chem.uni.wroc.pl)

#### RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Namiecińskiej**

**pt. „Związki kompleksowe arenorutenu(II) z ligandami N -, S - donorowymi - synteza, właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe” wykonanej w Zakładzie Chemii Surowców Kosmetycznych Katedry Kosmetologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Elżbiety Budzisz**

W trosce o nadchodzącą przyszłość, której nie chcemy zaaranżować jako areny do bezbronnej walki z oportunistycznymi patogenami, naukowcy już teraz poszukują nowych, efektywnych leków i zajmują się problemem oporności drobnoustrojów na dostępne antybiotyki. Ponowne zainteresowanie dobrze znanymi i stosowanymi od lat lekami na bazie metali oraz rozwój nowych, które zapewniają nowatorski i odmienny od konwencjonalnych antybiotyków sposób działania, napawa nadzieją. W odpowiedzi na ich samodzielnie przeciwdrobnoustrojowe działanie lub synergizm w połączeniu z antybiotykami, patogeny wykazują mniejszą predyspozycję do rozwoju oporności.

Cisplatyna to najprawdopodobniej pierwszy lek, który wielu naukowcom przychodzi na myśl, gdy pytani są o najbardziej znany metalolek. Mimo, że niesie ze sobą poważne toksyczne skutki uboczne lub problemy z opornością na nowotwory, związek ten odniósł ogromny sukces nie tylko w leczeniu klinicznym, ale także wśród badaczy, którzy zainspirowani nim rozwijają karierę badawczą w obszarze chemii medycznej i opracowywania leków.

Wśród całej gamy kompleksów metali d-elektronowych zainteresowanie kompleksami rutenu wzrosło, gdy odkryto, że wybrane pochodne były terapeutycznie aktywne wobec guzów litych, opornych na cisplatynę. Potencjalnie związki rutenu oferują kilka zalet w porównaniu do przeciwnowotworowych kompleksów platyny stosowanych obecnie klinicznie: zmniejszoną toksyczność, różne mechanizmy działania, perspektywę braku oporności krzyżowej, czy aktywność w fazie metastazy. Kompleksy Ru(III) KP1019 oraz NAMI-A, oraz kompleksy Ru(II) RAPTA-C, jak również ich późniejsze analogi, okazały się najbardziej obiecujące tym zakresie. Chociaż mechanizmy działania i główny cel komórkowy związków na bazie Ru(II) nie zostały jednoznacznie ustalone, w literaturze opisano wiele cennych danych mających na celu wyjaśnienie zależności struktura-aktywność przeciwdrobnoustrojowa, cytotoksyczna, czy przeciwnowotworowa. W tym nurcie badawczym mieści się również rozprawa doktorska mgr Eweliny Namiecińskiej, wykonana w grupie Profesor Elżbiety Budzisz, na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, która od wielu lat

proceeds research on the search for complexed ions of d-electron metals and their activity against cancer.

Dr Ewelina Namiecińska in the context of her thesis undertook the design, synthesis and determination of properties of anti-proliferative and anti-cancer series of complexes containing a p-cymene ligand coordinated to Ru(II) ion and selected ligands of carbamate-pyrazole modified in the C-3 and C-5 positions of the pyrazole ring. The topic of the dissertation is very actual and fulfills the need for the expansion of knowledge in the subject area.

The doctoral thesis of mgr Eweliny Namiecińskiej was based on a cycle of scientific publications and presented in the form of a thesis, in which presented were theses and the most important achievements of the thesis, supplemented by works entering the thesis with supplements (3 scientific articles published in journals from the JCR list), as well as declarations of the candidate and co-authors. The doctorant also published a description of her scientific achievements along with a list of publications thematically unrelated to the doctoral thesis, of which she is a co-author (7 works, totaling 62 MEIN points), which allows for a broader view of her scientific activity.

In the thesis (100 pages) the doctorant presented a theoretical introduction, the aim and objectives of the work, the experimental part, results in the form of short articles entering the thesis, discussion and conclusions, followed by a bibliography containing 189 references. I like the way of presenting information, which in the introduction equips the reader with basic knowledge regarding the characteristics of physico-chemical properties of complexed ions of Ru(II) with biological activity, derivatives of pyrazole with a carbamate group, state-of-the-art cytotoxic complexes of metalorganic Ru(III/II) used in chemotherapy of tumors and properties of anti-proliferative and anti-cancer complexes of Ru(II). In the experimental part she presents the methodology of the conducted research, explaining key aspects of chemical and biological research.

In the chapter dedicated to the discussion of individual articles the doctorant in a very clear and organized way leads the reader through the description of key results and analysis of selected experimental data. This chapter is a coherent whole, in which the doctorant describes the synthesis of individual complexes, i.e. synthesis of ligands and complexes, paying attention to the conditions under which the salts of chlorides were converted to hexafluorophosphate, and the methods used to confirm the chemical identity of the obtained complexes and their thermodynamic stability in aqueous solutions. In the next stage she presents biological research, which was a very important element of the reviewed thesis. The fact that microbial infections often accompany disorders of skin homeostasis and the barrier function of the mucous membrane, as well as the occurrence of tumors, led the mgr to systematic research on the properties of anti-proliferative and anti-cancer complexes. In the context of microbiological research the minimal inhibitory concentration

hamujące wzrost drobnoustrojów wobec wybranych mikroorganizmów chorobotwórczych, oportunistycznych oraz komensalnych, działanie synergistyczne syntezowanych kompleksów z wybranymi antybiotykami, kinetykę przeżywania (w celu ustalenia przebiegu działania bakteriostatycznego lub bakteriobójczego), a chcąc zweryfikować czy zachodzi liza komórki - badania mikroskopowe z zastosowaniem barwników fluorescencyjnych. Dalej, w ramach ustalania właściwości przeciwnowotworowych oraz potencjalnego mechanizmu działania określono cytotoksyczność arenowych kompleksów Ru(II) wobec kilkunastu wybranych linii nowotworowych oraz ich selektywność, zbadano zdolność generowania reaktywnych form tlenu, zmiany integralności błony oraz peroksydację lipidów błonowych, parametr liofilowości, oddziaływania badanych związków z DNA, jakościową ocenę indukcji apoptozy za pomocą analizy mikroskopowej z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych, ocenę genotoksyczności wykorzystując możliwość interakcji z polimerazą PARP1. Do wszystkich badań wybrano adekwatne związki referencyjne.

Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana, a interpretacja, prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone w bardzo systematyczny i czytelny sposób. W opracowaniu Doktorantka zawarła wybrane wykresy aktywności biologicznej – przygotowane w bardzo staranny i przemyślany sposób, ułatwiające czytelnikowi zrozumienie procesu analizy uzyskanych wyników. Na podstawie przedstawionej dyskusji można z całą pewnością stwierdzić, iż Doktorantka zdobyła warsztat badawczy w zakresie prowadzonych eksperymentów oraz umiejętność prezentacji otrzymanych wyników.

W ostatnim rozdziale dysertacji mgr Namiecińska podsumowała wyniki swoich badań, podkreślając aktywność biologiczną poszczególnych kompleksów.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Namiecińskiej, stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam:

- Przeprowadzenie szczegółowego przeglądu literatury oraz opisu właściwości chemicznych, strukturalnych i przeciwdrobnoustrojowych związków zawierających ugrupowanie tiosemikarbazydowe oraz tiosemikarbazonowe; wskazanie oraz dyskusja potencjalnych mechanizmów przeciwbakteryjnych oraz przeciwgrzybiczych;
- Zaprojektowanie, syntezę i charakterystyką strukturalną ośmiu nowych jonowych związków kompleksowych p-cymenorutenu(II) z ligandami karbatioamidopirazolowymi;
- Określenie parametrów fizyko-chemicznych nowych kompleksów, m.in. logP, jako miary ich lipofilowości, właściwości utleniająco-redukujących oraz stabilności termodynamicznej, niezwykle istotnych przy opracowywaniu związków o potencjalnej aktywności biologicznej;
- Określenie aktywności mikrobiologicznej i cytotoksyczności otrzymanych kompleksów oraz analizę struktura-aktywność;
- Wykazanie szczególnych właściwości przeciwdrobnoustrojowych i działania synergistycznego dla dwóch związków: 8 oraz 12 (z ligandem zawierającym podstawniki etylowe w pozycji C-3 oraz C-5

karbatioamidopirazolu) powodujących dodatkowo 2 – 4-krotny wzrost efektywności antybiotykoterapii;

- Pokazanie potencjału przeciwnowotworowego związku 10 względem linii czerniaka (WM115) – powodującego dwukrotny wzrost aktywności w stosunku do cisplatyny, przy dużo mniejszej toksyczności wobec komórek prawidłowych – oraz związku 9 wobec linii gruczolakoraka endometrium (HEC1A);
- Wskazanie możliwych mechanizmów indukcji szlaku apoptozy w komórkach nowotworowych poprzez generowanie przez analizowane kompleksy RFT/RFN i redukcję potencjału mitochondrialnego oraz wysokiej genotoksyczności, powodując degradację białko PARP-1.

Należy podkreślić, że rozprawa doktorska opiera się na wynikach, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu - *Current Medicinal Chemistry* 2019, *RSC Advances* 2019, *Molecules* 2022 oraz 2023, o łącznym współczynniku wpływu  $\Sigma IF = 17.157$  i 480 punktach MNiSW, i zostały już poddane gruntownej ocenie merytorycznej.

W trzech artykułach Doktorantka jest pierwszą autorką, co podkreśla Jej wiodący udział. We wszystkich przypadkach Kandydatka opisała swój wkład w przygotowanie publikacji, jak i przedstawiła oświadczenia współautorów. Należy podkreślić, że aktywnie uczestniczyła w przygotowaniu koncepcji badań, wstępu, prowadziła syntezy i charakterystykę ligandów oraz kompleksów, pomiary fizykochemiczne, opisu części przeciwnowotworowej, interpretację otrzymanych wyników oraz w przygotowaniu manuskryptów. Nie mam zatem wątpliwości, że wkład pracy Doktorantki w przygotowanie cyklu publikacji był znaczący i świadczy o Jej dojrzałości naukowo-badawczej.

Poniżej, z ciekawości, wymieniam pytania ogólne pojawiające się po lekturze rozprawy doktorskiej i prac:

1. Jakie są potencjalne mechanizmy działania przeciwmikrobiologicznego arenowych kompleksów rutenu i efektu synergistycznego z antybiotykami?
2. Czy w opinii Doktorantki, aktywny transport kompleksów rutenu do wnętrza komórki bakteryjnej/grzybiczej byłby pożądany i jak ewentualnie można byłoby taki 'wehikuł' zaprojektować?
3. Badania depolaryzacji oraz hiperpolaryzacji błon mitochondrialnych przeprowadzone wraz z barwieniem fluorescencyjnym wskazały mechanizm działania apoptycznego badanych związków z udziałem mitochondriów. Mitochondria są faktycznie celem wielu chemioterapeutyków i ciągle prowadzi się badania w kierunku ich rozwoju. Jakie elementy badanych przez Panią kompleksów powodują, że mają one duże powinowactwo do mitochondriów i czy warto je modyfikować w kierunku zwiększenia tego powinowactwa? Jeśli tak, to w jaki sposób można próbować to zrobić?

Na koniec, zwracam uwagę na dużą staranność edytorską, która stanowczo ułatwia odbiór przedstawionych treści merytorycznych, i zachęca do dalszej, szczegółowej lektury artykułów autorstwa Doktorantki. Drobne błędy edytorskie nie zasługują na wskazanie tutaj. Zaznaczę tylko fakt, że należy pomijać kropki w tytułach rozdziałów.

Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany, rozprawa doktorska prezentuje nie tylko ogólną wiedzę teoretyczną Pani mgr Eweliny Namiecińskiej z zakresu badanej tematyki, ale pokazuje Jej istotny wkład w poszerzenie zakresu tej wiedzy poprzez skrupulatną analizę danych literaturowych i interpretację obserwowanych efektów. Dalej, Doktorantka wykazała umiejętność stawiania hipotez badawczych oraz samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Uzyskane z dużą starannością wyniki należy uznać za dobry przykład racjonalnego projektowania, potwierdzonego syntezą kompleksów metali oraz efektu ich działania w postaci aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej. Przeprowadzone badania jasno potwierdzają jak ważne jest szczegółowe badanie zależności między strukturą chemiczną (lub właściwościami związanymi ze strukturą) a aktywnością biologiczną badanych związków, tzw. badania struktura-aktywność (SAR), pozwalające w konsekwencji na skuteczne projektowanie związków o pożądanym właściwościach.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Eweliny Namiecińskiej spełnia w pełni ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, i wnioskuję do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Namiecińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy z uwagi na interesujące wyniki oraz wysoki poziom naukowy prowadzonych badań.



*J. Głuszyńska-Kocetko*