



RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR ANITY GRZEŚKIEWICZ

Relacja między strukturą a aktywnością biologiczną kompleksów metali z tioamidami, potencjalnych leków terapii antynowotworowej

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Anity Grześkiewicz wykonana została pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Kubickiego w Zakładzie Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Obiektami badań doktorantki były wykazujące aktywność cytotoksyczną kompleksy cyny(IV), srebra(I) oraz antymonu(III) z ligandami S-donorowymi z grupy tioamidów. Ambitnym celem pracy było znalezienie czynników strukturalnych wpływających na aktywność cytotoksyczną tych połączeń. Ponieważ badanie relacji struktura-aktywność wymaga dostępu do informacji o dużej liczbie związków chemicznych, doktorantka postanowiła wykonać badania strukturalne metodami dyfrakcji promieni rentgenowskich dla 15 kompleksów metali. Z wyjątkiem dwóch kompleksów cyny(IV), badane związki otrzymane zostały w ramach współpracy z Uniwersytetem w Janinie w Grecji, natomiast badania aktywności cytotoksycznej przeprowadzone były zarówno w Janinie jak i na Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu. W oparciu o dane eksperymentalne uzyskane w ramach pracy doktorskiej, dane literaturowe oraz o informację nieopublikowaną, udostępnioną jej przez promotora rozprawy, mgr Grześkiewicz przeprowadziła analizę, której celem było wskazanie czynników strukturalnych wpływających na aktywność kompleksów Sn^{IV} , Ag^{I} i Sb^{III} z tioamidami. Nieco odrębnym, aczkolwiek równie ciekawym, ważnym i metodycznie trudnym elementem rozprawy było wyznaczenie eksperymentalnego rozkładu gęstości elektronowej w oparciu o wysokorozdzielcze dane dyfrakcyjne dla czterech ligandów tioamidowych, tryfenylofosfiny oraz dwóch kompleksów srebra, wykazujących dużą aktywność cytotoksyczną. Te zaawansowane badania przeprowadzone zostały w celu poznania precyzyjnych parametrów geometrycznych oraz elektronowych badanych cząsteczek. Warto zaznaczyć, że doktorantka przeprowadziła badania strukturalne na kryształach zawierających siarkę, która w eksperymentalnych badaniach rozkładu gęstości elektronowej jest źródłem wielu problemów, oraz, po raz pierwszy, wyznaczyła eksperymentalnie rozkład gęstości elektronowej dla kompleksu srebra(I). Widać ogrom pracy włożony w te badania - mogłyby one stanowić podstawę więcej niż jednej pracy doktorskiej.

Podjęta przez mgr Grześkiewicz tematyka badawcza, zarówno dotycząca relacji między strukturą i aktywnością cytotoksyczną kompleksów metali, jak i ta związana z wyznaczaniem eksperymentalnego rozkładu gęstości elektronowej w ligandach S-donorowych oraz kompleksach metali, należy do bardzo aktualnych i ważnych dla nauki, dlatego jej podjęcie uważam za uzasadnione.

Rozprawa doktorska mgr Anity Grześkiewicz napisana została w języku polskim i liczy 206 stron, w tym około 80 rysunków, 38 wykresów i 52 tabele. Do pracy dołączona została płyta zawierająca obszerne materiały dodatkowe, w tym wersję rozprawy w postaci pliku pdf oraz pliki cif dla wyznaczonych struktur. Rozprawa nie ma typowego układu, gdyż zawiera cztery odrębne rozdziały, każdy z oddzielnym wstępem, częścią doświadczalną lub metodyczną, omówieniem wyników i dyskusją, podsumowaniem i bibliografią. Rozdziały te poprzedzone są krótko sformułowanym celem pracy (1/3 strony) i zakończone równie krótkim i lakonicznym podsumowaniem. Rozprawa zawiera również wykaz stosowanych skrótów, rycin, wykresów i tabel oraz informację o dorobku publikacyjnym mgr Anity Grześkiewicz. Na luźnych kartkach dołączone zostały do

rozprawy wzory strukturalne kompleksów metali użytych w analizie relacji struktura-aktywność. Zdecydowanie brakuje w tej rozprawie ogólnego wprowadzenia, które połączyłoby wszystkie jej elementy w jedną całość. Dałoby to ponadto szansę doktorantce na zdefiniowanie szeregu pojęć, którymi się w rozprawie posługuje, a które nie zawsze stosowane są jednoznacznie.

Część pierwsza pracy, zatytułowana wg mnie nietrafnie 'Standardowa rentgenowska analiza strukturalna', gdyż nie o tym ona traktuje, składa się z trzech rozdziałów poświęconych kolejno badaniom kompleksów cyny(IV), srebra(I) i antymonu(III) z tioamidami. Każdy rozdział zawiera odrębny wstęp z podstawową informacją o budowie i aktywności biologicznej kompleksów danego metalu, część doświadczalną z wynikami rentgenowskiej analizy strukturalnej, informację o badaniach biologicznych, analizę zależności struktura-aktywność cytotoksyczna, podsumowanie i bibliografię. Opis budowy kompleksów metali uzupełniany jest wynikami uzyskanymi z analizy danych strukturalnych zdeponowanych w bazie CSD. Baza CSD jest niewyczerpanym źródłem informacji strukturalnej o związkach chemicznych i za jej szerokie stosowanie w rozprawie należą się doktorantce słowa uznania. Jednakże przedstawianym statystykom często nie towarzyszy informacja o parametrach zastosowanych przy przeszukiwaniu bazy CSD a jest to dość istotne, szczególnie w przypadku kompleksów cyny, srebra czy antymonu, dla których, jak doktorantka sama zauważa, granica między wiązaniem metal – ligand a kontaktem metal – ligand jest nieostra.

W tych trzech rozdziałach mgr Grześkiewicz zaprezentowała bardziej lub mniej szczegółowo wyniki rentgenowskiej analizy strukturalnej uzyskane w oparciu o powszechnie stosowany model niezależnych atomów (IAM) dla 15 kompleksów metali: 2 kompleksów cyny(IV), 8 kompleksów srebra(I) i 5 kompleksów antymonu(III), przy czym jeden z kompleksów antymonu wystąpił w postaci dwóch form polimorficznych. Analizy te przeprowadzone są poprawnie, choć w przypadku struktur kompleksów srebra 7 i 9 zabrakło mi wyjaśnienia dla bardzo wysokich wartości wskaźników rozbieżności ($R=0,139$).

Warto dodać, że pani mgr Grześkiewicz jest w swojej pracy bardzo dociekliwa, nie porzuca napotkanych problemów lecz stara się je rozwiązać. Na przykład, gdy zaobserwowała ciekawą przemianę kryształu w trakcie pomiaru temperatury topnienia dla jednego z kompleksów cyny, dąży sprawę dalej wykorzystując dyfraktometrię proszkową i metody termiczne, aż do wyjaśnienia natury obserwowanego procesu. Gdy w kryształach jednego z kompleksów cyny(IV) pojawia się nieuporządkowany rozpuszczalnik, dla którego w analizie strukturalnej nie jest w stanie uzyskać zadowalającego modelu, przeprowadza dodatkowe badania, z których wynika, że w kryształach jest domieszka acetonu. Wbrew twierdzeniu doktorantki, aceton nie jest wymieniony wśród rozpuszczalników użytych w trakcie syntezy tego kompleksu. Gdy mimo wielu podjętych prób nie jest w stanie otrzymać kompleksu cyny(IV) z 6-amino-2-tiouracylem, chociaż podobne ligandy jak 6-amino-2-tiocytozyna czy kwas tiobarbiturowy takie kompleksy tworzą, podejmuje badania metodami wysokorozdzielczej rentgenowskiej analizy strukturalnej w poszukiwaniu przyczyny braku reaktywności.

Na końcu każdego rozdziału dotyczącego kompleksów odpowiedniego metalu podane i omówione są wyniki badań aktywności cytotoksycznej. W przypadku kompleksów cyny bardziej szczegółowo analizowana jest aktywność kompleksów Sn^{IV} wobec komórek mięsaka gładkokomórkowego (LMS), nowotworu bardzo odpornego na chemioterapię. Obydwa otrzymane związki wykazały nie tylko dużą aktywność cytotoksyczną ale również sporą selektywność wobec komórek LMS, co jest rzadko spotykaną cechą związków cynoorganicznych. W przypadku kompleksów srebra z tioamidami analizowana była głównie aktywność cytotoksyczna wobec komórek raka piersi (MCF-7), ale pomiary aktywności wykonane zostały również dla komórek raka szyjki macicy (HeLa) i na komórkach nietransformowanych ludzkich fibroblastów izolowanych z płuc (MRC-5). W

tym przypadku uzyskane wyniki są również bardzo obiecujące, choć wielka szkoda, że podana informacja o aktywności kompleksów nie zawiera informacji o błędzie pomiaru. W przypadku kompleksów antymonu z tioamidami doktorantka analizuje głównie aktywność cytotoksyczną wobec komórek raka szyjki macicy (HeLa), gdyż liczba dostępnych danych o tej aktywności była największa i tylko w tym przypadku różnice w aktywności poszczególnych związków były większe od błędu pomiarowego. Niezwykle obiecująco wyglądał w tabeli 3.4 wynik dotyczący aktywności dwóch różnych form polimorficznych kompleksu 11 wskazujący na kilkunastokrotnie większą aktywność polimorfu 11a niż 11b. Zamieszczone dane okazały się jednak niezgodne z wcześniej opublikowanymi wartościami IC_{50} dla tych polimorfów. Zależności struktura-aktywność wskazane przez doktorantkę dla trzech grup analizowanych związków mają zasadniczo charakter jakościowy, gdyż aktywność korelowana jest z typem halogenu, rodzajem liganda tioamidowego lub też charakterem podstawnika w ligandzie tioamidowym. Nie udało się natomiast wyprowadzić żadnych korelacji ilościowych bazujących na wartościach parametrów strukturalnych.

Druga część pracy zatytułowana 'Wysokorozdzielcza rentgenowska analiza strukturalna' stanowi $\frac{3}{4}$ jej objętości. Zawiera ona wprowadzenie, w którym doktorantka porównuje stosowane w strukturalnych badaniach dyfrakcyjnych model niezależnych atomów oraz model multipolowy Hansena-Copensa. Następnie omawiana jest analiza różnicowych i deformacyjnych map gęstości elektronowej oraz analiza topologiczna tych map wraz z informacjami, które w oparciu o nie można uzyskać. Kolejny fragment poświęcony jest badaniom rozkładu gęstości elektronowej kompleksów metali przejściowych i problemom, na które się w tej analizie napotyka. Rozdział kończy omówienie aktualnego w ostatnich latach zagadnienia dotyczącego transferu modelu tzw. 'atomu asferycznego' do udokładniania struktury kryształu w oparciu o standardowe dane dyfrakcyjne oraz tworzenia bibliotek parametrów multipolowych.

Część doświadczalna obejmuje wysokorozdzielcze badania dyfrakcyjne dla pięciu ligandów organicznych zawierających siarkę lub fosfor oraz badanych wcześniej przez doktorantkę, z wykorzystaniem danych dyfrakcyjnych o standardowej rozdzielczości, dwóch kompleksów srebra oznaczonych jako 3 i 10. Z wyjątkiem jednego liganda (CMBZT), struktury kryształów pozostałych ligandów, wyznaczone na bazie modelu IAM, były wcześniej opublikowane przez innych badaczy i wielka szkoda, że doktorantka, poza ligandem MBZT, o tym nie wspomina. Szczególnie interesujące są badania dotyczące kryształów zawierających dwie formy tautomeryczne kwasu barbiturowego i ich zestawienie z wynikami uzyskanymi dla 6-amino-2-tiouracylu. Doktorantka przeprowadza dogłębną analizę rozkładu ładunku w badanych cząsteczkach oraz analizę oddziaływań międzycząsteczkowych w kryształach w oparciu o parametry topologiczne. Na końcu stawia hipotezę mającą wyjaśnić brak reaktywności 6-amino-2-tiouracylu w reakcji z chlorkiem trifenyllocyny(IV). Hipoteza ta nie do końca mnie przekonuje, gdyż zakłada, że w silnie zasadowym środowisku reakcji mamy wyłącznie obojętne cząsteczki. Jednak w tych warunkach nie można wykluczyć chociażby częściowej deprotonacji 6-amino-2-tiouracylu a to daje nam w roztworze indywiduum o innym rozkładzie gęstości elektronowej.

W wysokorozdzielczych badaniach rozkładu gęstości elektronowej dla benzotiazol-2-tionu i jego 5-chloropochodnej mgr Grześkiewicz przeprowadza szczegółową analizę tzw. efektu pierścienia, czyli obserwowanego deficytu gęstości elektronowej na eksperymentalnych rozkładach gęstości elektronowej dla niektórych ciężkich atomów jak na przykład siarka czy chlor. Doktorantka wyjaśnia przyczyny jego powstawania oraz jego wpływ na parametry multipolowe i wyniki analizy topologicznej. Analizuje również oddziaływania międzycząsteczkowe w kryształach w oparciu o takie parametry w punkcie krytycznym jak gęstość elektronowa, laplasjan gęstości elektronowej, kinetyczna gęstość energii i potencjalna gęstość energii.

Doktorantka pokazuje, że w przypadku oddziaływań, w które zaangażowane są atomy pierwiastków cięższych gęstość elektronowa w punkcie krytycznym może prowadzić do niepoprawnych wniosków co do siły wiązania.

Doktorantka bada również rozkład gęstości elektronowej w dwóch heteroleptycznych kompleksach srebra(I): kompleks 3 składa się z dwóch symetrycznie niezależnych, obojętnych cząsteczek kompleksu z jodem bromkowym, trifenylofosfiną oraz benzotiazol-2-tionem w roli ligandów, natomiast w związku 10 występuje binuklearny kation kompleksowy z trifenylofosfiną oraz 5-chlorobenzotiazol-2-tionem jako ligandami oraz anionem azotanowym w charakterze przeciwnonu. Na bazie parametrów charakteryzujących punkty krytyczne wiązań do Ag^I mgr Grześkiewicz zauważa, że ich wartości są raczej bliższe odpowiednim parametrom charakteryzującym wiązania wodorowe niż parametrom wiązań kowalencyjnych. Ciekawa jest obserwacja, że o ile w kompleksie 3 dla basenów atomów Ag^I obserwowany jest niewielki i zróżnicowany ładunek dodatni to w kompleksie 10 występuje w tych basenach niewielki ładunek ujemny natomiast cały ładunek dodatni zlokalizowany jest na trifenylofosfinie. Nie jest to jednak aż tak zaskakujące, gdy zauważymy, że srebro i fosfor wykazują podobną elektroujemność (kolejno 2,20 i 2,19).

Ponieważ jednym z ważnych celów przeprowadzonych analiz było sprawdzenie możliwości transferu parametrów multipolowych wolnego, nieskompleksowanego liganda do jego kompleksu ze srebrem, doktorantka przeprowadziła odpowiednie analizy i doszła do wniosku, że wielkości charakteryzujące punkty krytyczne (3,-1) dla wolnego liganda i liganda związanego w kompleksie mają podobne wartości. Dotyczy to również punktów krytycznych wiązań do atomu bezpośrednio zaangażowanego w wiązanie do metalu. Na bazie tego stwierdziła, że transfer parametrów multipolowych od wolnego liganda do liganda związanego w kompleksie jest zasadny, nawet w obrębie sfery koordynacyjnej. To co mnie nurtuje, to pytanie czy podobny wniosek będzie można wyciągnąć, gdy wiązanie metal-ligand będzie miało w większym stopniu charakter kowalencyjny niż wiązania Ag-S czy Ag-P. Czy tego typu badania były robione?

Bogaty materiał badawczy zamieszczony w rozprawie mgr Grześkiewicz jest tylko częściowo opublikowany - cztery prace dotyczące kompleksów halogenków antymonu(III) z tioamidami ukazały w Polyhedronie. Mam nadzieję, że w najbliższym czasie opublikowany zostanie również pozostały materiał, szczególnie ten dotyczący badań rozkładu gęstości elektronowej.

O ile ogrom pracy wykonanej przez doktorantkę i uzyskane przez nią wyniki budzą mój podziw to strona redakcyjna rozprawy budzi wiele zastrzeżeń i wskazuje na to, że praca pisana była w dużym pośpiechu – wystarczy spojrzeć na bibliografię, gdzie nie zastosowano żadnego spójnego systemu przy zapisie odnośników literaturowych a przedstawiony spis to raczej luźne notatki, w których często pominięto nazwę czasopisma, tytuł książki czy część autorów pracy w nadziei, że uzupełni się to później. Również niektóre fragmenty tekstu wyglądają podobnie, co nieraz utrudniało czytanie rozprawy i śledzenie wywodów doktorantki. Omyłek, przejęczyzeń, żargonu laboratoryjnego, literówek, niezręcznych wyrażeń jest tak dużo, że zrezygnowałam z ich wymieniania. Praca jest bogato ilustrowana a rysunki starannie wykonane jednak podpisy pod rysunkami, wykresami i tabelami nie zawierają często właściwej informacji o ich zawartości a odpowiedniego wyjaśnienia nie ma również w tekście. Wielokrotnie wartości liczbowe podawane są bez odpowiednich jednostek, we wzorach matematycznych brak jest objaśnień dla występujących tam oznaczeń a wzory strukturalne w pracy [tab. 1.11, 2.3 (str. 113), ryc. 2.24, 2.18, 7.6] i te dołączone na kartkach zawierają liczne błędy. Doktorantka wykazuje również dość swobodne podejście do nomenklatury chemicznej – w pracy pojawiają się między innymi takie nazwy jak ‘tion 4,6-diaminomerktaptopirydyny’, ‘tion 4-diamino-6-hydroksypirydynowy’, ‘2-merkaptobenzotiazolidyna’ i tym podobne. W przypadku niektórych ligandów bez uzasadnienia posługuje się w pracy nazwą tautomeru, który w badanym kryształcie nie występuje (np. 2-merkaptobenzotiazol zamiast

benzotiazol-2-tion). Doktorantka wprowadza skrócone wzory kompleksów, które powinny zawierać informację o składzie i budowie kompleksu. Niestety w tych wzorach doktorantka stosuje to samo oznaczenie dla liganda formalnie neutralnego jak i deprotonowanego (np. $\text{Ag}[\text{P}(\text{Ph}_3)_2\text{TZT}_2]$). Z zapisu nie wynika czy przeciwjony są w sferze koordynacyjnej czy poza nią, podany skład nie zawsze odpowiada stechiometrii w kryształach (np. $\text{Ag}_2[\text{P}(\text{Ph}_3)_2\text{CMBZT}_4, \text{NO}_3^-]$). Czasami pojawia się skrót, który trudno wyjaśnić, jak na przykład w kompleksie 12 oznaczenie liganda tioamidowego jako Me_2DETU zamiast DETU . Dla tego kompleksu podana jest również zła stechiometria i niewyjaśnione pozostało znaczenie indeksu dolnego w nawiasie.

Zakończę w tym miejscu mój komentarz odnośnie redakcyjnej strony pracy a bardziej detaliczne uwagi przekazałam mgr Grześkiewicz, gdyż nie chcę by wytknięta powyżej niedbałość w zredagowaniu pracy przesłoniła bogactwo prezentowanego w niej materiału doświadczalnego oraz wartość uzyskanych wyników. Za najważniejsze osiągnięcia rozprawy uważam:

- a) otrzymanie dwóch nowych kompleksów trifenylocyny z ligandami tioamidowymi o wysokiej aktywności wobec komórek mięsaka gładkokomórkowego i pokazanie, że ligandy tioamidowe zwiększają selektywność działania kompleksów;
- b) dostarczenie obszernego materiału eksperymentalnego o strukturze kompleksów cyny(IV), srebra(I) i antymonu(III) wraz z informacją o ich aktywności cytotoksycznej;
- c) wskazanie pewnych jakościowych cech budowy kompleksów badanych metali, takich jak na przykład typ przyłączonego halogenu lub tioamidu, stopień lub sposób podstawienia liganda tioamidowego, na aktywność cytotoksyczną kompleksów i ich selektywność;
- d) znaczne poszerzenie informacji o rozkładzie gęstości elektronowej w związkach zawierających siarkę;
- e) określenie po raz pierwszy eksperymentalnego rozkładu gęstości elektronowej w kryształach kompleksów srebra w oparciu o wysokorozdzielcze dane dyfrakcyjne;
- f) wzbogacenie informacji o słabych oddziaływaniach międzycząsteczkowych, szczególnie tych z udziałem siarki, w oparciu o analizę topologiczną map gęstości elektronowej;
- g) pokazanie zasadności transferu parametrów multipolowych między niezwiązanym ligandem a ligandem przyłączonym do metalu na przykładzie kompleksów srebra.

Z załączonych do rozprawy materiałów wynika, że mgr Anita Grześkiewicz ma bardzo duży dorobek publikacyjny, w większości z tematyki nie wchodzącej w skład rozprawy. W sumie jest współautorem 21 publikacji, z których znaczna część ukazała się w prestiżowych czasopismach.

Reasumując, tematyka rozprawy mgr Anity Grześkiewicz jest z pogranicza chemii koordynacyjnej i strukturalnej, krystalografii i krystalochemii oraz chemii medycznej co wymagało od doktorantki zdobycia szerokiej wiedzy w różnorodnych dziedzinach. Przedstawione w rozprawie badania były zakrojone na szeroką skalę i w wielu punktach dotyczyły zagadnień podstawowych dla chemii. Doktorantka zdobyła ogromne doświadczenie w badaniach strukturalnych wykorzystujących zaawansowane metody dyfrakcyjne oraz wykazała się znajomością szeregu innych technik eksperymentalnych a przeprowadzona przez nią analiza wyników i dyskusja potwierdzają jej szeroką wiedzę. Szkoda, że tym osiągnięciom nie towarzyszyła równie duża staranność w zredagowaniu rozprawy. Z przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Anity Grześkiewicz spełnia wszelkie wymogi określone w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz w §5.1 rozporządzenia MENiS z

dnia 15 stycznia 2004 r. (Dz. U. nr15, poz. 128 z późniejszymi zmianami) i na tej podstawie wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Anity Grześkiewicz do publicznej obrony.

Marcin Golacz