

AUTOREFERAT

Informacje o osiągnięciu naukowym i dorobku naukowo-badawczym
Załącznik 2a

Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Nowe związki metali jako czynniki przeciwnowotworowe, antybakteryjne
i przeciwgrzybicze – właściwości i oddziaływanie z biomolekułami**

Dr Hanna Pruchnik
Katedra Fizyki i Biofizyki
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko:

Hanna Pruchnik

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.

Doktor nauk biologicznych, dyscyplina biofizyka, 2001

Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Nauk Ziemi

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Wpływ wybranych metaloorganicznych związków cyny na przejścia fazowe i strukturę błon modelowych.*”

Promotor: prof. dr hab. Bożenna Różycka-Roszak, Uniwersytet Przyrodniczy (wówczas Akademia Rolnicza) we Wrocławiu;

Recenzenci: prof. dr hab. Maria Koter, Uniwersytet Łódzki,
prof. dr hab. Aleksander Sikorski, Uniwersytet Wrocławski.

Magister fizyki, 1995

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Matematyczno-Fizyczny

Tytuł pracy magisterskiej: „*Struktura elektronowa supersieci GaAs/AlAs.*”

Promotor: prof. dr hab. Maria Stęślicka.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Od 2001 – obecnie - adiunkt w Katedrze Fizyki i Biofizyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

1995-2001 - asystent w Katedrze Fizyki i Biofizyki Akademii Rolniczej (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) we Wrocławiu.

Urlopy macierzyńskie i wychowawcze: 15.12.1996 - 22.07.1997; 27.12.2001- 31.12.2002.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art.16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

4a. Tytuł osiągnięcia naukowego.

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 9 publikacji pod wspólnym tytułem:

Nowe związki metali jako czynniki przeciwnowotworowe, antybakteryjne i przeciwgrzybicze – właściwości i oddziaływanie z biomolekułami

Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego znajdują się w *Załączniku 5*, a oświadczenia współautorów tych publikacji zawarte są w *Załączniku 4*.

4b. Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa).

Na osiągnięcie naukowe składa się 9 publikacji w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), sumaryczny Impact Factor publikacji (według roku publikacji) wynosi **IF= 22,076** Sumaryczna liczba punktów MNiSW dla wszystkich publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi **260** (na podstawie listy czasopism z grudnia 2016).

- H1. **Pruchnik H.**, Lis, T., Latocha M., Zielińska A., Ułaszewski S., Pelińska I., Pruchnik F.P. (2012) Butyltin(IV) 2-sulfobenzoates: Synthesis, structural characterization and their cytostatic and antibacterial activities, *Journal of Inorganic Biochemistry* 111, 25-32. IF 3,317; 35 pkt. MNiSW
- H2. **Pruchnik H.**, Latocha M., Zielińska A., Ułaszewski S., Pruchnik F.P. (2013) Butyltin(IV) 5-sulfosalicylates: Structural characterization and their cytostatic activity, *Polyhedron* 49, 223-233. IF 2,057; 30 pkt. MNiSW
- H3. **Pruchnik H.**, Pruchnik F.P. (2013) Butyltin(IV) citrates and tartrates: structural characterization and their interaction with nucleotides, *Journal of Organometallic Chemistry* 729, 60-67. IF 2,384; 30 pkt. MNiSW
- H4. **Pruchnik H.**, Kral T., Hof M. (2014) Interaction of new butyltin citrate complex with lipid model membrane and DNA, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 118 (2), 967-975. IF 2,042; 20 pkt. MNiSW
- H5. **Pruchnik H.**, Lis, T., Pruchnik F.P. (2015) Platinum(II) complexes with tris(2-carboxyethyl)phosphine, X-ray structure and reactions with polar solvents and glutathione, *Journal of Organometallic Chemistry* 791, 124-129. IF 2,336; 30 pkt. MNiSW
- H6. **Pruchnik H.**, Lis, T., Latocha M., Zielińska A., Pruchnik F.P. (2015) Novel organotin complexes containing the 2,2'-bipyridine-3,3',6,6'-tetracarboxylate. Helical supramolecular structure and cytostatic activity, *Journal of Organometallic Chemistry* 777, 81-87. IF 2,336; 30 pkt. MNiSW
- H7. **Pruchnik H.**, Kral T., Poradowski D., Pawlak A., Drynda A. Obmińska-Mrukowicz B., Hof M. (2016) New cytotoxic butyltin complexes with 2-sulfobenzoic acid: molecular interaction with lipid bilayers and DNA as well as in vitro anticancer activity. *Chemico-Biological Interactions* 243, 107-118. IF 2,618 ; 30 pkt. MNiSW

- H8. **Pruchnik H.**, Lis, T., Latocha M., Zielińska A., Pruchnik F.P. (2016) Palladium(II) complexes with tris(2-carboxyethyl)phosphine, structure, reactions and cytostatic activity, *Journal of Inorganic Biochemistry* 156, 14-21. IF 3,205; 35 pkt. MNiSW
- H9. **Pruchnik H.** (2017) Influence of cytotoxic butyltin complexes with 2-sulfobenzoic acid on the thermotropic phase behavior of lipid model membranes, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 127(1), 507-514. IF 1,781; 20 pkt. MNiSW

4c. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Związki koordynacyjne i metaloorganiczne są w coraz większym stopniu stosowane w medycynie, farmacji, rolnictwie i innych dziedzinach jako leki, środki kontrastowe do badania pacjentów metodą rezonansu jądrowego, biocydy itd. [1-13]. Istnieje wciąż ogromne zapotrzebowanie na nowe, bardziej skuteczne środki przeciwnowotworowe, przeciwgrzybiczne i antybakteryjne. W zależności od składu związków można uzyskać selektywne działanie na określony typ organizmu. Do najbardziej znanych związków metali używanych w medycynie i farmacji należą kompleksy platyny(II) o strukturze kwadratowej *cis* i *trans*, związki platyny(IV), stosowane jako leki przeciwnowotworowe, litu (leki przeciwdepresyjne). W radioterapii używane są izotopy promieniotwórcze związków technetu, rodu i rutenu [1, 6, 8-11], natomiast związki paramagnetyczne (Mn, Fe), wykorzystywane są jako środki kontrastowe w diagnostyce lekarskiej. Bardzo intensywnie badane są też właściwości antyrakowe związków różnych metali. Zainteresowanie aktywnością przeciwnowotworową związków koordynacyjnych i metaloorganicznych spowodowane zostało odkryciem przez Rosenberga biologicznego działania *cis*-diaminadichloroplatyny(II) - *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]. Od lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku związki platyny(II) są szeroko stosowane w chemioterapii [1-8]. Jednakże, wysoka cytotoksyczność, lekooporność i niepożądane działania uboczne znanych analogów cisplatyny sprawiają, że wciąż poszukiwane są nowe kompleksy metali o równie dobrej aktywności i być może lepszej selektywności wobec komórek nowotworowych. Okazuje się, że szerszą aktywność wykazują kompleksy wielordzeniowe, zawierające dwa lub więcej atomów centralnych, z których każdy ma możliwość tworzenia wiązań kowalencyjnych z DNA [5,6]. Bardzo obiecujące właściwości cytostatyczne wykazują związki koordynacyjne Fe, Co, Rh, Ir, Pd z ligandami azotowymi i fosfinowymi [1-12]. Do aktywniejszych cytostatyków niż cisplatyna należą dwurdzeniowe kompleksy Rh(II) [Rh₂(OOCR)₂(N-N)₂(H₂O)₂] (OOCR)₂ (N-N = 2,2'-bipirydyna i 1,10-fenantrolina) [10-12] i związki Rh(III) z tymi ligandami. Do

związków wykazujących bardzo dużą aktywność biologiczną należą połączenia metaloorganiczne cyny(IV) $[\text{SnR}_n\text{X}_{4-n}]$ ($n = 2, 3$; R = metyl, etyl, *n*-propyl, *n*-butyl, fenyl, itp.; X = Cl, Br, I, RCOO, itp.), $[\text{SnR}_n\text{X}_{4-n}(\text{L})]$ (L = zasada Schiffa, merkptoamina, dipeptyd), $[\text{SnR}_n\text{X}_{4-n}(\text{N-N})]$ (N-N=2,2'-bipirydyna, 1,10-fenantrolina i ich pochodne), $[\text{Sn}_4\text{O}_2(\text{OOCR}')_4\text{R}_8]$, $[\text{Sn}(\text{OOCR}')\text{R}_3]$ [14-16]. Związki cynoorganiczne są intensywnie badane ze względu na ich bardzo interesującą strukturę i reaktywność oraz zastosowania w syntezie organicznej, katalizie, chemii polimerów, a także ich niezwykłą aktywność biologiczną, między innymi przeciwnowotworową. Właściwości te spowodowane są między innymi możliwością tworzenia związków o bardzo różnych liczbach koordynacji zmieniających się najczęściej w granicach od 3 do 6, chociaż znane są także związki siedmiokoordynacyjne. Aktywność biologiczna związków cynoorganicznych zależy bowiem nie tylko od liczby wiązań Sn-C i ich charakteru, ale również od sposobu koordynacji ligandów i ich właściwości elektronowych. Najbardziej aktywnymi czynnikami przeciwnowotworowymi są związki diorgano- i triorganocyny.

Wiele związków metali wykazujących aktywność cytostatyczną jest stosunkowo słabo rozpuszczalnych w wodzie. Dotyczy to przede wszystkim związków cynoorganicznych oraz cisplatyny. Dlatego celowa wydawała się synteza i wykonanie badań fizykochemicznych i biofizycznych związków zawierających podstawniki hydrofilowe, np. grupy karboksylowe – COOH i sulfonowe –SO₃H. Ligandy zawierające takie grupy (kwasy sulfokarboksylowe, kwas 2,2'-bipirydyno-3,3',6,6'-tetrakarboksylowy, fosfiny zawierające podstawniki COOH, SO₃H, OH) mogą tworzyć kompleksy o interesującej strukturze i cennych własnościach fizykochemicznych i biologicznych [17, 18]. Ostatnio były przeprowadzone badania reaktywności tris(2-karboksyetylo)fosfiny $\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3$ (TCEP) z cisplatyną *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ i oksaliplatyną $[\text{Pt}\{\text{C}_6\text{H}_{10}(\text{NH}_2)_2\}(\text{C}_2\text{O}_4)]$ oraz modelowymi proteinami. Stwierdzono, że cis platyna w obecności TCEP reaguje z transporterami Cu(I): ATP7B i ATOX1 [19, 20] oraz z palcem cynkowym Sp1 [21]. W połączeniu $\text{Pt}(\text{ATOX1})(\text{TCEP})$ jon Pt(II) ma koordynację kwadratową z dwoma atomami S cysteiny w położeniu trans oraz atomem N Cys i atomem P fosfiny [20]. Kompleksy metali z TCEP są zwykle dość dobrze rozpuszczalne w wodzie, co ułatwia ich zastosowania w badaniach biofizycznych i biochemicznych. Aktywność biologiczna związków koordynacyjnych Pd(II) i Pt(II) z tris(2-karboksyetylo)fosfiną $\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3$, będących również przedmiotem tej pracy, nie była dotychczas badana.

Cel i zakres badań.

Nowo otrzymane kompleksy cyny, platyny i palladu są związkami bardzo aktywnymi biologicznie. Ze względu na możliwości szerokiego wykorzystania tych związków, niezwykle istotne było określenie ich struktury i właściwości fizykochemicznych, równie ważne jest przybliżenie molekularnego oddziaływania otrzymanych kompleksów z biomolekułami. Mechanizm biologicznego działania związków cynoorganicznych i koordynacyjnych wciąż jeszcze nie jest jasny. Jak wynika z literatury związki te mogą tworzyć kompleksy z różnymi biomolekułami: białkami, kwasami nukleinowymi, aminokwasami, peptydami czy steroidami. Toksyczność związków metaloorganicznych może być też związana z ich oddziaływaniem z lipidowymi składnikami błony biologicznej, w następstwie, którego może dojść do zmian w jej strukturze i funkcjonowaniu [16]. Zatem, badania prowadzone w ramach osiągnięcia naukowego miały na celu:

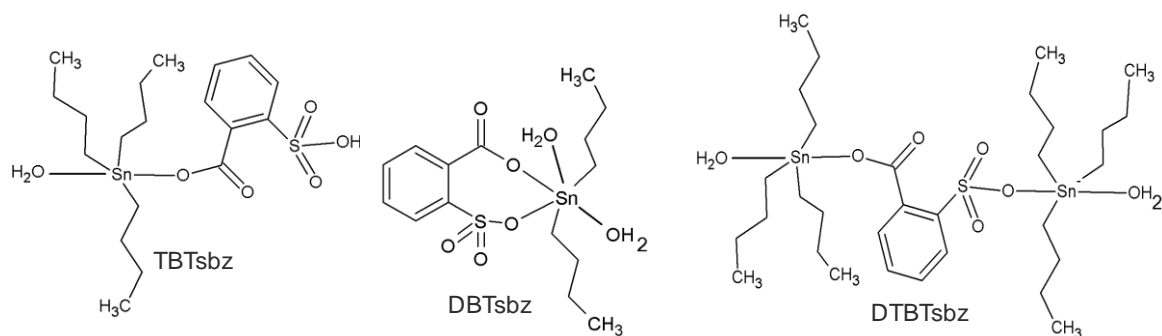
1. Zbadanie struktury i fizykochemicznych własności nowo otrzymanych kompleksów metali: cyny, platyny i palladu.
2. Sprawdzenie aktywności biologicznej (antyproliferacyjnej) związków cynoorganicznych i koordynacyjnych.
3. Zbadanie molekularnych oddziaływań wybranych kompleksów metali z biomolekułami i lipidami błonowymi.
4. Zbadanie wpływu wybranych kompleksów metali na termotropowe parametry lipidowej błony modelowej.

Omówienie uzyskanych wyników

Przedmiot badań - krótka charakterystyka związków (I).

Wszystkie metaloorganiczne i koordynacyjne związki stanowiące przedmiot badań zostały zsyntetyzowane na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Czystość kompleksów została potwierdzona na podstawie analizy ich widm NMR oraz na podstawie analizy elementarnej. Metodami spektroskopii (IR, UV-VIS, ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{119}Sn , ^{195}Pt NMR - w roztworach, ^{13}C , ^{31}P , ^{119}Sn , ^{195}Pt MAS NMR – w ciele stałym) i rentgenografii zbadano ich strukturę i właściwości fizykochemiczne. Wykonane zostały również obliczenia kwantowo-mechaniczne metodą DFT (Density Functional Theory) ich reaktywności i struktury elektronowej.

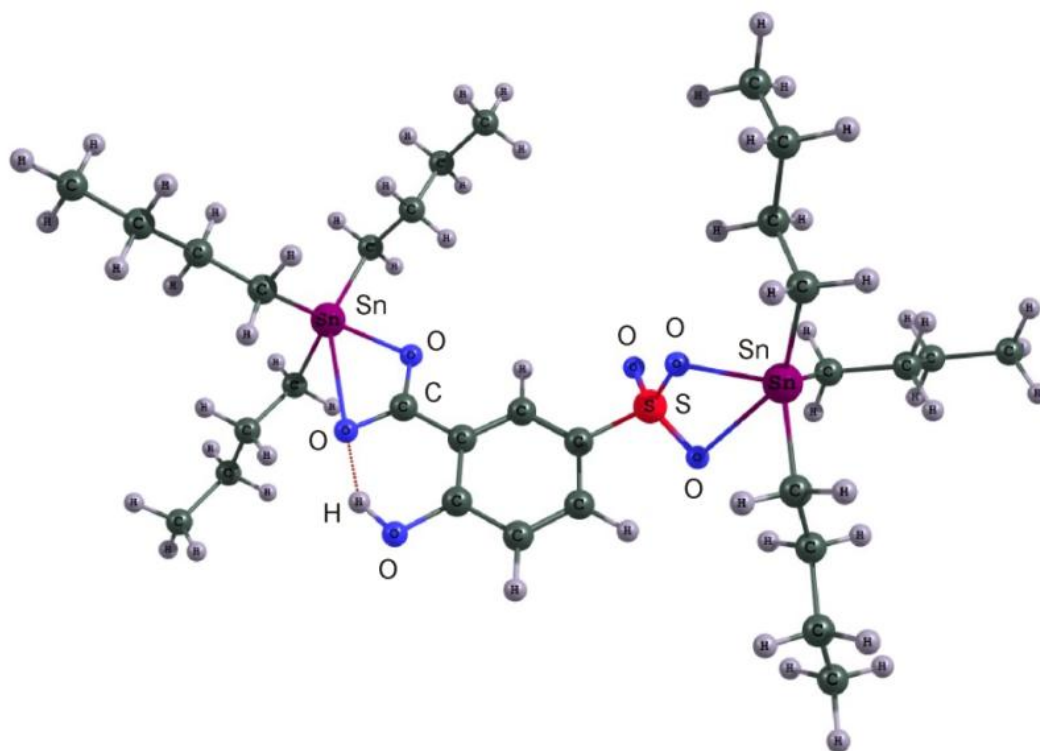
Wybrane do badań związki cynoorganiczne można przedstawić w postaci ogólnego wzoru: $\text{SnR}_{4-n}\text{X}_n$, gdzie **R** oznacza butyl (C_4H_9), a **X** (ligand) oznacza następujące aniony: 2-sulfobenzoesan 2- $\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{COO}$, 5-sulfosalicylan (5- HO_3S)(2- HO) $\text{C}_6\text{H}_4\text{COO}$, cytrynian, winian oraz 2,2'-bipirydino-3,3',6,6'-tetrakarboksylan. Pierwszą grupę opisanych związków stanowiły trzy kompleksy cyny otrzymane w reakcji związków cynoorganicznych z kwasem 2-sulfobenzoesowym (Snsbz): $[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_2\{\text{O}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{COO-2}\}(\text{H}_2\text{O})] \cdot (\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})$ - DBTsbsz, $[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3\{\text{O}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{COOH-2}\}]$ - TBTsbsz oraz $[\text{Sn}_2(\text{C}_4\text{H}_9)_6\{\mu\text{-O}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{COO-2}\}]$ - DTBTsbsz [**H1**]. DBTsbsz jest umiarkowanie rozpuszczalny w etanolu, łatwo rozpuszcza się w DMSO i DMF. Związki TBTsbsz i DTBTsbsz są łatwo rozpuszczalne w EtOH, MeOH, DMF, DMSO i innych polarnych rozpuszczalnikach, słabo natomiast w mieszaninie wody z alkoholem (1:1). Strukturę związku DBTsbsz wyznaczono metodą rentgenograficzną, a struktury pozostałych związków określono na podstawie widm IR oraz ^1H , ^{13}C i ^{119}Sn NMR i obliczeń kwantowo chemicznych DFT. Na podstawie widm NMR i obliczeń metodą DFT B3LYP/3-21G** wynika, że w roztworach związków Snsbz w rozpuszczalnikach polarnych powstaje wiele kompleksów o dynamicznych właściwościach. Obliczenia sugerują, że w roztworze może istnieć wiele izomerów i konformerów cztero- pięcio- i sześciokoordynacyjnych. Ich struktury w roztworze przedstawiono na rysunku nr 1.



Rys. 1. Struktury kompleksów cyny z kwasem sulfobenzoesowym [**H1**].

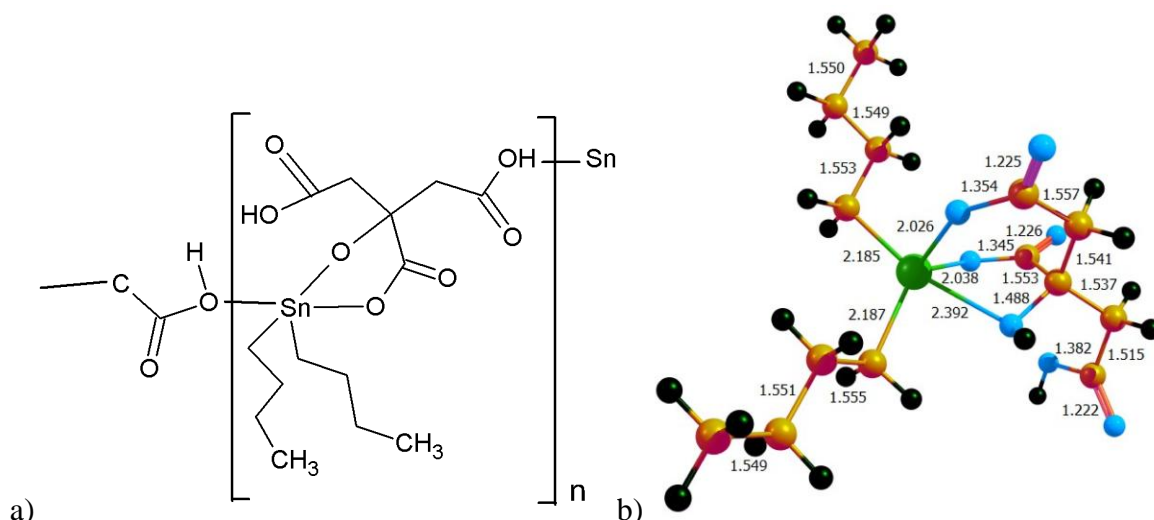
Kolejną grupę związków stanowiły pochodne cyny z kwasem sulfosalicylowym Hssal: $[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3\{\text{O}_3\text{SC}_6\text{H}_3(\text{OH})\text{COOH}\}]$ - TBTssal, $[\text{Sn}_2(\text{C}_4\text{H}_9)_6(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})\text{SO}_3)]$ - DTBTssal i $[\text{Sn}_3(\text{C}_4\text{H}_9)_6(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})\text{SO}_3)_2\text{O}]$ - TDBTssal2 [**H2**]. Związki cynoorganiczne z wymienionymi ligandami karboksylowymi są łatwo rozpuszczalne w metanolu i etanolu, a w pewnym stopniu także w roztworach wodno-alkoholowych. Strukturę kompleksów Snsal w stanie stałym i w roztworach wyznaczono metodami spektroskopowymi i obliczeniowymi

DFT. Strukturę kompleksu DTBTssal optymalizowaną metodą DFT B3LYP/3-21G** przedstawia rys. 2.



Rys. 2. Molekularna struktura kompleksu tributylocynicyzny z kwasem 5-sulfosalicylowym – DTBTssal optymalizowana metodą DFT B3LYP/3-21G** [H2].

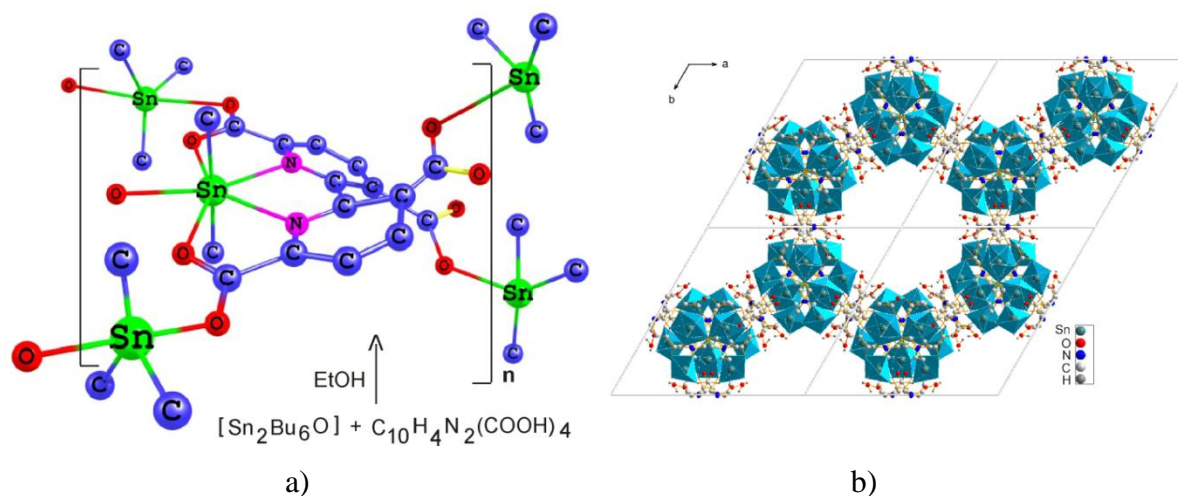
Zbadano także strukturę i właściwości kompleksów tri- i dibutylocyny z biologicznie aktywnymi hydroksykwasami karboksylowymi: cytrynowym - $\text{HOOCCH}_2\text{C}(\text{OH})(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$ i $(2R,3R)$ -(+)-winowym - $\text{HOOCCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$: $[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_2(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7)]$ (**1cit**), $[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7)]$ (**2cit**), $(\text{phenH})_2[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)]$ (**3cit**), $[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)]$ (**4w**), $[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_6)]$ (**5w**), $(\text{phenH})[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)]$ (**6w**) i $[\{\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3\}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)]$ (**7w**). Kompleksy **1cit** i **4w** są dość dobrze rozpuszczalne w etanolu i metanolu, łatwo rozpuszczają się w DMSO i DMF. Pozostałe związki (**2cit**, **3cit**, **5w**, **6w** i **7w**) są łatwo rozpuszczalne w EtOH, MeOH, DMF, DMSO i innych polarnych rozpuszczalnikach oraz słabo rozpuszczalne w roztworach wodno: akoholowych (1:1). Z widm IR wynika, że w stanie stałym wszystkie kompleksy mają postać polimerów z mostkującymi ligandami karboksylowymi skoordynowanymi z atomami cyny poprzez grupy COO (rys. 3a). Badania spektroskopowe (^1H , ^{13}C i ^{119}Sn NMR) oraz obliczenia teoretyczne (DFT B3LYP/3-21G**) wskazują, że badane związki w roztworach w polarnych rozpuszczalnikach tworzą kompleksy pięciokoordynacyjne (rys. 3b) [H3].



Rys. 3 Propozycja struktury związku $[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_2(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7)]$ (**1cit**) w stanie stałym (a) i w roztworze (b) – zoptymalizowana struktura metodą DFT (B3LYP 3-21G**) [H3].

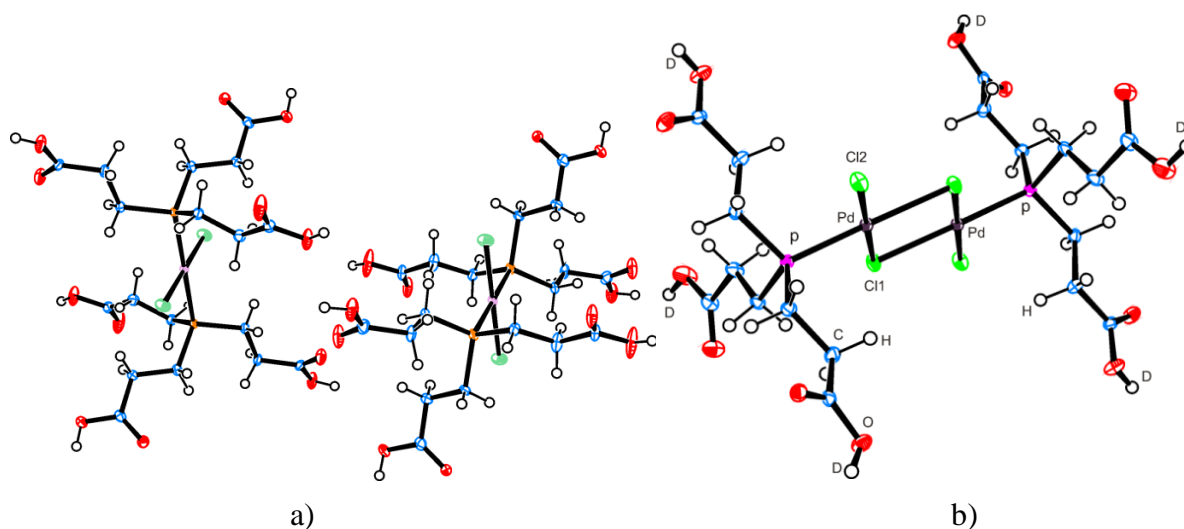
Tlenek tributylocyny $(\text{SnBu}_3)_2\text{O}$ reaguje z kwasem 2,2'-bipirydyno-3,3',6,6'-tetrakarboksylowym (bptcH₄) – (**1bptc**) w 96% EtOH, w podwyższonych temperaturach, z rozszczepieniem wiązań Sn-C. W wyniku tej reakcji powstaje polimeryczny związek z mostkowym ligandem bptc skoordynowanym przez wszystkie grupy karboksylowe i atomy azotu pierścieni pirydylowych: $[(\text{H}_2\text{O})\text{SnBu}_2(\text{bptc})\text{Sn}_2\text{Bu}_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2Snbptc**) – rys.4a [H6]. Zbadano strukturę i właściwości fizykochemiczne otrzymanych kompleksów butylocyny(IV) z anionem bptc: $[(\text{DMF})\text{SnBu}_2(\text{bptc})\text{Sn}_2\text{Bu}_6] \cdot 0.5\text{DMF} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (**3Snbptc**), $[(\text{CH}_3\text{OH})\text{SnBu}_2(\text{bptc})\text{Sn}_2\text{Bu}_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2aSnbptc**) i $[(\text{DMF})\text{SnBu}_2(\text{bptc})\text{Sn}_2\text{Bu}_6]$ (**2bSnbptc**). Metodą rentgenografii strukturalnej wyznaczono strukturę uwodnionego kwasu **1bptc**·H₂O i związku **3Snbptc**. Uwodniony związek **1bptc**·H₂O ma strukturę znacznie różną od kwasu bezwodnego. Dowodzi to, że **1bptc** jest ligandem, który może wykazywać różnorodne własności elektronowe i strukturalne w różnych związkach koordynacyjnych. Związek **3Snbptc** jest związkiem z pięcio- i siedmiokoordynacyjnymi atomami cyny(IV) połączonymi helisowymi (śrubowymi) mostkami C₁₀H₄N₂(COO)₄ w wyniku czego powstaje wyjątkowy chiralny polimer (rys. 4b). Dane eksperymentalne i teoretyczne wskazują również, że to specyficzne właściwości liganda **bptcH_{4-n}** umożliwiają powstanie związków o różnorodnej strukturze i ciekawych właściwościach [H6]. Związki **2Snbptc**, **2aSnbptc**, **2bSnbptc** oraz **3Snbptc** są dobrze rozpuszczalne w DMSO i DMF, a szczególnie w metanolu i etanolu. Z analizy widm NMR i ESI- MS wynika, że w roztworach, w rozpuszczalnikach polarnych,

dysocjują one dając głównie dwurdzeniowe (dinuklearne) solwatowane kompleksy $[\text{Sn}_2\text{Bu}_5(\text{bptc})(\text{solv})]^-$ i $[\text{Sn}_2\text{Bu}_6(\text{bptc})]^{2-}$ [H6].



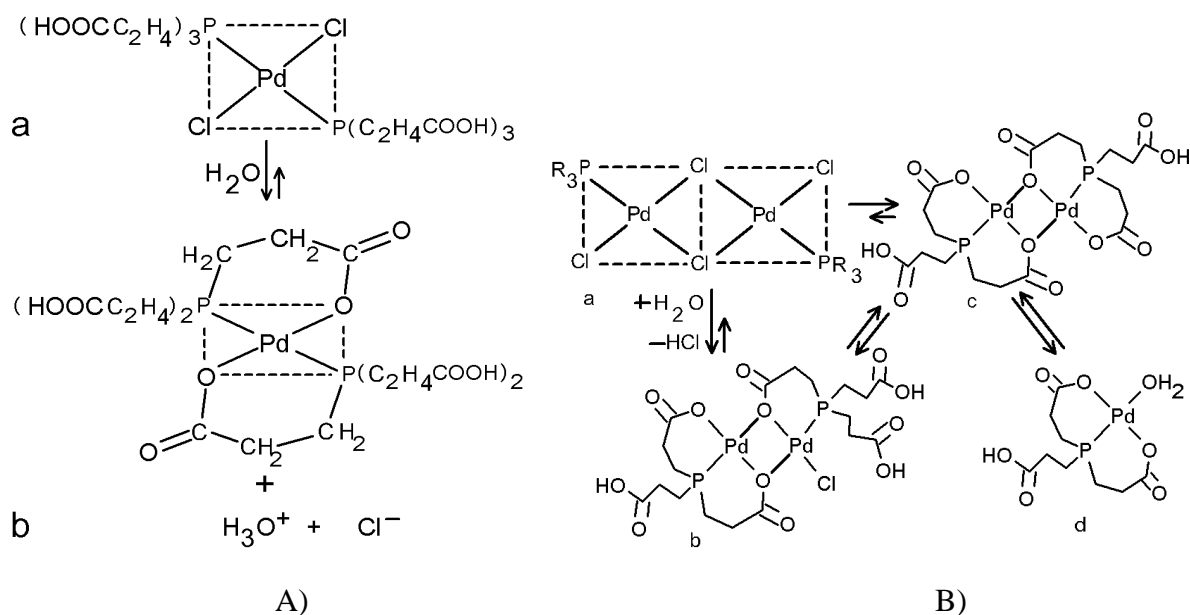
Rys. 4. Schematyczna struktura powstałego kompleksu Sn z bptcH4 (dla przejrzystości pokazane zostały tylko atomy Ca grup butylowych i atomy C, N i O liganda bptc) (a). Widok ośmiu komórek elementarnych kryształu **3Snbptc**. Niebieskie pentagonalne i trygonalne bipiramidy pokazują, odpowiednio, sfery koordynacyjne atomów Sn1 i Sn2 (b) [H6].

Przedmiotem badań były także kompleksy platyny i palladu z tris(2-karboksyetylo)fosfiną $\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3$ - TCEP. Tris(2-karboksyetylo)fosfina jest szczególnie interesującym ligandem, ponieważ może wiązać się z atomami centralnymi zarówno przez atom fosforu jak i atomy tlenu grup karboksylowych, jest trwała w roztworach wodnych na powietrzu. Bardzo często jest używana w badaniach biochemicznych do redukcji wiązań S-S, ponieważ łatwo przechodzi w odpowiedni siarczek fosfiny $\text{SP}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3$ [17]. Wyznaczono strukturę i właściwości następujących związków Pd(II) i Pt(II) z tris(2-karboksyetylo)fosfiną: *trans*- $[\text{PdCl}_2\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})_3\}_2]$, *trans*- $[\{\text{HOCC}_2\text{H}_4\}_3\text{P}]\text{ClPd}(\mu\text{-Cl})_2\text{PdCl}\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})_3\}]$, *trans*- $[\text{PtCl}_2\{\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3\}_2]$ - *trans*-PtTCEP) i *cis*- $[\text{PtCl}_2\{\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3\}_2]$ - *cis*-PtTCEP – rysunek 5 [H5, H8]. W roztworach DMSO i DMF kompleksy platyny są stabilne, jednakże w roztworach wodnych ligandy Cl są podstawione przez grupy COO fosfiny. W roztworach $\text{H}_2\text{O} + \text{DMSO}$ i $\text{H}_2\text{O} + \text{DMF}$ związek o konformacji *trans* ulega częściowej izomeryzacji do kompleksu o konformacji *cis* zawierającego ligand fosfinowy skoordynowany z Pt(II) poprzez atom fosforu i grupę COO: *cis*- $[\text{PtCl}_2\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})_3\text{-}\kappa\text{P}\}_2]$ i *cis*- $[\text{PtCl}\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})_3\text{-}\kappa\text{P}\}\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{COO})\text{-}\kappa\text{COO},\text{-}\kappa\text{P}\}]$. Ten ostatni kompleks powstaje także w roztworach *cis*-PtTCEP w $\text{DMSO} + \text{H}_2\text{O}$ i $\text{DMF} + \text{H}_2\text{O}$. W roztworze wodnym kompleks *trans*-PtTCEP po jednym dniu ulega całkowitej izomeryzacji dając *cis*- $[\text{Pt}\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{COO})\text{-}\kappa\text{COO},\text{-}\kappa\text{P}\}_2]$ [H5].



Rys.5. Molekularna struktura związku $trans\text{-}[\text{PtCl}_2\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})_3\}_2]$ (a) oraz molekularna struktura kompleksu $trans\text{-}[\{(\text{DOOCC}_2\text{H}_4)_3\text{P}\}\text{ClPd}(\mu\text{-Cl})_2\text{PdCl}\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOD})_3\}]$ (b) [H5,H8].

Podobnie jak kompleksy platyny, związki Pd(II): $trans\text{-}[\text{PdCl}_2(\text{TCEP})_2]$ (**1Pd**) i $trans\text{-}[(\text{TCEP})\text{ClPd}(\mu\text{-Cl})_2\text{PdCl}(\text{TCEP})]$ (**2Pd**) są rozpuszczalne w H_2O , DMSO, DMF oraz EtOH, stabilne są w DMSO i DMF. W roztworach wodnych ligandy Cl łatwo zostają zastępowane przez atomy tlenu z grupy COO fosfiny albo H_2O . Wyniki uzyskane metodami NMR i ESI-MS wskazują, że w wodnym roztworze związek **1Pd** tworzy kompleksy $[\text{PdP}_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{COO}\text{-}\kappa\text{O})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{COO})_n(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})_{4-n}]^{\text{H}+}$ (rys. 6A). Podobnie zachowuje się związek **2Pd**,



Rys. 6 Reakcja z wodą związku **1Pd** (A) oraz kompleksy powstałe w wodnym roztworze związku **2Pd** (B); $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_4\text{COOH}$ [H8].

po rozpuszczeniu w wodzie istnieją w równowadze dwa główne produkty: $[\text{Pd}_2\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COO}-\kappa\text{O}-\mu-\text{O}')(\text{C}_2\text{H}_4\text{COO}-\kappa\text{O})(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})\}_2]$ i $[\text{Pd}\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COO}-\kappa\text{O})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})\}(\text{H}_2\text{O})]$ – rys 6B. Stan równowagi zależy od temperatury, wraz z jej wzrostem zwiększa się zawartość związków mononulkearnych [H8]. Kompleks **2Pd** po krystalizacji z wody daje związek polimeryczny $[\text{PdCl}\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COO}-\kappa\text{O}-\mu-\text{O}')(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})_2-\kappa\text{P}\}]$ (**3Pd**), strukturę jego wyznaczono metodą rentgenograficzną, podobnie jak pozostałych kompleksów: *trans*- $[\text{PdCl}_2\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOD})_3\}_2]$ (**1aPd**), *trans*- $[\{(\text{DOOCC}_2\text{H}_4)_3\text{P}\}\text{ClPd}(\mu-\text{Cl})_2\text{PdCl}\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOD})_3\}]$ (**2aPd**) i $[\text{PdCl}\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOD})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{COO}-\mu-\text{O},\text{O}')\}]_n$ (**3aPd**). Przykładowa molekularna struktura otrzymanego związku została przedstawiona na rysunku 5b [H8].

Podsumowując, rezultaty uzyskane metodami eksperymentalnymi i na podstawie obliczeń kwantowych, pokazują że badane związki w roztworach mogą tworzyć wiele izomerów i konformerów o podobnej energii. Otrzymane kompleksy mają struktury o bardzo różnej liczbie koordynacji od 4 do 7. Modyfikacja ich struktur może nastąpić stosunkowo łatwo, co prawdopodobnie ułatwia ich oddziaływanie z biomolekułami, co powinno przyczyniać się do dużej aktywności biologicznej nowo otrzymanych związków.

Aktywność biologiczna kompleksów cyny, platyny i palladu (2).

Przeprowadzone testy *in vitro* dla wybranych związków cynoorganicznych i koordynacyjnych wykazały ich wysoką aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą i przeciwnowotworową. Badania prowadzono w zespole prof. Stanisława Ułaszewskiego (Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski) i w zespole prof. Małgorzaty Latochy na Wydziale Farmaceutycznym (oddział Sosnowiec) Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Aktywność przeciwbakteryjną kompleksów cyny z kwasem sulfobenzoesowym (Snsbz) i sulfosalicylowym (Snssal) przetestowano przeciw szczepom bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. luteus* i *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* i *S. epidermidis*. Jedynie szczep *Pseudomonas aeruginosa* okazał się odporny na działanie związków cyny DBTsbz (MIC>100) oraz TDBTssal2 (MIC>100). Rozwój pozostałych bakterii był silnie lub całkowicie hamowany przy stężeniach 3 – 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ dla kompleksów cyny z kwasem sulfobenzoesowym [H1]. Interesujące jest, że różną aktywność, w zależności od rodzaju bakterii, wykazuje kompleks cyny z kwasem sulfosalicylowym – TBTssal: bardzo dużą w stosunku do bakterii Gram(+) (*M.luteus* i *S.aureus*) bo już przy stężeniu 2,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ hamuje ich rozwój i niską przeciwko *E. coli* (MIC>100). Natomiast drugi

z badanych kompleksów – TDBTssal2 ma aktywność na takim samym poziomie ($MIC=25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) w stosunku do Gram(+) jak i Gram(-) bakterii z wyjątkiem *P. aeruginosa* [H2]. Związki Snsal wykazują też aktywność przeciw licznym szczepom grzybów: *C. albicans*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *S. cerevisiae*. Wyższą aktywnością charakteryzuje się TBTssal w porównaniu z DTBTssal, ponieważ hamuje on rozwój badanych grzybów w przedziale stężeń od 12,5 do 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ a MIC dla DTBTssal wynosi 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Znacznie bardziej grzybobójczo działa związek z kwasem sulfobenzoesowym - TBTsbz, ponieważ MIC dla grzybów drożdżopodobnych i dermatofitów zawiera się w przedziale 0,25 do 4,68 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ [A26, A27]. Wyniki te potwierdzają ogólną obserwację, że aktywność antybakteryjna jest większa dla kompleksów tributyllocyny w porównaniu z dwubutyllocyną. Aktywność przeciwnowotworową dla związków cynoorganicznych badano na wielu liniach komórkowych, były to m.in. gruczolakorak jelita grubego (Caco-2), gruczolakorak płuc (A549), glejak wielopostaciowy (SNB-19), czerniak (G-361, SH-4, C-32). Przykładowe porównanie cytotoksyczności w zależności od struktury danego kompleksu przedstawia tabela nr 1. Widzimy, że związki Snsal są znacznie bardziej aktywne w porównaniu z *cis*-diaminadichloroplatyną(II), co interesujące, są mniej toksyczne w stosunku do linii komórkowych zdrowych (NHDF).

Tabela 1. Aktywność cytostatyczna kompleksów cyny z kwasem sulfosalicylowym [H2].

	IC_{50} [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]			
	TBTssal	DTBTssal	TDBTssal	<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]
Caco-2	0.057 ± 0.004	0.032 ± 0.005	0.057 ± 0.0086	9.17 ± 0.04
A549	0.10 ± 0.082	0.061 ± 0.007	0.154 ± 0.015	3.15 ± 0.4
C-32	0.11 ± 0.04	0.035 ± 0.008	1.05 ± 0.09	16.66 ± 0.6
SH-4	0.12 ± 0.05	0.075 ± 0.009	1.22 ± 0.11	123 ± 15
G-361	0.45 ± 0.04	0.065 ± 0.005	1.55 ± 0.08	-
NHDF	10.5 ± 0.42	10.1 ± 0.39	30.2 ± 0.94	-

Podobnie wysoką aktywnością charakteryzuje się kompleksy cyny z kwasem sulfobenzoesowym oraz z kwasem 2,2'-bipirydino-3,3',6,6'-tetrakarboksylowym (bptcH4). Wszystkie trzy kompleksy cyny z bptcH4 są znacznie bardziej aktywne w porównaniu z *cis*-diaminadichloroplatyną(II), IC_{50} dla tych kompleksów w stosunku do różnych linii zawiera

się w przedziale od 0,008 do 0,093 $\mu\text{g}/\text{cm}^{-3}$, a dla cisplatyny $\text{IC}_{50}=5-8 \mu\text{g}/\text{cm}^{-3}$. Najbardziej toksyczne okazują się być względem linii amelanotycznego czerniaka (C-32), szczególnie aktywny był kompleks: $[(\text{DMF})\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_2(\text{C}_{14}\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_8)\text{Sn}_2(\text{C}_4\text{H}_9)_6]$ - $\text{IC}_{50}=0,008 \mu\text{g}/\text{cm}^{-3}$ [H5]. Uzyskano też bardzo obiecujące wyniki w testach *in vitro* cytotoksyczności związków cyny z kwasem sulfobenzoesowym, prowadzonych w ramach współpracy z zespołem prof. Bożeny Obmińskiej-Mrukowicz w Katedrze Biochemii Farmakologii i Toksykologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Badania dotyczyły głównie linii komórkowych nowotworów występujących u psów. Jedną z głównych przyczyn śmierci tych zwierząt, obok chorób zakaźnych, są właśnie choroby nowotworowe (chłoniaki nieziarnicze, białaczka limfocytarna, kostniakomięsaki). Wciąż poszukuje się nowych, skutecznych środków przeciwrakowych będących alternatywą np. w stosunku do stosowanej karboplatyny. Przeprowadzono badania aktywności związków Snsbz wobec dwóch linii komórek należących do nowotworów układu limfatycznego: GL-1 (ostra białaczka B-komórkowa), CLBL-1 (chłoniak B-komórkowy), a także wobec D-17 (kostniakomięsak psa) oraz względem Jurkat (linia białaczki T komórkowej człowieka). Kompleksy z kwasem sulfobenzoesowym wobec linii D-17 okazały się 100 krotnie bardziej aktywne niż karboplatyna [H8].

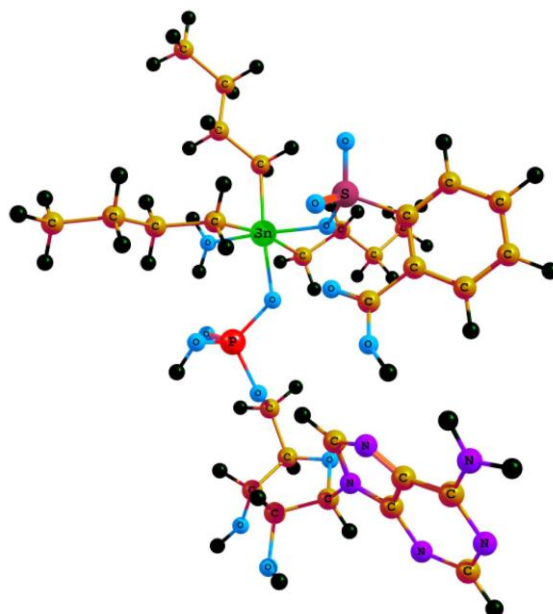
Związki palladu(II) i platyny(II) z $\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3$ również wykazują aktywność antyrakową względem wielu linii nowotworowych, np.: Sk-mel (czerniak złośliwy), SH-4 (melanotyczny czerniak), Colo-829 (czerniak złośliwy), C-32 (amelanotyczny czerniak), MCF7 (potrójnie pozytywny rak piersi), T-47D (potrójnie pozytywny rak piersi), MDA-MB-231 (potrójnie negatywny rak piersi). Największą aktywność wykazują wobec komórek MDA-MB-231. Efektywność związków Pd i Pt względem MDA-MB-231 jest znacznie większa ($\text{IC}_{50} = 8 - 10 \mu\text{M}$) niż aktywność *cis*-diaminadichloroplatyny(II) ($\text{IC}_{50} = 61 \pm 7 \mu\text{M}$). IC_{50} w stosunku do pozostałych badanych linii nowotworowych przyjmuje wartości w przedziale 100 – 500 μM [H7].

Oddziaływanie wybranych związków z biomolekułami oraz z lipidowymi modelami błon (3 i 4).

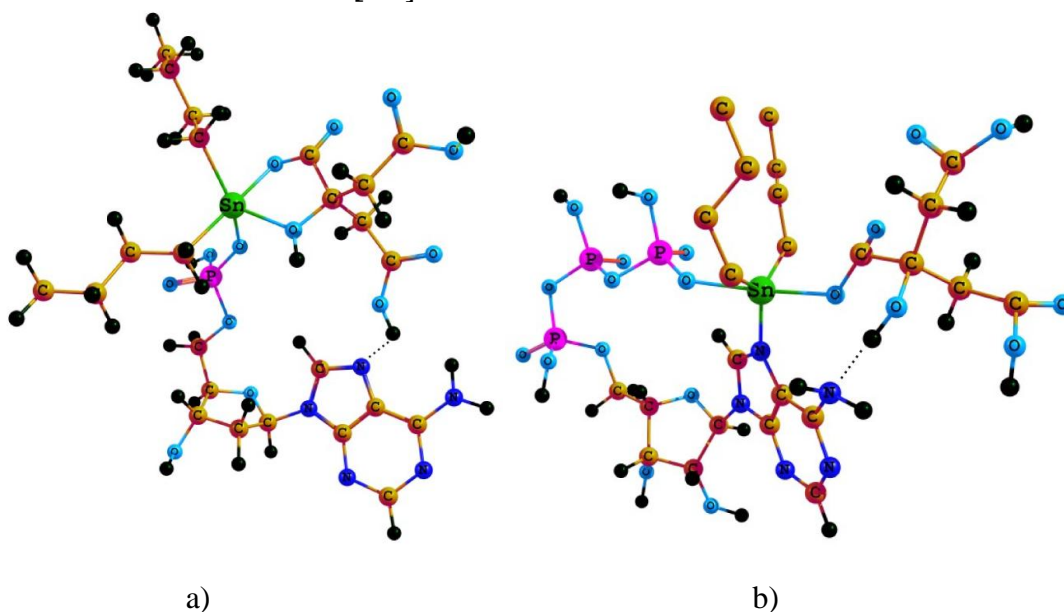
Badania prowadzone od wielu lat nad znaną cisplatyną pozwoliły zrozumieć mechanizm jej działania. Cisplatyna, należy do związków alkilujących, tzn. jej działanie polega na tworzeniu stabilnych wiązań z DNA, poprzez tworzenie wiązań wewnątrzniczowych do atomów N(7) sąsiadujących guanin, co uniemożliwia jego dalszą

replikację. Jednakże, kilka innych dodatkowych mechanizmów odgrywa rolę w cytotoksyczności leków platynowych. Kompleksy platyny mogą reagować z szeregiem składników komórkowych, np. z glutationem albo z białkami np. z albuminą. To może wpływać na skuteczność związków platyny, ponieważ znaczna część kompleksów Pt(II) zostaje wyeliminowana właśnie na wskutek wiązania się z białkami osocza. Ponadto cisplatyna ma skłonność do interakcji z fosfatydyloseryną i innymi fosfolipidowymi składnikami błon komórkowych i w ten sposób moduluje jej funkcje [22-25]. Aktywność biologiczna nowo otrzymanych kompleksów cyny, palladu i platyna może być związana z oddziaływaniem tych związków z zasadami nukleotydowymi, białkami czy też fosfolipidami. Przy użyciu ^1H , ^{13}C , ^{31}P and ^{119}Sn NMR zbadano oddziaływanie wybranych kompleksów metali z zasadami nukleotydowymi DAMP, AMP i ATP. Dodatkowo metodą kwantowych obliczeń (DFT) przeanalizowano niektóre struktury elektronowe powstałych kompleksów związek-nukleotyd [**H1-H3**, **H6**]. Ponadto, w ramach współpracy z dr Teresą Kral (zespół prof. Martina Hofa, Instytut Chemii Fizycznej, Czeska Akademia Nauk), przeprowadzono badania oddziaływań wybranych związków z plazmidowym DNA [**H4**, **H7**]. Sprawdzono także wpływ wybranych kompleksów na lipidowe błony modelowe i molekularne oddziaływania z fosfolipidami [**H4**, **H7**, **H9**].

Widma NMR kompleksów Snsbz w obecności AMP i ATP wskazują, że obie zasady efektywnie oddziałują ze związkami cyny. Na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że AMP jest skoordynowany z atomem cyny poprzez atom O z grupy PO_4 i najprawdopodobniej poprzez atom -N7 [**H1**]. Innym możliwym wytłumaczeniem jest tworzenie wiązania wodorowego cząsteczki H_2O z kompleksem cyny i atomem N7: $\text{SnBu}_n(\text{O}_3\text{SC}_4\text{H}_4\text{COO})\text{-HOH-N7}$ albo oddziaływanie grupy COOH z atomem N7 (rys.7). Wyniki (^1H , ^{13}C , ^{31}P i ^{119}Sn NMR) pokazały, że kompleksy cyny z kwasem sulfosalicylowym (SnHssal) oddziałują z DAMP i ATP tworząc wiązanie Sn-OP i $\text{O}'\text{-H}'\dots\text{O}$ oraz wiązania wodorowe $\text{N}\dots\text{H-O}$ (nukleotyd-Hssal). Bardzo ważną rolę w interakcji związek-nukleotyd pełni ligand Hssal. Dodatkowo, istniejące temperaturowe zależności w widmach NMR dla układu nukleotyd-kompleks świadczą prawdopodobnie o tym, że w roztworze są kompleksy o dynamicznych właściwościach [**H2**]. Aktywnie z nukleotydami (AMP, DAMP i ATP) reagują też związki cyny z kwasem cytrynowym i winowym tworząc pięciokoordynacyjne kompleksy, powstają wiązania Sn-OP oraz wiązania wodorowe $\text{COOH}\dots\text{N}$ i $\text{OH}\dots\text{N}$ (ligand karboksylowy- nukleotyd) [**H3**].



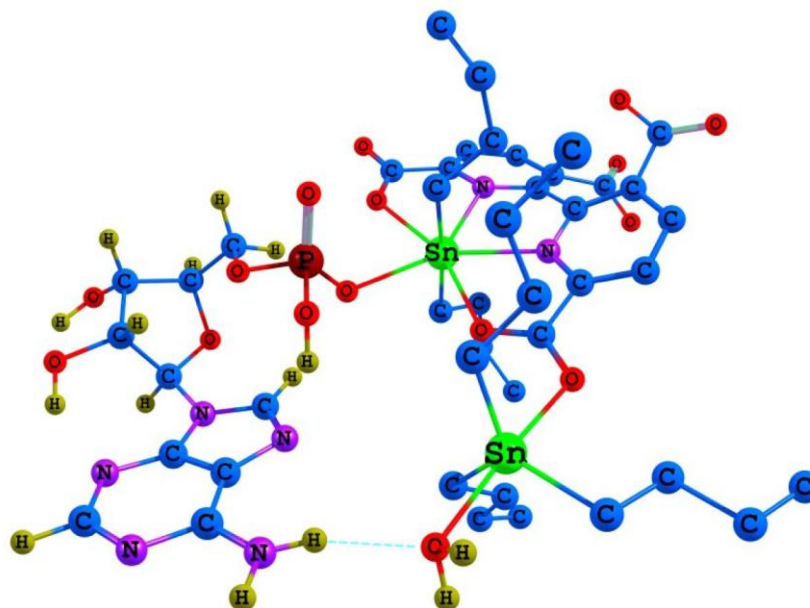
Rys. 7 Proponowana struktura kompleksu $[\text{SnBu}_3(\text{O}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{COOH})(\text{H}_2\text{O})\text{AMP}]$ z AMP skoordynowanym z atomem Sn przez atom O grupy fosforanowej obrazująca oddziaływanie COOH z atomem N7 AMP [H1].



Rys. 8 Proponowana struktura $[\text{SnBu}_2(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7)(\text{DAMP})]$ (**1cit**·DAMP) obrazująca oddziaływanie pomiędzy grupą COOH a atomem N7 nukleotydu (a), proponowana struktura $\text{SnBu}_2(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7)(\text{ATP})$ (**1cit**·ATP) z ligandem ATP (b).

W związku dibutylocyny (**1cit**) z DAMP cytrynian może być skoordynowany z atomem Sn przez grupy COO i OH, a nukleotyd przez grupę fosforanową, co umożliwia także oddziaływanie jednej z grup COOH cytrynianu z atomem N7 pierścienia purynowego (rys. 8a). W przypadku oddziaływania **1cit** z ATP możliwe jest skoordynowanie nukleotydu z atomem Sn przez atom O grupy $\gamma\text{-PO}_4$ i atom N7 z jednoczesnym utworzeniem wiązania

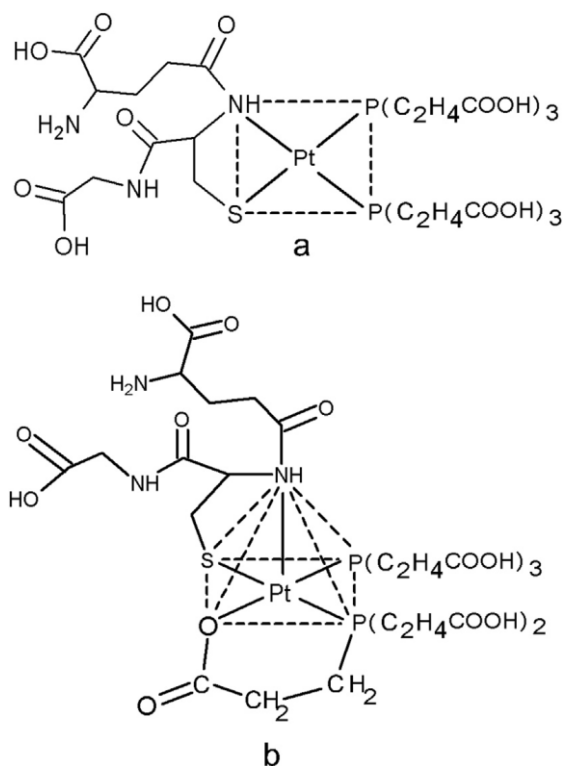
wodorowego $\text{COOH}\cdots\text{NH}_2$ (rysunek 8b) [**H3**]. Sprawdzono również, że kompleksy cyny z kwasem 2,2'-bipirydino-3,3',6,6'-tetrakarboksylowym oddziałują z AMP. Widma ^1H , ^{31}P i ^{13}C NMR związku **2Snbptc** w obecności AMP wskazują, że najprawdopodobniej w roztworze tworzą się wielordzeniowe i jednorodzeniowe kompleksy zawierające AMP. Trinuklearne i dinuklearne kompleksy najprawdopodobniej są skoordynowane z jedną albo dwiema molekułami AMP: $[(\text{AMP})\text{SnBu}_2(\text{bptc})\text{SnBu}_3(\text{H}_2\text{O})]^-$, $[(\text{H}_2\text{O})\text{SnBu}_2(\text{bptc})\text{SnBu}_3(\text{AMP})]^-$, $[(\text{AMP})\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_2(\text{bptc})\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3(\text{AMP})]^-$, $[\text{Sn}_3(\text{C}_4\text{H}_9)_8(\text{bptc})(\text{AMP})]$, $[\text{SnBu}_2(\text{bptc})(\text{AMP})]^{2-}$.



Rys.9 Proponowana struktura dwurdzeniowego kompleksu $[(\text{AMP})\text{SnBu}_2\{\text{C}_{10}\text{H}_4\text{N}_2(\text{COO})_4\}\text{SnBu}_3(\text{H}_2\text{O})]$ cyny z AMP skoordynowanym z siedmiokoordynacyjnym atomem cyny poprzez grupę fosforanową i poprzez wiązanie wodorowe $\text{NH}\cdots\text{OH}_2\text{Sn}$ [**H6**].

Prawdopodobną strukturę dwurdzeniowego kompleksu Snbptc z AMP przedstawia rys. 9. Podsumowując, kompleks **2Snbptc** oddziałuje z AMP poprzez grupę fosforanową, skoordynowane molekuly AMP tworzą wiązania wodorowe pomiędzy grupami NH_2 , OH lub atomem N7 adeniny a grupami OOC liganda bptc [**H6**].

Zbadano oddziaływanie nowo otrzymanych kompleksów platyny z TCEP ze zredukowanym glutationem (GSH) [**H5**]. GSH jest niezwykle ważnym przeciwutleniaczem występującym w każdej komórce organizmu, reaguje on z platynowymi lekami przeciwnowotworowymi. Badania przeprowadzono przy użyciu ^1H , ^{13}C i ^{31}P NMR dla wodnych roztworów $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{TCEP})_2]$ i GSH. Na podstawie uzyskanych widm stwierdzono, że $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{TCEP})_2]$ oddziałuje ze zredukowanym glutationem poprzez atom S i grupę cysteinową NH. Prawdopodobne powstałe kompleksy związek platyny–GSH przedstawia rys. 10 [**H5**].



Rys. 10 Prawdopodobna struktura kompleksów $[\text{Pt}(\text{SG}-\kappa\text{N},\kappa\text{S})\{\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3\}_2]$ (a) i $[\text{Pt}(\text{SG}-\kappa\text{N},\kappa\text{S})\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})_3-\kappa\text{P}\}\{\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{COO})-\kappa\text{O},\kappa\text{P}\}]$ (b) **[H5]**.

Zbadano molekularne oddziaływanie wybranych kompleksów z plazmidowym DNA przy użyciu metody fluorescencyjnej TCSPC-FCS (Time-Correlated Single Photon Counting Fluorescence Correlation Spectroscopy). Metoda ta pozwala obserwować ruchliwość pojedynczych molekuł w roztworze, śledzi się przypadkowe ruchy znakowanych fluorescencyjnie biomolekuł w ściśle zdefiniowanej objętości, oświetlanej przez wiązkę lasera. Podstawowe parametry wyznaczone z FCS-TCEP to: czas dyfuzji, który zmienia się w zależności od tego czy DNA ulega zmianom konformacyjnym, czas życia znacznika (lifetime), który może ulec zmianie wskutek zmian w otoczeniu cząsteczki znacznika oraz PN (particie number), który w przypadku małych molekuł jest proporcjonalny do ich stężenia [26, 27]. Analiza wyznaczonych parametrów (czasu dyfuzji, czasu życia i PN) pokazała, że kompleks dibutylocyny z kwasem cytrynowym ($[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_2(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7)]$ – DBTC) aktywnie oddziałuje i powoduje kondensację czyli formowanie się upakowanej formy DNA. Prawdopodobnie efekt ten zachodzi na wskutek interakcji DBTC z grupą fosforanową DNA i zobojętniania ładunku, co prowadzi do zmian upakowania DNA **[H4]**. Z DNA oddziaływały również kompleksy cyny z kwasem sulfobenzoesowym, efekt zależał od struktury kompleksu i zmniejszał się w szeregu: DBTsbz > TBTsbz > DTBTsbz. Wszystkie trzy kompleksy powodowały dodatkowe “zgięcia” nici DNA, ale nie doprowadziły do jej ciasnego

upakowania [H7]. Bardzo aktywnym, jeśli chodzi o kondensację DNA okazał się związek *cis*-[PtCl₂(TCEP)₂], powodował on znacznie większe efekty aniżeli *cis*paltyna (doniesienie konferencyjne nr 49, zał. 3a).

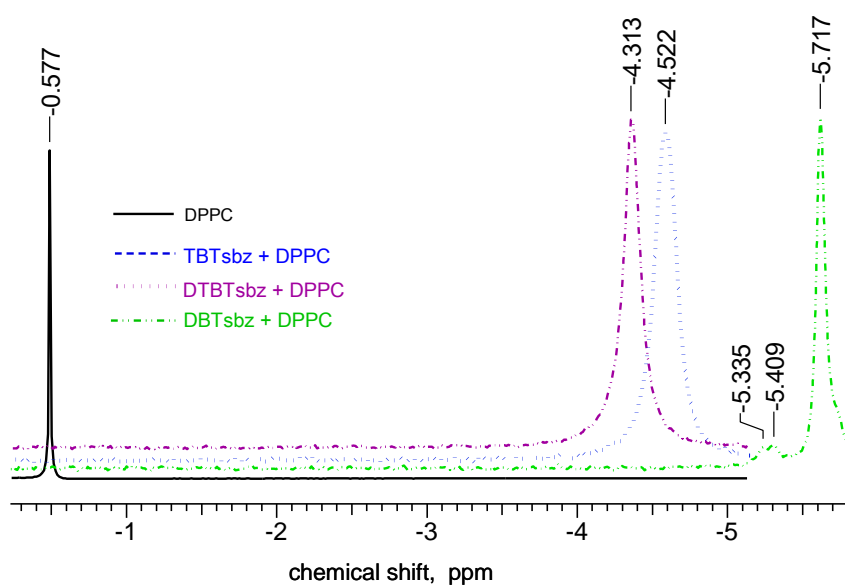
Do badań oddziaływań wybranych kompleksów metali z lipidowymi błonami modelowymi wykorzystano metodę różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), spektroskopię IR i NMR oraz fluorymetrię. Celem tych badań było sprawdzenie wpływu badanych związków na strukturę i parametry termotropowe błony, sprawdzenie ich lokalizacji w błonie oraz zbadanie molekularnych oddziaływań z lipidami.

Metodą DSC sprawdzono wpływ danego związku na przejścia fazowe lipidów. Wiadomo, że lipidy mogą tworzyć różne rodzaje struktur, w zależności od ich budowy, temperatury, poziomu hydratacji itd. Typowe struktury poniżej temperatury głównego przejścia fazowego to dwuwarstwy w fazie żelu (L_{β}), lub w fazie krystalicznej pofałdowanej „ripple phase” (P_{β}). W temperaturze głównego przejścia fazowego (T_m) faza uporządkowana przechodzi w fazę ciekłokrystaliczną (L_{α}). Zmienia się konformacja łańcuchów alkilowych lipidów z „*trans*” w „*gauche*”, co prowadzi do zwiększenia ich ruchliwości rotacyjnej wzdłuż wiązań węgiel-węgiel oraz do powstania zagięć powodujących rozluźnienie upakowania cząsteczek w dwuwarstwie. Dalszy wzrost temperatury może doprowadzić do utworzenia, przez niektóre lipidy, faz heksagonalnych lub kubicznych [28]. Dla czystych lipidów główne przejście fazowe jest bardzo wyraźne, ostre, kooperatywne o małej szerokości połówkowej ($\Delta T_{1/2}$). Wartości szerokości połówkowej piku mogą być zatem dobrym wskaźnikiem zmian zachodzących w dwuwarstwie. Z pomiarów kalorymetrycznych wyznaczono następujące parametry: temperaturę przedprzejścia lipidu (T_p) z fazy L_{β} do P_{β} , temperaturę głównego przejścia fazowego (T_m) z fazy P_{β} do L_{α} , oraz zmiany entalpii (ΔH) i szerokości połówkowej piku dla temperatury głównego przejścia fazowego ($\Delta T_{1/2}$). Pomiarów kalorymetrycznych wykonano dla liposomów wielowarstwowych (MLVs) uformowanych z 1,2-dipalmito-3-fosfatydylocholiną (DPPC) lub z 1,2-dimirysto-3-fosfatydylocholiną (DMPC) albo z 1,2-dimirysto-3-fosfatydyloetanolaniny (DMPE), które były modyfikowane wybranymi kompleksami metali [H4, H9]. Wyniki uzyskane tą techniką pokazały, że badane związki oddziałują z dwuwarstwą lipidową, najprawdopodobniej z jej hydrofilową częścią. Kompleks dibutylocyny z kwasem cytrynowym – [Sn(C₄H₉)₂(C₆H₆O₇)] – DBTC bardzo nieznacznie zmieniał T_m zarówno dla DPPC, DMPC i DMPE w badanym zakresie stężeń (stosunek molarny DBTC/lipid = 0,01-0,20). Obserwowano za to likwidację przedprzejścia i zmniejszenie zmian entalpii głównego przejścia fazowego. Samo przejście

stawało się mniej kooperatywne, przy wyższych stężeniach (DBTC/lipid $\geq 0,03$) następowało wyraźne rozdzielanie pików (DPPC, DMPE) co może być wynikiem tworzenia się obszarów (domen) o różnej zawartości związku albo zmian w strukturze dwuwarstwy (dla DMPE wysokotemperaturowy pik) [H4]. Znacznie większe zmiany T_m zaobserwowano dla kompleksów cyny z kwasem sufobenzoesowym (Snsbz) i sulfosalicylowym (doniesienie konferencyjne nr 42, 48, zał.3a). Wszystkie trzy kompleksy Snsbz powodowały obniżenie temperatury głównego przejścia fazowego, zmniejszenie entalpii i likwidację przedprzejścia (Snsbz/DPPC $\geq 0,017$) [H9]. Dla związków TBTsbz i DTBTsbz bardzo znacznie wzrastała wartość $\Delta T_{1/2}$, pik głównego przejścia fazowego stawał się asymetryczny, a przy najwyższych stężeniach można było wyodrębnić wyraźną część pików z maksimum przesuniętym w stronę niższych temperatur i mały „garb” z maksimum oscylującym około T_m , albo nieznacznie przesuniętym powyżej tej temperatury (dla DTBTsbz). Może to świadczyć o tworzeniu się lokalnych niejednorodności w błonie przejawiających się właśnie powstaniem dodatkowych składowych kalorymetrycznych, być może na skutek nierównomiernej lokalizacji związku. Podsumowując wyniki badań DSC można stwierdzić, że kompleksy Snsbz i Snsal w większym stopniu zmieniają parametry termotropowe dwuwarstwy w porównaniu z kompleksem cyny z kwasem cytrynowym, jeszcze mniejsze zmiany były obserwowane dla *cis*-[PtCl₂(TCEP)₂] i cisplatyny (doniesienia konferencyjne nr 42 i 49, zał. 3a). Na podstawie rezultatów z DSC można przypuszczać, że związki Snsbz są częściowo zlokalizowane w hydrofilowym obszarze dwuwarstwy, a być może również polarno-apolarnym, powodując zmiany płynności błony. W celu sprawdzenia lokalizacji związków w błonie, a także ich wpływu na płynność i uporządkowanie dwuwarstwy zastosowano metodę fluorymetryczną. Odpowiednio dobrane sondy fluorescencyjne pozwalają na ocenę powyższych parametrów błony. Interakcja związku ze składnikami błony wpływa na intensywność fluorescencji emitowanej przez fluorofor zlokalizowany w różnych obszarach dwuwarstwy, zmianie ulegnie zatem wartość anizotropii fluorescencji (A) i współczynnika uogólnionej polaryzacji (GP). Badania przeprowadzono przy użyciu kilku sond: DPH, Laurdan, Prodan i merocyjanina (MC540). Pierwsza z nich zlokalizowana jest obrębie obszaru łańcuchów alkilowych, pozostałe trzy w obszarze polarnym dwuwarstwy. Chromofor sondy Laurdan znajduje się na poziomie glicerolu, natomiast Prodan znajduje się powyżej szkieletu glicerowego, na granicy części hydrofilowej dwuwarstwy i środowiska wodnego. Sondy te są wrażliwe na zmiany upakowania i uwodnienia cząstek lipidów [29, 30]. MC540 jest sondą adsorbującą się na powierzchni błony. Jej wydajność kwantowa zależy od polarności ośrodka,

intensywność MC540 jest duża, gdy liposomy są w fazie ciekłokrystalicznej, natomiast w fazie żelu jej intensywność znacząco spada. Wydaje się zatem, że jest to bardzo dobra sonda do pomiaru stopnia powierzchniowej organizacji lipidów ze względu na swoje właściwości adsorpcyjne, fluorescencyjne (brak emisji w wodzie) i fizykochemiczne (cząsteczka amfifilowa) [31]. Pomiaru fluorymetryczne prowadzono w dużym zakresie temperatur, poniżej i powyżej T_m danego lipidu, co pozwalało wyznaczyć A i GP zarówno w fazie żelu (L_β , P_β) jak i ciekłokrystalicznej (L_α) i jednocześnie sprawdzić temperaturę głównego przejścia fazowego lipidu. Obiektem badań były „czyste” MLVs uformowane z DPPC lub DMPC i liposomy z odpowiednim związkiem [H4, H9]. Uzyskane rezultaty pokazały, że DBTC praktycznie nie wpływa na płynności błony, wartości anizotropii dla układu DBTC/lipid były porównywalne z A dla czystego lipidu. Pod wpływem związku zmieniły się wartości GP, zarówno w fazie żelu jak i ciekłokrystalicznej (dla Laurdanu), głównie w fazie P_β i L_α dla Prodanu [H4]. Znaczące zmiany w intensywności MC540 zaobserwowano w obecności kompleksów Snsbz. Wszystkie trzy związki spowodowały wzrost intensywności sondy (w fazie L_β i L_α) oraz przesunięcie maksimum w stronę niższych wartości temperatur. Możemy wnioskować, że badane kompleksy zmieniają organizację (upakowanie) DPPC w dwuwarstwie, co może być związane również ze stopniem uwodnienia błony. Świadczą też o tym zmiany wartości GP dla Prodanu, i dla Laurdanu. Co interesujące nie zaobserwowano istotnych zmian w płynności obszaru hydrofobowego błony [H9]. Prawdopodobnie badane kompleksy oddziałują z polarnymi głowami lipidów, nie wnikają w obszar hydrofobowy błony. Aby uzyskać dokładniejsze informacje na temat molekularnego mechanizmu oddziaływania kompleksów Snsbz z lipidami modelowej błony posłużono się spektroskopią w podczerwieni z transformacją Fouriera z zastosowaniem metody całkowitego odbicia ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection – Fourier Transform Infrared Spectroscopy). Pomiaru wykonano dla liposomów uformowanych z DPPC w H_2O [H9] i D_2O [H7] oraz dla „suchego filmu” DPPC i związków po odparowaniu rozpuszczalnika CD_3OD [H7]. Badania IR wykonane w temperaturze pokojowej dla filmu lipidowego i liposomów (D_2O) pokazały, że największe zmiany w widmie absorpcyjnym w podczerwieni są dla liczb falowych reprezentujących drgania grup funkcyjnych zlokalizowanych w rejonie polarnym lipidów. Zaobserwowano wzrost częstotliwości drgań symetrycznych i asymetrycznych grupy cholinowej $\nu_s\{N(CH_3)_3\}$ i $\nu_{as}\{N(CH_3)_3\}$, wzrost $\nu(P-OC)$ i obniżenie dla grupy fosforanowej $\nu_s(PO_2^-)$ i $\nu_{as}(PO_2^-)$. Szczególnie duże zmiany były obserwowane dla drgań niesymetrycznych grupy fosforanowej $\nu_{as}(PO_2^-)$. Oddziaływanie kompleksów z DPPC potwierdzały też zmiany

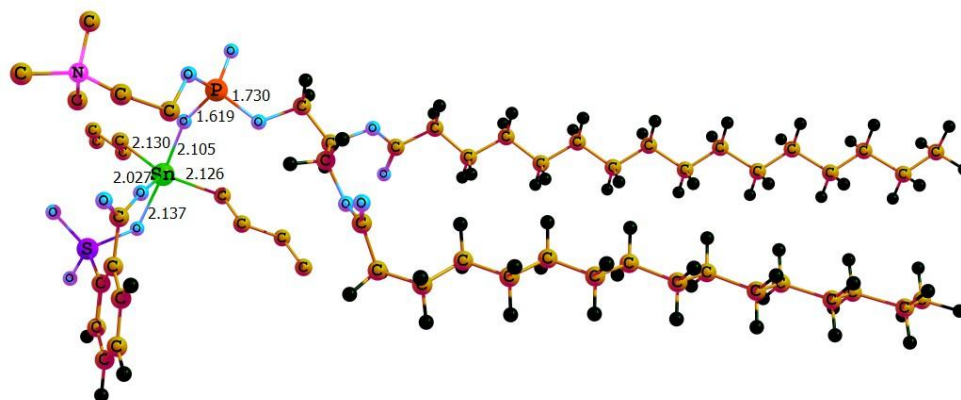
wartości liczb falowych dla grupy SO_3 liganda sulfobenzoesowego. Najbardziej wyraźny efekt zaobserwowano dla DBTsbz. Dane uzyskane z IR wskazują zatem, że badane kompleksy są skoordynowane z grupą fosforanową DPPC poprzez oddziaływanie grup COO i SO_3 z atomem O cząsteczki lipidu [H7]. Dodatkowo sprawdzono oddziaływanie kompleksów Snsbz z lipidową błoną modelową w różnych temperaturach (od 25 do 50°C). W widmach absorpcyjnych analizowano m.in. pasma w zakresie 3000-2800 cm^{-1} odpowiadające drganiom symetrycznym $\nu_s(\text{CH}_2)$ i asymetrycznym $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ łańcuchów alkilowych. Stwierdzono, że badane związki nieznacznie obniżają temperaturę głównego przejścia fazowego, pasma odpowiadające drganiom grup CH_2 zostały przesunięte w stronę wyższych wartości liczb falowych [H9]. Lokalizację kompleksów w polarnej części dwuwarstwy potwierdziły wyniki uzyskane metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H , ^{13}C i ^{31}P NMR). Analiza uzyskanych widm wskazuje, że Snsbz oddziałują z cząsteczką DPPC tworząc wiązanie Sn-OP, z grupą fosforanową, o czym świadczą duże zmiany przesunięć chemicznych w ^{31}P NMR (rys. 11). Możliwe jest również utworzenie wiązania wodorowego O-O-H ...O- P pomiędzy cząsteczką H_2O przyłączoną do atomu Sn związku a atomem O grupy fosforanowej DPPC [H7].



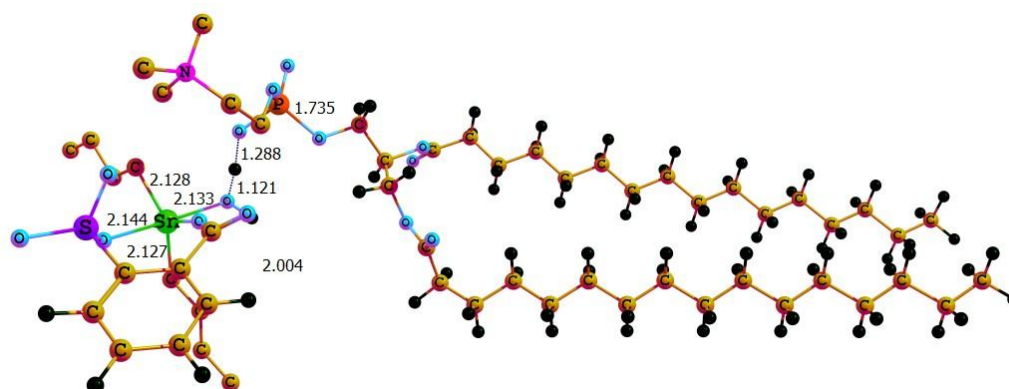
Rys. 11. Widmo ^{31}P NMR dla układu Snsbz/DPPC w roztworze CD_3OD .

Dodatkowo, przy użyciu metody DFT na poziomie B3LYP/LanL2DZ obliczono najbardziej prawdopodobne struktury DPPC i DBTsbz/DPPC. Obliczenia dla układu $[\text{SnBu}_2(\text{O}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{COO})]$ – lipid pokazują, że DPPC z kompleksem cyny może tworzyć wiązanie Sn-O-P pomiędzy atomem cyny a atomem tlenu grupy fosforanowej ($d_{\text{Sn-O}} = 2,105$

Å) (rys. 12a). Możliwe jest także utworzenie wiązania wodorowego O-H...O-P pomiędzy skoordynowaną cząsteczką wody kompleksu $[\text{SnBu}_2(\text{O}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{COO})(\text{H}_2\text{O})]$ a atomem tlenu grupy fosforanowej DPPC (rys. 12b), co jest zgodne z danymi doświadczalnymi.



a



b

Rys. 12 Optymalizowane metodą DFT B3LYP/LanL2DZ struktury kompleksów $[\text{SnBu}_2(\text{O}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{COO})(\text{DPPC})]$ (a) i $[\text{SnBu}_2(\text{O}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{COO})(\text{H}_2\text{O})(\text{DPPC})]$ (b).

Podsumowanie badań – wnioski.

W ramach doniesienia naukowego opisano strukturę i właściwości 22 nowo zsyntetyzowanych związków: 17 cyanoorganicznych, dwa kompleksy platyny i trzy kompleksy palladu. Dla kilku związków cyanoorganicznych i dla kompleksów palladu i platyny została wyznaczona struktura krystalograficzna. Dla wybranych kompleksów sprawdzono aktywność biologiczną. Metodami spektroskopowymi (IR i ^1H , ^{13}C , ^{31}P i ^{119}Sn NMR), DSC, fluorymetryczną i DFT zbadano oddziaływanie wybranych związków z

zasadami nukleotydowymi, lipidami, DNA i GSH. Na podstawie uzyskanych rezultatów możemy stwierdzić, że:

1. Otrzymane związki są stabilne w rozpuszczalnikach polarnych, większość z nich rozpuszcza się EtOH, MeOH, DMF, DMSO i w mieszaninie woda:alkohol oraz w wodzie (kompleksy Pd(II) i Pt(II)).
2. Związki metaloorganiczne cyny i koordynacyjne palladu(II) i platyny(II) mają interesujące struktury o różnej liczbie koordynacji (4-7), charakteryzują się reaktywnością umożliwiającą efektywne oddziaływanie z biomolekułami.
3. Badane związki, szczególnie metaloorganiczne cyny, wykazują bardzo obiecujące właściwości cytostatyczne i cytotoksyczne.
4. Kompleksy cyny z kwasem sulfosalicylowym i sulfobenzoesowym są bardzo aktywnymi czynnikami przeciwrzybiczymi i antybakteryjnymi.
5. Badane związki cynoorganiczne i koordynacyjne są bardzo aktywnymi czynnikami przeciwnowotworowymi, aktywnie hamują (niszczą) rozwój różnorodnych komórek nowotworowych. Niektóre z nich są znacznie bardziej aktywne niż cisplatyna i karboplatyna, wartości IC_{50} dla niektórych związków są nawet 1000 razy mniejsze niż dla cisplatyny.
6. Aktywność cytostatyczna związków cynoorganicznych SnR_nX_{4-n} zależy od zależy głównie od liczby wiązań Sn-C oraz własności elektronowych i struktury grup R, a także od rodzaju liganda X oraz od liczby koordynacji.
7. Związki cynoorganiczne aktywnie oddziałują z nukleotydami: ATP, AMP, DAMP tworząc wiązania: Sn-OP i O'-H'...O oraz wiązania wodorowe N...H-O.
8. Kompleksy cyny z kwasem cytrynowym i sulfobenzoesowym oraz *cis*-[PtCl₂(TCEP)₂] powodują kondensację plazmidowego DNA.
9. Kompleks platyny *cis*-[PtCl₂(TCEP)₂] wiąże się z GSH poprzez atom S i grupę cysteinową NH.
10. Związki metaloorganiczne cyny w znacznym stopniu zmieniają parametry termotropowe lipidowych błon modelowych. Wpływ kompleksów Pd(II) i Pt(II) na te parametry jest znacznie mniejszy.
11. Kompleksy cyny z kwasem cytrynowym oddziałują z hydrofilową częścią błony modelowej, nie wnikają w obszar hydrofobowy. W fazie żelu praktycznie nie zmieniają płynności błony.

12. Kompleksy cyny z kwasem sulfobenzoesowym (Snsbz) oddziałują z polarnymi „głowami” lipidów błonowych, prawdopodobnie są obecne w hydrofilowym obszarze błony. Znacząco zmieniają upakowanie (uwodnienie) lipidów. Zmieniają płynność błony.
13. Związki Snsbz oddziałują z DPPC tworząc wiązanie Sn-OP albo wiązanie wodorowe O-H ...O- P pomiędzy cząsteczką H₂O przyłączoną do atomu Sn związku a atomem O z grupy fosforanowej DPPC.

Możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników.

Wyniki przeprowadzonych badań powinny pomóc w zaprojektowaniu składu bardziej skutecznych środków przeciwwgrzybiczych, przeciwbakteryjnych i przeciwnowotworowych. Badania wnoszą zatem istotny wkład w poszukiwania nowych, skutecznych i tanich związków przeciwdrobnoustrojowych. W planach, część w trakcie realizacji, są badania mające na celu określenie mechanizmu działania opisanych związków, m.in. zdolności do wywołania apoptozy komórek nowotworowych i wpływu na cykl komórkowy. Pierwsza praca dotycząca powyższych zagadnień pt. „*Complex of platinum(II) with tris(2-carboxyethyl)phosphine induces apoptosis in canine lymphoma/leukemia cell lines*” (autorzy: M. Henklewska, A. Pawlak, H. Pruchnik, B. Obmińska-Mrukowicz) została przyjęta do druku: *Anticancer Research* 37: 539-546 (2017).

Literatura

1. Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents. The Use of Metals in Medicine, Eds. E. R. T. Tiekink, M. Gielen, Wiley, Chichester, 2005.
2. M. A. Fuertes, C. Alonso, J. M. Perez, *Chem. Rev.*, 103 (2003), 645; G. Natile, M. Coluccia, *Coord. Chem. Rev.*, 216-217 (2001), 383; T. Boulikas, M. Vougiouka, *Oncology Reports*, 10 (2003), 1663.
3. V. Brabec, J. Kasparkova, Platinum-Based Drugs, , in “Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents. The Use of Metals in Medicine”, Eds. E. R. T. Tiekink, M. Gielen, J. Wiley, Chichester, 2005, chapter. 25, 489-506.
4. Alice V. Klein, Trevor W. Hambley, *Chem. Rev.*, 109 (2009), 4911–4920.
5. M. Fanelli, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, M. Micheloni, P. Paoli, *Coord. Chem. Rev.* 310 (2016) 41–79.
6. T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* 116 (2016) 3436–3486.
7. Al. Bergamo, G. Sava, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 8818-8835.
8. E. Wong, C. M. Giandomenico, *Chem. Rev.*, 99 (1999), 2451-2466.
9. M. J. Clarke, F. Zhu, D. R. Frasca, *Chem. Rev.*, 99 (1999), 2511-2533.
10. N. Farrel, *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents*, Kluwer, Dordrecht, 1989.

11. F. P. Pruchnik, Rhodium in Medicine, w *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents. The Use of Metals in Medicine*, Eds. E. R. T. Tiekink, M. Gielen, Wiley, Chichester, 2005, Chapter 20, 379-398.
12. H. T. Chifotides, K. R. Dunbar, *Acc. Chem. Res.* 38 (2005) 146-156.
13. N. Katsaros, A. Anagnostopoulou, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 297-308.
14. O. Lentzen, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, *Perspectives of Ruthenium Complexes in Cancer Therapy*, w *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents. The Use of Metals in Medicine*, Eds. E. R. T. Tiekink, M. Gielen, Wiley, Chichester, 2005, Chapter 19, 359-378.
15. S. K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.*, 253 (2009) 235–249.
16. A. G. Davies, P. J. Smith, in *Comprehensive Organometallic Chemistry*, eds. G. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. W. Abel, Pergamon Press, Oxford 1982, Chapter 11; A. G. Davies, in *Comprehensive Organometallic Chemistry*, eds. G. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. W. Abel, Pergamon Press, Oxford 1995, Chapter 6.
17. U. Dawid, F. P. Pruchnik, R. Starosta, *Dalton Trans.* (2009) 3348–3353.
18. D. Andrew Knight, Jeffrey R. Deschamps, Ray J. Butcher, Christa Simmers, Eddie L. Chang, *Polyhedron* 27 (2008) 1795–1801.
19. M. J. Clarke, F. Zhu, D. R. Frasca, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2511-2533.
20. E. Burmeister Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke, P. R. Selvin, *Anal. Biochem.* 273 (1999) 73–80.
21. T. J. Morin, W. R. Kobertz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 1478–1482.
22. L. Nierzwicki, M. Wiczor, V. Censi, M. Baginski, L. Calucci, S. Samaritani, J. Czub, C. Forte, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 1458-1468.
23. A.C. Alves, D. Ribeiro, C. Nunes, S. Reis, *BBA* 1858 (2016) 2231–2244.
24. H.S. Oberoi, N.V. Nukolova, A.V. Kabanov, T.K. Bronich, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65(0) (2013) 1667-1685.
25. L. Trynda-Lemiesz, M. Łuczkowski, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1851–1856.
26. N. Adjimatera, T. Kral, M. Hof, *I. Pharm. Res.* 23 (2006) 1564–1573.
27. T. Kral, K. Widerak, M. Langner, M. Hof, *J. Fluoresc.* 15 (2005) 179-183.
28. A. Blume, *Therm Acta.* 193 (1991) 299-347.
29. T. Parasassi, E.K. Krasnowska, L. Bagatolli, E. Gratton, *J. Fluoresc.* 8 (1998) 365-373.
30. J.R. Lakowicz, *Fluorescence polarization*. In: *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York, London: Plenum Press. (2006) 353-82.
31. M. Langner, S.W. Hui, *Biochim. Biophys. Acta.* 1415 (1999) 323–30.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Tematyka badań realizowanych przed uzyskaniem stopnia doktora

Swoją pracą naukową rozpoczęłam w Katedrze Fizyki i Biofizyki, Akademii Rolniczej we Wrocławiu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) we wrześniu 1995 roku po uzyskaniu tytułu magistra fizyki na Uniwersytecie Wrocławskim. W Katedrze zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta i przez pierwsze lata zajmowałam się badaniem wpływu metaloorganicznych związków cyny i ołowiu na błony erytrocytów (w ramach projektów badawczych realizowanych przez Katedrę). Celem prowadzonych badań było sprawdzenie

toksyczności badanych związków w zależności od ich budowy i wyjaśnienie mechanizmu działania tychże związków na organizm. Obiektem badań były krwinki czerwone, które modyfikowano związkami metaloorganicznymi cyny i ołowiu. Jako miarę toksyczności badanych związków przyjęto takie ich stężenie, które powodowało hemolizę 50% erytrocytów. Pomiary wykonywano metodą spektrofotometryczną dla różnego czasu inkubacji (0-4 h). Sprawdzono również, jak i czy zmieni się aktywność hemolityczna badanych związków w obecności różnych kationów. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że spośród badanych związków bardziej toksyczne są metaloorganiczne związki ołowiu w porównaniu ze związkami cyny, a w szeregu homologicznym związków danego rodzaju toksyczność hemolityczna wzrasta wraz z hydrofobowością związku. Wykazano także, że związki metaloorganiczne zmieniają płynność błony erytrocytów (pomiar metodą fluorymetryczną) a ochrona błon biologicznych przed ich toksycznym działaniem jest możliwa dzięki obecności odpowiednich kationów, co sprzyja ochronie błon biologicznych przed toksycznym działaniem tych związków. Wyniki powyżej opisanych badań zostały zaprezentowane na konferencji (doniesienie konferencyjne nr 1, zał. 3a) i opublikowane w trzech pracach [A1-A3].

Od 1998 roku rozpoczęłam badania wchodzące w zakres mojej pracy doktorskiej, pt. *„Wpływ wybranych metaloorganicznych związków cyny na przejścia fazowe i strukturę błon modelowych”*. Tematyka prowadzonych badań nadal była związana z projektami realizowanymi w Katedrze, takimi jak: *„Rola przeciwjonów w biologicznej aktywności związków amfifilowych”* (kierownik prof. Bożenna Różycka-Roszak) i *„Działanie związków organicznych cyny i ołowiu na błony oraz zapobieganie toksycznym wpływem tych związków”* (kierownik prof. Stanisław Przystalski). Przedmiotem moich zainteresowań pozostały związki metaloorganiczne cyny, a dodatkowo włączone zostały surfaktanty. Zmienił się natomiast obiekt badawczy i metody badawcze. Jako modelu błony użyto liposomów, które były formowane z różnego rodzaju lipidów i dodatkowo wzbogacone cholesterolem. Pomiary zostały wykonane przy użyciu różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) i magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR, ^{31}P NMR). Związki cynoorganiczne użyte do badań można przedstawić za pomocą ogólnej formuły: $\text{R}_n\text{SnX}_{4-n}$, gdzie R- rodnik alkilowy (metyl, etyl, propyl, butyl) lub aryłowy (fenyl), X – Cl, a $n=1, 2, 3, 4$. Celem mojej pracy było zbadanie wpływu wybranych metaloorganicznych związków cyny na przejścia fazowe modelowych błon fosfolipidowych, a w szczególności wyjaśnienie ich lokalizacji w błonie oraz wyjaśnienie wpływu na strukturę błony. Zakres pracy obejmował badania oddziaływań

metaloorganicznych związków cyny z modelowymi błonami w zależności od: struktury związku (rodzaju i liczby przyłączonych do metalu grup organicznych oraz długości łańcuchów alkilowych); różnego rodzaju błon; warunków środowiska (oddziaływanie z błoną bez i w obecności surfaktantów). Badania kalorymetryczne i spektroskopowe pokazały, że metaloorganiczne związki wpływają na właściwości i strukturę modelowych błon lipidowych. Alkilowe związki cyny obniżały temperaturę zarówno podprzejęcia (T_s) i przedprzejęcia (T_p) jak i głównego przejścia fazowego (T_m) DPPC. Efekty tych zmian zależały od struktury związku, tzn. od rodzaju i liczby grup organicznych oraz od długości łańcucha alkilowego. Tetraalkilowe związki cyny (TTAT) wykazywały znacznie mniejszy wpływ na przejścia fazowe aniżeli trialkilowe (TAT), a zmiany płynności błony były tym większe im dłuższy był łańcuch alkilowy. Fenyłowe związki cyny (PhT) powodowały obniżenie albo podwyższenie T_s , T_p oraz T_m zależnie od liczby grup fenyłowych: trifenylochloreocyna (TPhT) znacznie bardziej obniżała temperaturę głównego przejścia fazowego aniżeli tetrafenylocyna (TTPhT), natomiast difenylochloreocyna (DPhT) nieznacznie podwyższała temperaturę głównego przejścia fazowego zarówno czystego DPPC jak i DPPC z cholesterolem. W obecności surfaktantów (halogenków dodecylotrimetyloamoniowych, DTAX; X= Cl, Br, J) efekt działania związków metaloorganicznych zależał od rodzaju i stężenia przeciwjonu. DTACl obniżał temperaturę głównego przejścia fazowego błon modyfikowanych TPhT i DPhT, a bromek i jodek DTABr i DTAI nieznacznie zmieniały T_m błon modyfikowanych TPhT i DPhT. Na podstawie uzyskanych wyników z DSC i NMR stwierdzono, że TTAT słabo wiążą się z błoną i nie powodują zaburzeń w części hydrofobowej, a TAT prawdopodobnie częściowo lokują się w hydrofobowej części błony. TTPhT prawdopodobnie nie wbudowuje się w głąb dwuwarstwy ani nie zaburza jej struktury, DPhT prawdopodobnie lokuje się na powierzchni błony i powoduje powstawanie fazy grzebieniowej („interdigitated gel phase”), a TPhT prawdopodobnie częściowo wbudowuje się w głąb dwuwarstwy i indukuje powstawanie odwróconych faz heksagonalnych. Ponadto, dodatek surfaktantów może zmniejszyć zdolność PhT cyny do indukowania zmian strukturalnych w błonie (powstawanie fazy grzebieniowej i odwróconej fazy heksagonalnej). Wyniki badań zostały dokładnie omówione w mojej rozprawie doktorskiej, przedstawione na kilku konferencjach (doniesienia konferencyjne: 2-8, zał. 3a) i opublikowane w sześciu pracach [A4-A9].

Tematyka badań realizowanych po uzyskaniu stopnia doktora.

Po uzyskaniu stopnia doktora nadal uczestniczyłam w badaniach prowadzonych w Katedrze (w ramach kolejnych grantów), których wspólnym celem było sprawdzenie skutków działania różnych substancji na błony biologiczne. Równolegle, we współpracy z jednostkami z innych uczelni (Wydział Chemii oraz Wydział Nauk Biologicznych - Uniwersytet Wrocławski, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu - Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Instytut Chemii Fizycznej - Czeska Akademia Nauk, Wydział Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu), zajmowałam się nowo otrzymanymi kompleksami metali o właściwościach cytostatycznych.

Pierwszą grupą związków, nad którą rozpoczęłam badania jeszcze przed obroną pracy doktorskiej były surfaktanty z grupy czwartorzędowych soli amoniowych. Związki te są wykorzystywane w różnych dziedzinach gospodarki i przemysłu, przy wytwarzaniu tkanin, jako środki antyelektrostatyczne i zmiękczejące, w budownictwie i ochronie drewna, jako biocydy. Powszechnie są stosowane w gospodarstwie domowym, jako podstawowe składniki środków myjących, piorących i dezynfekujących, a także w rolnictwie, np. składniki herbicydów, w farmacji, jako środki grzybo- glono- i bakteriobójcze. Badanymi przeze mnie związkami były głównie halogenki dodecylotrimetyloamoniowe (DTAX, X= Cl, Br, I) i w znacznie mniejszym stopniu: halogenki benzyldodecyldimetyloamoniowe (DBzAX) oraz krótkołańcuchowe halogenki benzylotrimetyloamoniowe (BzTAX). Oddziaływania tych związków z modelowymi błonami lipidowymi i lipidowo-cholesterolowymi analizowano przy użyciu metod kalorymetrycznych i ^1H NMR. Dodatkowo, aby uwypuklić wpływ przeciwjonów na strukturę wody, surfaktanty dodawano bądź do „fazy wodnej” (po uformowaniu liposomów) bądź do „fazy lipidowej” (liposomy formowano w obecności surfaktantów). Metodą izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (ITC) obserwowano proces wbudowywania się surfaktanta w dwuwarstwę lipidową aż do solubilizacji błony. Metoda ta polega na dodawaniu jednego reagenta do drugiego i pomiarze efektu cieplnego w funkcji dodanego czynnika miareczkującego. Początkowa część krzywej kalorymetrycznej odpowiada procesowi wbudowywania się związku do liposomu, w przybliżeniu w punkcie CMC (krytyczne stężenie micelarne) krzywe wykazują załamanie i rozpoczyna się proces solubilizacji. Metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej sprawdzono wpływ tych związków na termotropowe parametry błony (T_m , T_p , T_s , i ΔH). Wyniki z DSC pokazały, że DBzAX znacznie bardziej niż DTAX zaburzają główne przejście fazowe DPPC. Pomiary kalorymetryczne (DSC, ITC) i spektroskopowe wykazały, że oddziaływania surfaktantów z danej grupy z modelowymi błonami zależą od rodzaju przeciwjonu, sposobu

wprowadzenia związku do liposomów oraz składu lipidowego dwuwarstwy. Rodzaj przeciwjonu miał wpływ na powstawanie domen i głębokość wbudowywania związków do dwuwarstwy (szczególnie grupy benzylovej DBzAX). Związki bromkowe powodowały destabilizację błony przy stężeniach niższych, aniżeli te zawierające chlorki jako przeciwjony. Przyczyną tego jest prawdopodobnie różny wpływ tych jonów na strukturę wody. Wyniki badań zostały zaprezentowane na konferencjach (doniesienia konferencyjne nr 11 i 14; zał. 3a) i opublikowane w dwóch pracach [A10, A11].

Kolejnymi badanymi przeze mnie związkami były nowo otrzymane surfaktanty z grupami cukrowymi. Związki te zsyntetyzowano na Uniwersytecie w Parmie, w zespole prof. Emilii Fiscaro oraz w zespole prof. Kazimiery Wilk na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Surfaktanty cukrowe wykazują korzystne właściwości, są przyjazne dla środowiska, nisko toksyczne i biodegradowalne, co zwiększa ich potencjalne zastosowanie farmaceutyczne, np. w terapii genowej. Prowadzone są liczne badania w celu znalezienia niewirusowych nośników genów (non-viral vectors), ponieważ stosowanie wirusów do transportu DNA wiąże się z dużym ryzykiem wystąpienia niekorzystnych reakcji immunologicznych. Wydaje się, co potwierdziły wstępne badania prowadzone w ramach współpracy z zespołem prof. Emilii Fiscaro z Włoch, że kationowe surfaktanty zawierające grupy cukrowe mogą wykazywać zdolność do przenoszenia DNA. Okazało się, że jeden z surfaktantów z grupy amfifilowych pochodnych N,N dimetylo-1,2-etylenodiaminy jest zdolny do transfekcji DNA. Pierwszy etap procesu transfekcji DNA do komórek związany jest z oddziaływaniem surfaktantów z DNA i tworzeniem przez nie agregatów na powierzchni DNA. Agregaty te mają strukturę podobną do miceli (micelle-like aggregates). Dlatego badania nasze dotyczyły procesu micelizacji, właściwości konformacyjnych cząsteczek surfaktantów w roztworach, a w dalszym etapie oddziaływania surfaktantów z błonami i DNA. Badania prowadzono w ramach dwóch projektów, pierwszego, pt. „*Badania nowo zsyntetyzowanych surfaktantów cukrowych w aspekcie ich zastosowania do przenoszenia DNA do komórek*”, którego byłam kierownikiem (finansowany ze środków własnych uczelni) i grantu MNiSW: „*Kationowe surfaktanty cukrowe otrzymywane w oparciu o odnawialną bazę surowcową*” (kierownik prof. Różycka-Roszak), gdzie byłam jednym z wykonawców. W ramach pierwszego grantu metodą ITC przeprowadziłam badania agregacji N-dodecylo-N,N-bis[3-D-glukonyloamido)propylo]aminy (C₁₂DGA) oraz N-dodecylo-N,N-bis[3-D-laktobionyloamido)propylo]aminy (C₁₂DLA) w roztworze wodnym wyznaczyłam krytyczne stężenie micelarne (CMC) dla tych związków. Metodą DSC zbadałam oddziaływania

C_{12} DGA i C_{12} DLA z dwuwarstwami lipidowymi formowanymi z fosfatydylocholiny (DPPC, DMPC), bez i z dodatkiem cholesterolu. Okazało się, że zmierzone CMC dla C_{12} DLA i C_{12} DGA są bardzo zbliżone, prawdopodobnie obecność dwóch pierścieni w podwójnej głowie C_{12} DLA utrudnia nieco proces agregacji micelarnej w porównaniu z C_{12} DGA. Związek C_{12} DGA wykazywał znacznie większy wpływ upłynniający na dwuwarstwę fosfatydylocholinową niż C_{12} DLA, co jeszcze bardziej było widoczne dla układu DPPC/cholesterol. W ramach drugiego grantu, metodą fluorymetryczną, przy użyciu trzech znaczników fluorescencyjnych (Laurdan, Prodan i DPH), zbadalam wpływ bromków 2-(alkilodimetyloamonio)etyloglukonamidów $RMe_2N^+CH_2CH_2NHC(=O)(CHOH)_4CH_2OH$ ($R = C_nH_{2n+1}$, $n = 10, 12, 14$ albo 16), w skrócie oznaczane C_n GAB, na płynność i uporządkowanie dwuwarstwy lipidowej. Pomiarzy były prowadzone w różnych temperaturach, poniżej i powyżej głównego przejścia fazowego DPPC. Badane surfaktanty nieznacznie zmieniały płynność obszaru hydrofobowego dwuwarstwy, efekt zależał od długości łańcucha alkilowego $n=10<12<14<16$. Okazało się również, że C_n GAB bardzo efektywnie kondensują DNA, co sprawia, że są one obiecującymi kandydatami do potencjalnego wykorzystania ich w terapii genowej. Wyniki badań dotyczące surfaktantów cukrowych zaprezentowano na czterech konferencjach (doniesienia konferencyjne: 18, 20, 22, 27; zał. 3a) i opisano w dwóch publikacjach [A12, A13].

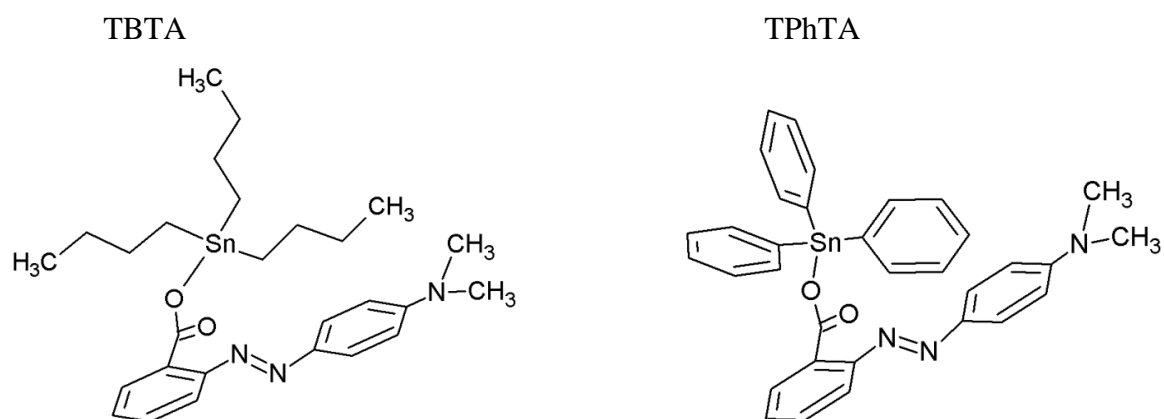
W latach 2004-2007 uczestniczyłam w projekcie MNiSW pt: „*Ochrona układów biologicznych przed stresem oksydacyjnym przez nowe substancje z funkcją antyoksydantu*” (kierownik prof. Halina Kleszczyńska). Przedmiotem badań były N-tlenki trzeciorzędowych amin, syntezowane na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej, jako potencjalnie aktywne przeciwutleniacze białek i tłuszczów, które można byłoby wykorzystać, np. w przemyśle kosmetycznym, żywieniowym. W celu przybliżenia molekularnego mechanizmu oddziaływania N-tlenków z błoną biologiczną sprawdziłam wpływ wybranych związków na przejścia fazowe DPPC. Rezultaty badań były prezentowane na dwóch międzynarodowych konferencjach (doniesienia konferencyjne nr 13 i 15; zał. 3a) oraz przedstawione w trzech publikacjach [A14-A16].

Bardzo dużą grupą badanych substancji o właściwościach antyoksydacyjnych były związki i ekstrakty polifenolowe uzyskane z różnych części roślin, takich jak owoce, liście czy też korzenie. Ekstrakty wyekstrahowano oraz przeprowadzono analizę ilościową i jakościową frakcji związków polifenolowych w nich zawartych w Katedrze Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, w zespole prof. Jana

Oszmiańskiego. Badania prowadzone były w ramach trzech grantów MNiSW, w latach 2008-2014: „*Ochronny wpływ ekstraktów roślinnych na układy biologiczne narażone na działanie promieniowania*” i „*Ochrona organizmów żywych przed wolnymi rodnikami przez naturalne substancje polifenolowe*”, pod kierownictwem prof. Haliny Kleszczyńskiej oraz „*Oddziaływanie polifenoli roślinnych z modelowymi i naturalnymi błonami biologicznymi w aspekcie nanotechnologii*”, kierownik dr hab. Dorota Bonarska-Kujawa. Celem powyższych projektów było sprawdzenie właściwości ochronnych, m.in. przeciwutleniających, nowo otrzymanych ekstraktów roślinnych oraz wyjaśnienie molekularnego oddziaływania polifenoli z błoną biologiczną na podstawie zmian jej właściwości. W ramach mojego zadania badawczego sprawdziłam wpływ ekstraktów i wybranych pojedynczych związków polifenolowych na lipidowe modele błon. Tym modelem były liposomy wielowarstwowe i jednowarstwowe utworzone z jednego rodzaju syntetycznego lipidu (DPPC, DMPC) z dodatkiem lub bez cholesterolu albo z mieszaniny lipidów (lecytyna jajeczna). Przy użyciu metody kalorymetrycznej (DSC) i fluorymetrycznej analizowałam wpływ poszczególnych substancji na płynność i przejścia fazowe modelowych błon. Wykonałam pomiary dla ekstraktów z owoców truskawki, aronii, borówki niskiej i wysokiej, jabłoni, z owoców wiśni w postaci nanocząstek inkapsulowanych z dodatkiem maltodekstryny lub inuliny, a także dla ekstraktów z owoców i liści czarnej porzeczki, jagody leśnej i jagody kamiczackiej, z łusek i łodygi gryki oraz z korzenia tarczycy bajkalskiej. Sprawdziłam również wpływ kwasu chlorogenowego (główny składnik ekstraktu z jabłek), pelargonidyno-3-O-glukozydu (dominujący składnik ekstraktu z owoców truskawki) i cyjanidyno-3-O-galaktozydu (składnik ekstraktu z owoców aronii) na przejścia fazowe DMPC, DPPC i DPPC/cholesterol. Uzyskane wyniki pokazały, że badane ekstrakty i związki nieznacznie zmieniały parametry błony, takie jak temperatura przedprzejścia (T_p), temperatura (T_m) i entalpia (ΔH) oraz kooperatywność ($\Delta T_{1/2}$) głównego przejścia fazowego. Analiza tych zmian w powiązaniu z rezultatami z badań fluorymetrycznych pozwala sądzić, że polifenole zawarte w ekstraktach nie zmieniają znacząco płynności błony i nie wnikają do jej hydrofobowej części. Zmieniają natomiast upakowanie główek polarnych lipidów, czyli są obecne w hydrofilowym obszarze dwuwarstwy lipidowej zarówno w fazie żelu jak i w fazie ciekłokrystalicznej. Interesująca jest korelacja pomiędzy właściwościami przeciwutleniającymi danej substancji, a jej prawdopodobną lokalizacją w błonie. Otóż, większe zmiany w hydrofilowej części błony powodowały te związki i ekstrakty, które są dobrymi antyoksydantami (ich aktywność była porównywalna albo większa w stosunku do Troloxu). Wyniki pomiarów zostały opisane w 9

publikacjach [A17-A25] i zaprezentowane na 24 konferencjach (doniesienia konferencyjne: 17, 19, 21, 23-26, 28-35, 37, 39-41, 43-47; zał. 3a). Część badań dotycząca ekstraktów z gryki oraz z tarczycy bajkalskiej została zawarta w pracy doktorskiej dr Aleksandry Włoch, której byłam promotorem pomocniczym. Obrona pracy doktorskiej pt: "Wpływ ekstraktów z wybranych gatunków roślin na właściwości modelowych błon biologicznych" odbyła się 24.11.2016 na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego i została zatwierdzona przez Radę Wydziału 22.12.2016.

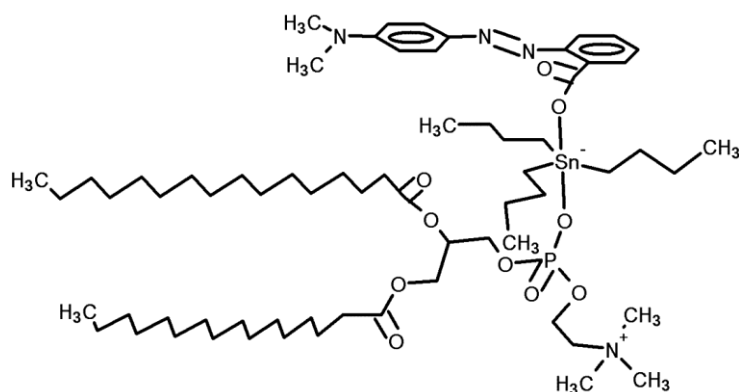
Nie wszystkie moje badania dotyczące cytostatycznych kompleksów metali zostały włączone do rozprawy habilitacyjnej. Przykładem takich związków są {2-[4-(dimetyloamino)fenyloazo]benzoesano}tributylocyna(IV) [Sn(C₄H₉-n)₃{OOC-2--C₆H₄N=NC₆H₄N(CH₃)₂-4}] – TBTA oraz {2-[4-(dimetyloamino)fenyloazo]benzoesano}trifenyllocyna(IV), [Sn(C₆H₅)₃{OOC-2--C₆H₄N=NC₆H₄N(CH₃)₂-4}] – TPhTA, przedstawione na rysunku nr 13.



Rys.13 Struktury cynoorganicznych związków: TBTA i TPhTA

Zbadałam wpływ tych kompleksów nie tylko na lipidowe modele błon (DPPC, DMPC), ale na erythrocyty i błony erythrocytów. Pomiarzy wykonano przy zastosowaniu kilku metod: fluorymetrycznej, spektroskopii w podczerwieni, ¹H i ³¹P NMR, mikroskopii optycznej i elektronowej oraz DSC. Na podstawie analizy kształtów krwinek modyfikowanych cynoorganicznymi związkami stwierdzono, że kompleksy te lokują się głównie w zewnętrznej monowarstwie dwuwarstwy lipidowej błony erythrocytów gdyż erythrocyty zmieniają kształt z dyskocytarnego na echinocytarny. Badane kompleksy cyny działają destrukcyjnie na błonę erythrocytów, powodują hemolizę czerwonych krwinek dopiero w stężeniach około dziesięciokrotnie wyższych od tych, które powodowały śmierć 50% komórek nowotworowych (A549 i HCV29T). W stosunku do krwinek czerwonych bardziej toksyczny

okazał się TBTA w porównaniu z TPhTA [artykuł w przygotowaniu]. Spektroskopia w podczerwieni wykazała, że związki te lokalizują się głównie w polarnej części dwuwarstwy lipidowej. Główne zmiany są widoczne dla drgań rozciągających w grupie C-O-P-O-C. Praktycznie nie ma zmian w obszarze niepolarnym, ponieważ nie obserwujemy zmian ani częstotliwości drgań, ani intensywności sygnału grup CH₂ łańcuchów alkilowych lipidu. Podobne wnioski wynikają z badań przy zastosowaniu metody ³¹P i ¹H NMR. Prawdopodobne jest, że powstaje wiązanie pomiędzy atomem tlenu grupy fosforanowej fosfolipidu i atomem cyny TBTA, co schematycznie przedstawia rysunek nr 14.

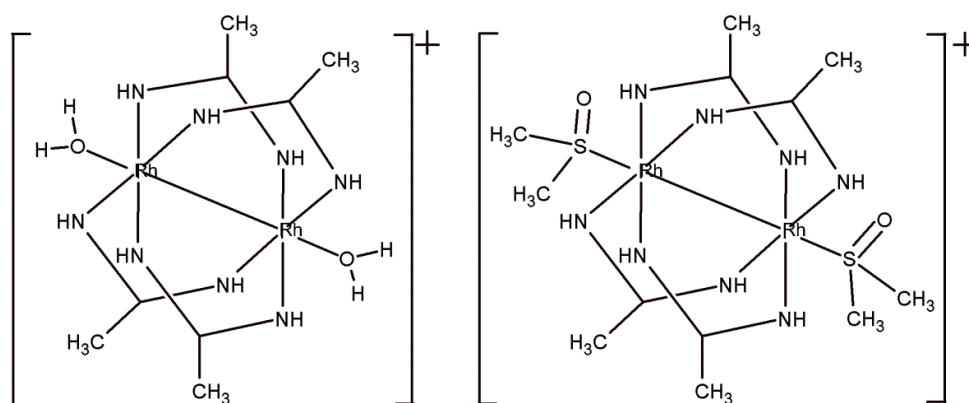


Rys. 14 Schematyczne przedstawienie interakcji TPhTA-DPPC.

Ze względu na bardzo szerokie spektrum działania przeciwgrzybicznego i dobre właściwości antyrakowe, warto wspomnieć o metaloorganicznych związkach cyny, takich jak: bromek (tributylostanokso-4-oksobutylo)(trifenilo)fosfonowy $[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3\{\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3\}]\text{Br}$ i chlorek (trifenilo)stanokso-4-oksobutylo)trimetyloamoniowy $[\text{Sn}(\text{C}_6\text{H}_5)_3\{\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\}]\text{Cl}$. Badania mikologiczne przeprowadzone przez zespół prof. Stanisława Ułaszewskiego (wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski) w odniesieniu do wybranych szczepów grzybów pleśniowych (*U. chartarum*, *C. cladosporioides*, *T. viridae*, *P. notatum*, *A. alternata*, *A. flavus*, *A. niger*, *R. nigricans*, *C. globosum*), licznej grupy grzybów drożdżopodobnych (*C. neoformans*, *C. famata*, *T. cutaneum*, *G. candidum*, *R. rubra*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusi*) i dermatofitów (*S. brevicaulis*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum*, *A. fumigatus*, *M. plumbeus*) wykazały grzybobójcze i grzybobójcze działanie badanych kompleksów cyny. Ich aktywność przeciwgrzybiczna była niższa (dla bromku) lub porównywalna (dla chlorku) od aktywności tributyl(2-sulfobenzoatesano)cyny(IV) o wzorze $[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3\{\text{O}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{COOH-2}\}]$ (TBTsbz – opisany w pierwszej części autoreferatu). Związek TBTsbz był znacznie bardziej aktywny niż

$[\text{Sn}(\text{C}_4\text{H}_9)_3\{\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3\}]\text{Br}$ i $[\text{Sn}(\text{C}_6\text{H}_5)_3\{\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\}]\text{Cl}$ przeciwko szczepom grzybów drożdżopodobnych, a także miał wyższą aktywność przeciwgrzybiczą niż bromek w przypadku grzybów nitkowatych [A26, A27]. Widzimy, że biologiczna aktywność cynoorganicznych związków zależy głównie od dodatnio naładowanej grupy $[\text{R}_3\text{Sn}]^+$, a także od rodzaju liganda X. Stąd większą aktywność grzybobójczą TBTsbz można wyjaśnić obecnością liganda $\text{X}=\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$. Przykładem związków, które nie wykazywały znaczącej aktywności biologicznej były bromek tris(2-cyanoetylo)cyny(IV) - $[\text{Sn}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN})_3\text{Br}]$ i jodek tris(2-cyanoetylo)cyny(IV) - $[\text{Sn}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN})_3\text{I}]$ opisane w pracy [A28]. Interesujące są za to właściwości nowo otrzymanych kompleksów rodu(III) i irydu(III) z tris(2-karboksyetylo)fosfiną $\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3$. Związki te wykazują aktywność przeciwnowotworową względem wielu linii nowotworowych, np.: Sk-mel (czerniak złośliwy), Colo-829 (czerniak złośliwy), C-32 (amelanotyczny czerniak), MCF7 (potrójnie pozytywny rak piersi), MDA-MB-231 (potrójnie negatywny rak piersi). Efektywność związków Ir względem MDA-MB-231 jest znacznie większa ($\text{IC}_{50}=7.8\pm 1 \mu\text{M}$) niż aktywność *cis*-diaminadichloroplatyny(II) ($\text{IC}_{50}=61\pm 7 \mu\text{M}$), a kompleksu rodu porównywalna ($\text{IC}_{50}=67\pm 7 \mu\text{M}$) [A29].

Zbadane zostały struktura i właściwości rzadkich kompleksów dwurdzeniowych Rh(II)Rh(III) z bezpośrednim wiązaniem Rh-Rh zawierających rdzeń Rh_2^{5+} z mostkowymi ligandami atanoimidoamidanowymi: $[\text{Rh}_2(\mu\text{-HN}(\text{HN}=\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2)\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}]$ i $[\text{Rh}_2(\mu\text{-HN}(\text{HN}=\text{CCH}_3)_4(\text{DMSO})_2)\text{Cl}]$ [A30].



Rys. 15. Struktura kompleksów dwurdzeniowych Rh(II)Rh(III).

Związki te mogą być interesujące, ponieważ mają strukturę (rys. 15) analogiczną jak kompleksy karboksylanowe Rh(II) z rdzeniem $[\text{Rh}_2(\mu\text{-OOCR})_4\text{L}_2]$ (R = alkil, aryl, L = ligand skoordynowany przez atom O, N, S, P) wykazujące znaczną aktywność

przeciwnowotworową. Rezultaty badań dotyczące wspomnianych powyżej związków metali były prezentowane na konferencjach (doniesienia konferencyjne: 9, 12, 44; zał. 3a) albo opisane w publikacjach [A26-A30].

Publikacje niewchodzące w skład doniesienia naukowego:

- A1. Kleszczyńska H., Hładyszowski J., **Pruchnik H.** and Przystalski S. (1997) Erythrocyte hemolysis by organic tin and lead compounds. *Zeitschrift für Naturforschung* 52c, 65-69
- A2. Kleszczyńska H., **Pruchnik H.** and Przystalski S., (1998) Electrostatic inhibition of hemolysis induced by organotin compounds. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 44 (2) 305-313.
- A3. Langner M., Gabrielska J., Kleszczyńska H. and **Pruchnik H.** (1998) Effect of phenyltin compounds on lipid bilayer organization. *Applied Organometallic Chemistry*, 12 (2), 99-107.
- A4. Różycka-Roszak B., **Pruchnik H.** and Kamiński E. (2000) The effect of some phenyltin compounds on the thermotropic phase behaviour and the structure of model membranes. *Applied Organometallic Chemistry*, 14, 465-472.
- A5. Różycka-Roszak B., **Pruchnik H.** (2000) Effect of Counterions on the Influence of Dodecyltrimethylammonium Halides on Thermotropic Phase Behaviour of Phosphatidylcholine Bilayers. *Zeitschrift für Naturforschung* 52c, 240-244.
- A6. Różycka-Roszak B., **Pruchnik H.** (2000) Influence of dodecyltrimethylammonium halides on thermotropic phase behaviour of phosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Zeitschrift für Naturforschung* 52c, 753-757.
- A7. Różycka-Roszak B., **Pruchnik H.** (2001) The effect of phenyltin chlorides on the phase polymorphism of DPPC. *Applied Organometallic Chemistry*, 15, 233-235.
- A8. Różycka-Roszak B., **Pruchnik H.**, Mucha A. (2000) Oddziaływanie halogenków dodecylotrimetyloamoniowych z liposomami lecytynowymi i lecytynowo-cholesterolowymi, *Prace Naukowe Instytutu Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych Politechniki Wrocławskiej*, nr 48, Seria : Konferencje, Surfaktanty i układy zdyspergowane w teorii i praktyce, nr 22, 233-236.
- A9. Różycka-Roszak B., **Pruchnik H.** (2001) Oddziaływanie czwartorzędowych soli amoniowych z błonami modelowymi, *Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce*, wyd. Instytut Technologii Drewna, 179-187, Poznań 2001.
- A10. Różycka-Roszak B., **Pruchnik H.** (2001) Influence of dodecyltrimethylammonium halides on interaction of phenyltin compounds with model membranes. *Zeitschrift für Naturforschung* 56 c, 623-628
- A11. Różycka-Roszak B., Przyczyna A., Misiak P., **Pruchnik H.** (2006) The influence of cholesterol on the interaction between N-Dodecyl-N,N-dimethyl-N-benzylammonium halides and phosphatidylcholine bilayers. *Zeitschrift für Naturforschung* 61c (3-4), 302-308.
- A12. Fisicaro E. , Compari C. , Biemmi M., Duce E., Peroni M., Donofrio G., Sansone F., Różycka-Roszak B., **Pruchnik H.**, Barbero N., Viscardi G. and Quagliotto P. (2008) Thermodynamics and Biological Properties of the Aqueous Solutions of New Glucocationic Surfactants. *Journal of Physical Chemistry B* 112 (31), 9360-9370
- A13. Misiak P., Wilk K.A., Kral T., Woźniak E., **Pruchnik H.**, Frackowiak R., Hof M., Różycka-Roszak B. (2013) New gluconamide-type cationic surfactants: Interactions with DNA and lipid membranes. *Biophysical Chemistry* 180–181, 44-54.

- A14. Kleszczyńska H., Bonarska D., **Pruchnik H.** (2005) Krzysztof Bielecki, Andrzej Piasecki, Jacek Łuczyński, and Janusz Sarapuk, Antioxidative Activity of New N-Oxides of Tertiary Amines: Membrane Model and Chromogen Studies. *Zeitschrift für Naturforschung* 60c, 567-571.
- A15. Kleszczyńska H., Bielecki K., Sarapuk J., Bonarska-Kujawa D., **Pruchnik H.**, Trela Z. and Łuczyński J. (2006) Biological activity of new N-oxides of tertiary amines. *Zeitschrift für Naturforschung* 61c, 715-720.
- A16. Bonarska-Kujawa D., Kleszczyńska H., **Pruchnik H.**, Łuczyński J. and Sarapuk J. (2007) Influence of structural features of some novel N-oxides on their biological activities. *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice* 407-410.
- A17. Bonarska-Kujawa D., **Pruchnik H.**, Dudra A., Sarapuk J., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2008) Oddziaływanie polifenolowych ekstraktów owocowych z błonami naturalnymi i lipidowymi. *Błony Biologiczne. Monografia pod red. J. Gabrielskiej i P. Misiaka, Oficyna Wydawnicza PWr, ISBN 978-83-926758-0-8, 331-336.*
- A18. Bonarska-Kujawa D., **Pruchnik H.** (2011) Oszmiański J., Sarapuk J., Kleszczyńska H., Changes Caused by Fruit Extracts in the Lipid Phase of Biological and Model Membranes. *Food Biophysics* 6 (1) , 58-67.
- A19. Bonarska-Kujawa D., **Pruchnik H.** and Kleszczyńska H. (2012) Interaction of selected anthocyanins with erythrocytes and liposome membranes. *Cellular and Molecular Biology Letters* 17, 289-308.
- A20. Bonarska-Kujawa D., **Pruchnik H.** Oszmiański J., Bąkowska-Barczak A. (2013) The interaction effects of cherry extracts microencapsulated with maltodextrin or inulin with biological membrane. *Monografia: "Ziołolecznictwo, Biokosmetyki, Żywność funkcjonalna"*. red. I. Wawer, T. Trziszka, ISBN:978-83-64457-00-5, 97-114.
- A21. **Pruchnik H.**, Bonarska-Kujawa D., Kleszczyńska H. (2014) Effect of chlorogenic acid on the phase transition in phospholipid and phospholipid/cholesterol membranes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 118 (2), 943-950
- A22. Cyboran S., Bonarska-Kujawa D., **Pruchnik H.**, Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2014) Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. *Food Research International* 65, 47-58.
- A23. Bonarska-Kujawa D., **Pruchnik H.**, Cyboran S., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2014) Biophysical Mechanism of the Protective Effect of Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevest.) Polyphenols Extracts Against Lipid Peroxidation of Erythrocyte and Lipid Membranes. *Journal of Membrane Biology* 247 (7), 611-25.
- A24. **Pruchnik H.**, Włoch A., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2015) Interaction of skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi) and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) extracts with lipid bilayers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 121 (1), 475-484.
- A25. Włoch A., Strugała P., **Pruchnik H.**, Żyłka R. Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2016) Physical Effects of Buckwheat Extract on Biological Membrane In Vitro and Its Protective Properties. *Journal of Membrane Biology*, 249 (1-2), 155-170.
- A26. Dyląg M., Bień M., **Pruchnik H.**, Pruchnik F., Ułaszewski S. (2009) Ocena mikologiczna wybranych pomieszczeń użytkowych z określeniem wrażliwości na związki cynoorganiczne wyizolowanych szczepów grzybów. *Notes Konserwatorski* 13, 89-112.

- A27. Dyląg M., **Pruchnik H.**, Pruchnik F., Majkowska-Skrobek G., Ułaszewski S. (2010) Antifungal activity of the organotin compounds with functionalized carboxylates evaluated by the microdilution bioassay *in vitro*. *Medical Mycology* 48(2), 373-383.
- A28. Pruchnik F.P., **Pruchnik H.**, Ostropolska Ł., Ciunik L. Z. (2008) Tris(2-cyanoethyl)tin(IV) bromide and tris(2-cyanoethyl)tin(IV) iodide, their structure, properties and reactions with adenosine, AMP and ATP. *Polyhedron* 27, 1093-1101.
- A29. **Pruchnik H.**, Latocha M., Zielińska A., Pruchnik F.P. (2016) Rhodium(III) and iridium(III) pentamethylcyclopentadienyl complexes with tris(2-carboxyethyl)phosphine, properties and cytostatic activity. *Journal of Organometallic Chemistry* 822, 74-79.
- A30. Pruchnik F. P., **Pruchnik H.**, A. Kochel A. (2009), Structure and properties of tetra- μ -ethanimidamido-*N:N*-dirhodium(1+) complexes, *Polyhedron* 28, 769-774.

6. Dalsze plany badawcze

W najbliższej przyszłości zamierzam nadal prowadzić badania nad nowo zsyntetyzowanymi kompleksami metali. W ramach współpracy z innymi ośrodkami sprawdzimy, na poziomie molekularnym, oddziaływania wybranych związków metali z białkami, z DNA, z lipidowymi modelami błon i z naturalnymi błonami lipidowo-białkowymi oraz z komórkami. Tego typu pomiary pozwolą zrozumieć sposób oddziaływania wybranych kompleksów metali nie tylko z błonami, ale przybliżony zostanie mechanizm ich cytotoksyczności. Planowane są również badania, w celu zwiększenia efektywności działania badanych związków, stworzenia odpowiednich formułacji liposomowych - związek/lipid i przeprowadzenie pomiarów *in vitro* z takimi układami w odniesieniu do wybranych komórek.

7. Podsumowanie dorobku naukowego

Na mój dotychczasowy dorobek naukowy składa się 41 publikacji, z czego 35 ukazało się w czasopiśmie z listy JCR. Spośród tych prac, dziewięć wchodzi w skład osiągnięcia naukowego i stanowi rozprawę habilitacyjną (**IF=22,076; 260 pkt. MNiSW**). Sumaryczny Impact Factor wszystkich publikacji wynosi **63,631**, a liczba punktów MNiSW= **851**. Według bazy Web of Science z dnia 23.12.2016, liczba cytowań publikacji wynosi **181** (z autocytoowaniami **231**), a indeks Hirscha, **H=10**. Oprócz publikacji, w moim dorobku znajduje się 51 komunikatów konferencyjnych, 16 zaprezentowanych na konferencjach o zasięgu krajowych i 35 na konferencjach międzynarodowych. Cały dorobek naukowy szczegółowo został opisany w załączniku nr 3, a jego podsumowanie przedstawia poniższa tabela.

Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora				
	Liczba publikacji	Liczba komunikatów	IF ^a	Punkty MNiSW ^b
Publikacje w czasopismach z IF	8		7,792	165
Publikacje bez IF	2		-	3
Komunikaty konferencyjne		6	-	-
Komunikaty konferencyjne opublikowane w czasopismach z IF		1	2,188*	20*
Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora				
Publikacje w czasopismach z IF	27		55,839	670
Publikacje bez IF	4		-	13
Komunikaty konferencyjne		29	-	-
Komunikaty konferencyjne opublikowane w czasopismach z IF		15	22,883*	265*
Cały dorobek naukowy	41	51	63,631 (88,702)**	851 (1136)**

^aImpact Factor (IF) podany jest dla roku opublikowania artykułu

^bLiczba punktów za publikacje podana została zgodnie z wykazem czasopism Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego z grudnia 2016 r.

* - IF i punkty MNiSW czasopism; ** publikacje + komunikaty konferencyjne

Wrocław, 13.02.2017