



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU  
Wydział Chemii

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych  
Academia Scientiarum Thoruniensis

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

Adriana Kaszuba

**Nowe azolowe związki koordynacyjne  
platyny(II) i rutenu(II): synteza, charakterystyka strukturalna  
i ocena potencjału przeciwnowotworowego**

Promotor: prof. dr hab. Iwona Łakomska

Toruń 2026



*Składam serdeczne podziękowania Pani prof. dr hab. Iwonie Łakomskiej za opiekę merytoryczną, życzliwość, wsparcie oraz zawsze budujące słowo na przestrzeni wszystkich lat mojej ścieżki naukowej.*

*Z całego serca dziękuję również mojej Rodzinie i Przyjaciółom za niezmienną wiarę we mnie oraz motywowanie do działania.*

*Szczególne podziękowania kieruję do moich Rodziców za nieustające wsparcie i wszelką pomoc w dążeniu do realizacji moich marzeń i celów życiowych.*



<b>WYKAZ SKRÓTÓW</b>	<b>9</b>
<b>STRESZCZENIE</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>13</b>
<b>WPROWADZENIE</b>	<b>14</b>
<b>WSTĘP TEORETYCZNY</b>	<b>17</b>
<b>1. Aktywność biologiczna związków koordynacyjnych</b>	<b>18</b>
<b>2. Przeciwnowotworowe związki koordynacyjne platyny(II) - dlaczego wciąż są przedmiotem badań?</b>	<b>19</b>
<b>3. Właściwości triazoli</b>	<b>22</b>
3.1 Aktywność przeciwnowotworowa związków zawierających pierścień triazolowy	22
3.2 Właściwości koordynacyjne triazoli	25
<b>4. Związki koordynacyjne platyny(II) z ligandami zawierającymi pierścień triazolowy</b>	<b>28</b>
4.1 Kompleksy platyny(II) zaprojektowane w celu ograniczenia ich dezaktywacji przez glutation	29
4.1.1 Zastosowanie ligandów obniżających stężenie glutationu	29
4.1.2 Zastosowanie ligandów tworzących zawadę przestrzenną	31
4.1.3 Zastosowanie ligandów S-donorowych	32
4.2 Kompleksy platyny(II) z bioaktywnymi ligandami nośnikowymi	33
4.2.1 Ligandy skoniugowane z peptydami	33
4.2.2 Ligandy skoniugowane z cukrami	34
4.2.3 Ligandy skoniugowane z hormonami	36
4.3 Kompleksy platyny(II) ukierunkowane na odmienny mechanizm działania niż wiązanie z DNA	38
4.3.1 Kompleksy oddziałujące z białkami PTP1B	38
4.3.2 Kompleksy oddziałujące z reduktazą rybonukleotydową	40
4.4 Inne związki kompleksowe platyny(II) z ligandami triazolowymi	41
4.4.1 Kompleksy z aminokwasami	41
4.4.2 Kompleksy z ligandami triazolo-pirydynowymi	42
4.4.3 Organometaliczne kompleksy o izomerii <i>trans</i>	44
<b>5. Związki koordynacyjne rutenu(II) - obiecująca alternatywa dla cytostatyków platyny(II)</b>	<b>45</b>

<b>6. Arenowe związki koordynacyjne rutenu(II) z ligandami zawierającymi pierścień triazolowy</b>	<b>48</b>
6.1 Kompleksy rutenu(II) skoordynowane z lekami	48
6.1.1 Kompleksy rutenu(II) skoordynowane z letrozolem	48
6.1.2 Kompleksy rutenu(II) skoordynowane z lekami przeciwgrzybicznymi	50
6.2 Kompleksy rutenu(II) z ligandami skoniungowanymi z cukrami	52
6.3 Inne kompleksy rutenu (II) z ligandami chelatującymi	53
<b>CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA</b>	<b>58</b>
<b>7. Cele pracy</b>	<b>59</b>
<b>8. Odczynniki chemiczne</b>	<b>61</b>
<b>9. Preparatyka</b>	<b>62</b>
9.1 Synteza substratów	63
9.1.1 (1S,4R,5R)-4-(4-fenilo-1H-1,2,3-triazol-1-ylo)-2-((S)-1-feniloetylo)-2-azabicyklo[3.2.1]oktan	63
9.1.2 (Benzofuran-2-ylo)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylo)etenon i 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-imidazol-1-ylo)etenon	63
9.1.3 5,7-dipodstawione-1,2,4-triazolo[1,5- <i>a</i> ]pirymidyny	63
9.1.4 Malonian srebra	63
9.1.5 1,4-dihydrofenyl	64
9.2. Synteza związków koordynacyjnych platyny(II)	64
9.2.1 Prekursorowy kompleks platyny(II) <i>cis</i> -[PtCl <sub>2</sub> (DMSO) <sub>2</sub> ]	64
9.2.2 Kompleksy platyny(II) z (1S,4R,5R)-4-(4-fenilo-1H-1,2,3-triazol-1-ylo)-2-((S)-1-feniloetylo)-2-azabicyklo[3.2.1]oktanem	64
9.2.2.1 Synteza <i>trans</i> -[PtCl <sub>2</sub> (ftfeao) <sub>2</sub> ] (Pt1)	65
9.2.2.2 Synteza <i>cis</i> -[PtCl <sub>2</sub> (DMSO)(ftfeao)] (Pt2)	66
9.2.2.3 Synteza [Pt(DMSO)(ftfeao)(mal)] (Pt3)	67
9.2.3 Kompleksy platyny(II) z 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylo)etenonem i 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-imidazol-1-ylo)etenonem	68
9.2.3.1 Synteza <i>cis</i> -[PtCl <sub>2</sub> (bftē) <sub>2</sub> ] (Pt4) i <i>cis</i> -[PtCl <sub>2</sub> (bfie) <sub>2</sub> ] (Pt5)	68
9.2.3.2 Synteza <i>trans</i> -[PtCl <sub>2</sub> (DMSO)(bftē)] (Pt6) i <i>trans</i> -[PtCl <sub>2</sub> (DMSO)(bfie)] (Pt7)	69
9.2.3.3 Synteza [(Pt(bftē) <sub>2</sub> (ox)] (Pt8)	70
9.3 Synteza związków koordynacyjnych rutenu(II)	71

9.3.1 Synteza prekursorowego dimerycznego kompleksu rutenu(II) [ $\{(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\mu\text{-Cl})\}_2\text{Cl}_2$ ]	71
9.3.2 Synteza [ $(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{dntp})\text{Cl}_2$ ], [ $(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{dptp})\text{Cl}_2$ ] i [ $(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{ibntp})\text{Cl}_2$ ]	71
<b>10. Metodyka badań i aparatura</b>	<b>73</b>
10.1 Charakterystyka strukturalna związków koordynacyjnych	73
10.1.1 Analiza elementarna	73
10.1.2 Spektrometria mas	73
10.1.3 Spektroskopia wielojądrowego rezonansu magnetycznego	74
10.1.4 Spektroskopia oscylacyjna	74
10.1.5 Rentgenowska analiza strukturalna	74
10.1.6 Teoria funkcjonału gęstości	75
10.1.7 Transmisyjna Mikroskopia Elektronowa	75
10.1.8 Dynamiczne Rozpraszanie Światła	75
10.1.9 Spektrometria masowa z plazmą indukcyjnie sprzężoną	75
10.2 Badania biologiczne	75
10.2.1 Lipofilowość	75
10.2.2 Reaktywność względem glutationu	76
10.2.3 Aktywność cytotoksyczna <i>in vitro</i>	77
10.2.4 Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i>	79
10.2.5 Analiza cyklu komórkowego	80
10.2.6 Oddziaływanie z DNA	81
10.2.6.1 Elektroforeza DNA plazmidowego pUC18	81
10.2.6.2 Lepkość	81
10.2.6.3 Spektrofotometryczny pomiar zmian widma DNA w czasie	82
10.2.6.4 Miareczkowanie fluorescencyjne	82
10.3 Enkapsulacja	82
<b>11. Dyskusja wyników</b>	<b>83</b>
11.1 Charakterystyka strukturalna	83
11.1.1 Charakterystyka strukturalna związków koordynacyjnych Pt(II) z (1S,4R,5R)-4-(4-fenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-((S)-1-fenyletylo)-2- azabicyklo[3.2.1]oktanem	85

11.1.2 Charakterystyka strukturalna związków koordynacyjnych Pt(II) z (benzofuran-2-ylo)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylo)etenonem i 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-imidazol-1-ylo)etenonem	92
11.1.3 Charakterystyka strukturalna związków koordynacyjnych Ru(II)	100
11.2 Właściwości biologiczne	105
11.2.1 Lipofilowość	106
11.2.2 Reaktywność względem glutationu	108
11.2.3 Aktywność cytotoksyczna <i>in vitro</i> związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II)	110
11.2.4 Enkapsulacja w micelach Pluronic®	114
11.2.5 Aktywność cytotoksyczna <i>in vitro</i> związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) po enkapsulacji w micelach Pluronic®	117
11.2.6 Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i>	118
11.2.7 Analiza cyklu komórkowego	122
11.2.8 Badanie reaktywności względem DNA	124
<b>PODSUMOWANIE I WNIOSKI</b>	<b>128</b>
<b>DALSZE PERSPEKTYWY BADAWCZE</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>132</b>
<b>DOROBEK NAUKOWY</b>	<b>143</b>

## Wykaz skrótów

**(N)-TSC** -  $\alpha$ -(N)-Heterocykliczne tiosemikarbazony

**2008** - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika

**5637** - ludzka linia komórkowa nowotworu pęcherza moczowego

**9EtG** - 9-etyloguanina

**A2780** - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika

**A2780cisR** - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika oporna na cisplatynę

**A431** - ludzka linia komórkowa nowotworu naskórka

**A375** - ludzka linia komórkowa czerniaka

**A549** - ludzka linia komórkowa nowotworu płuca

**b.d.** - brak danych

**BALB3/T3** - mysia linia komórkowa prawidłowych fibroblastów

**BEAS-2B-CM** - ludzka linia komórkowa prawidłowa nabłonka oskrzeli

**BER** - naprawa DNA przez wycinanie zasad (ang. base excision repair)

**bfte** - 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylo)etenon

**bfi** - 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-imidazol-1-ylo)etenon

**BHK21** - prawidłowa linia komórkowa nerki chomika

**bip** - bifenyl

**BRCA1 / BRCA2** - gen Raka Piersi 1 / 2 (ang. breast cancer gene 1 / 2)

**CaCo-2** - ludzka linia komórkowa nowotworu jelita grubego

**Capan-2** - ludzka linia komórkowa gruczolakoraka trzustki

**CH1/PA-1** - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika

**cis-Pt** - cisplatyna

**CP-70** - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika

**DMF** - dimetyloformamid

**DACH** - 1,2-diaminocykloheksan

**DMSO** - dimetylosulfotlenek

**dmtp** - 5,7-dimetylo-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirymidyna

**dptp** - 5,7-difenylo-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirymidyna

**DU145 (AR-)** - ludzka linia komórkowa nowotworu prostaty niezależnego od hormonów

**ES-2** - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika

**ESI MS** - spektrometria mas z metodą jonizacji elektrorozpyłową (ang. electrospray ionization mass spectrometry)

**FDA** - Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drugs Administration)

**ftfeao** - (1S,4R,5R)-4-(4-fenilo-1H-1,2,3-triazol-1-ylo)-2-((S)-1-feniloetylo)-2-azabicyklo[3.2.1]oktan

**Gln** - L-glutamina

**GLUT** - grupa glikoprotein błonowych pełniących funkcję transporterów glukozy

**GSH** - glutation

**GSSG** - disiarczek glutationu

**GST** - S-transferaza glutationu (ang. glutathione S-transferase)

**H9c2** - prawidłowa linia komórkowa mioblastów komorowych zarodkowych serc szczurzych

**HaCaT** - ludzka linia komórkowa prawidłowych keratynocytów

**HB-CLS-1** - ludzka linia komórkowa nowotworu pęcherza moczowego

**HCT116** - ludzka linia komórkowa nowotworu jelita grubego

**HCT116dox** - ludzka linia komórkowa nowotworu jelita grubego opornego na doksorubicynę

**HCT-15** - ludzka linia komórkowa nowotworu jelita grubego

**HDF** - ludzka linia komórkowa prawidłowych fibroblastów skóry

**HeLa** - ludzka linia komórkowa nowotworu szyjki macicy

**HePG2** - ludzka linia komórkowa nowotworu wątroby

**HER2** - receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (ang. human epidermal growth factor receptor 2)

**HI-7720** - ludzka linia komórkowa białaczki

**HR MS** - spektrometria mas o wysokiej rozdzielczości (ang. high-resolution mass spectrometry)

**HRR** - geny rekombinacji homologicznej (ang. homologous recombination repair)

**HT1376** - ludzka linia komórkowa nowotworu pęcherza moczowego

**HT29** - ludzka linia komórkowa nowotworu jelita grubego

**HT29/oxa** - ludzka linia komórkowa nowotworu jelita grubego oporna na oksaliplatynę

**ibmtp** - 7-izobutylo-5-metylo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirymidyna

**ID8** - mysia linia komórkowa nabłonkowego nowotworu jajnika

**karbo-Pt** - karboplatyna

**L929** - mysia fibroblastopodobna linia komórkowa pochodząca z podskórnej tkanki łącznej

**LLC-PK1** - prawidłowa linia komórkowa nerki świni

**LNCaP (AR+)** - ludzka linia komórkowa nowotworu prostaty zależnego od hormonów

**LoVo** - ludzka linia komórkowa nowotworu jelita grubego

**MCF-7** - ludzka linia komórkowa nowotworu piersi zależnego od hormonów

**MD-MB-231** - ludzka linia komórkowa nowotworu piersi

**Mel-RM** - ludzka linia komórkowa czerniaka

**MG-63** - ludzka linia komórkowa kostniakomięsaka  
**MRC-5** - linia komórkowa zarodka ludzkiego  
**MT4** - ludzka linia komórkowa białaczki  
**NCI-H460** - ludzka linia komórkowa nowotworu płuca  
**NLS** - sygnał lokalizacji jądrowej (ang. nuclear localization signal)  
**NMR** - jądrowy rezonans magnetyczny (ang. nuclear magnetic resonance)  
**OV-90** - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika  
**ox** - szczawian (ang. oxalate)  
**ox-Pt** - oksaliplatyna  
**PARP1 / PARP2** - polimeraza 1 / 2 poliadenozyny 5'-difosforybozy  
**PC3 (AR-)** - ludzka linia komórkowa nowotworu prostaty niezależnego od hormonów  
**p-cym** - para-cymen  
**RF** - współczynnik lekooporności (ang. resistance factor)  
**RR** - reduktaza rybonukleotydomowa  
**SKOV3** - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika  
**SV-480** - ludzka linia komórkowa gruczolakoraka okrężnicy  
**SV-HUC-1** - ludzka linia prawidłowych komórek moczowodu  
**T24** - ludzka linia komórkowa nowotworu pęcherza moczowego  
**T47D** - ludzka linia komórkowa nowotworu piersi  
**TOV21-G** - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika  
**U251N** - ludzka linia komórkowa glejaka wielopostaciowego  
**XPO1** - eksportyna 1

# Streszczenie

Wpisując się w aktualny nurt poszukiwań związków koordynacyjnych stanowiących alternatywę dla obecnie stosowanych cytostatyków platyny(II), głównym celem badań zaprezentowanych w niniejszej dysertacji było otrzymanie nowych azolowych kompleksów platyny(II) i rutenu(II) oraz określenie ich struktury i potencjału przeciwnowotworowego. W ramach pracy doktorskiej zsyntetyzowano związki koordynacyjne platyny(II) typu  $[\text{PtCl}_2(\text{N-donor})_2]$ ,  $[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})(\text{N-donor})]$  oraz  $[\text{Pt}(\text{N-donor})_2(\text{ox})]$ , gdzie N-donor stanowi: (1S,4R,5R)-4-(4-fenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-((S)-1-fenyletylo)-2-azabicyklo[3.2.1]oktan, 1-(benzofuran-2-yl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)etenon, 1-(benzofuran-2-yl)-2-(1H-imidazol-1-yl)etenon, a także bifenyłowe kompleksy rutenu(II) typu  $[(\eta^6\text{-bip})\text{RuCl}_2(\text{N-donor})]$ , gdzie N-donor stanowi 5,7-dimetylo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirymidyna, 7-izobutylo-5-metylo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirymidyna lub 5,7-difenyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirymidyna.

Z wykorzystaniem różnych metod eksperymentalnych ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  oraz  $^{195}\text{Pt}$  NMR, spektroskopii IR, dyfrakcji rentgenowskiej) oraz obliczeń teoretycznych DFT określono skład i geometrię sfery koordynacyjnej w płasko-kwadratowych kompleksach platyny(II) oraz pseudooktaedrycznych kompleksach rutenu(II).

Szerokie badania potencjału terapeutycznego otrzymanych związków Pt(II) i Ru(II), obejmujące: i) oznaczenie lipofilowości, ii) ocenę reaktywności względem glutationu, iii) wyznaczenie aktywności cytotoksycznej i antyproliferacyjnej oraz iv) analizę wpływu kompleksów na przebieg cyklu komórkowego i ich oddziaływanie z DNA, umożliwiły wytypowanie czterech związków koordynacyjnych (trzech platyny(II) i jednego rutenu(II)) jako obiecujących kandydatów na potencjalne chemioterapeutyki przeciwnowotworowe. W porównaniu z cisplatyną związki te charakteryzowały się: i) wyższą lipofilowością ( $\log P = 0,87 - 1,43$ ), ii) obniżoną reaktywnością wobec glutationu, iii) mniejszą toksycznością względem komórek prawidłowych ( $\text{IC}_{50}$  kompleksów = 5,01 - 23,87  $\mu\text{M}$ ;  $\text{IC}_{50}$  cisplatyny = 4,87  $\mu\text{M}$ ), iv) odmiennym mechanizmem działania, niezwiązanym z bezpośrednim oddziaływaniem z DNA.

Ponadto wykazano, że enkapsulacja wybranych kompleksów Pt(II) i Ru(II) w micelach Pluronic®P123 generowała znaczącą poprawę ich właściwości przeciwnowotworowych, umożliwiając osiągnięcie submikromolarnych wartości  $\text{IC}_{50}$  (0,07 - 0,94  $\mu\text{M}$ ). Uzyskane rezultaty wskazują, że połączenie azolowych kompleksów platyny(II) lub rutenu(II) z polimerowymi systemami nanonośnikowymi (Pluronic®P123) stanowi obiecujące podejście w projektowaniu chemioterapeutyków nowej generacji.

## Abstract

In response to current research efforts aimed at identifying coordination compounds as alternatives to the clinically used platinum(II) cytostatics, this doctoral dissertation focuses on the synthesis, structural characterization, and evaluation of the anticancer potential of novel platinum(II) and ruthenium(II)azole complexes. As part of the dissertation, coordination compounds of platinum(II) of the  $[\text{PtCl}_2(\text{N-donor})_2]$ ,  $[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})(\text{N-donor})]$ , and  $[\text{Pt}(\text{N-donor})_2(\text{ox})]$  types, where (1*S*,4*R*,5*R*)-4-(4-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-((*S*)-1-phenylethyl)-2-azabicyclo[3.2.1]octane, (benzofuran-2-yl)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)ethenone or (benzofuran-2-yl)-2-(1*H*)-imidazol-1-yl)ethenone are the N-donors were synthesized, as well as biphenyl ruthenium(II) complexes of the  $[(\eta^6\text{-bip})\text{RuCl}_2(\text{N-donor})]$  type, where 5,7-dimethyl-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine, 7-isobutyl-5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine or 5,7-diphenyl-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine are the N-donor were prepared.

The compositions of the coordination spheres were confirmed using a combination of experimental techniques ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and  $^{195}\text{Pt}$  NMR, IR, single-crystal diffraction), and density functional theory (DFT) calculations. These studies confirmed square-planar geometry for the platinum(II) complexes and pseudooctahedral geometry for the ruthenium(II) complexes.

The biological activity of the synthesized compounds was comprehensively evaluated through the determination of lipophilicity, assessment of glutathione reactivity, cytotoxic and antiproliferative studies, and analysis of their effects on the cell cycle and DNA interactions. Four (three platinum(II) and one ruthenium(II)) coordination compounds were identified as promising anticancer candidates. Compared to cisplatin, these compounds exhibited higher lipophilicity ( $\log P = 0.87 - 1.43$ ), reduced reactivity toward glutathione, lower toxicity toward normal cells ( $\text{IC}_{50} = 5.01 - 23.87 \mu\text{M}$ ), and a mechanism of action independent of direct DNA binding.

Furthermore, it was shown that the encapsulation of the selected platinum(II) and ruthenium(II) complexes in Pluronic®P123 micelles significantly improves their anticancer properties, enabling the achievement of submicromolar  $\text{IC}_{50}$  values ( $\text{IC}_{50} = 0.07 - 0.94 \mu\text{M}$ ). The collected results indicate that the combination of platinum(II) or ruthenium(II)azole complexes with polymeric nanocarrier systems (Pluronic®P123) is a promising approach to designing next-generation chemotherapeutic agents.

# Wprowadzenie

Pomimo istotnego postępu w diagnostyce oraz dynamicznego rozwoju nowoczesnych metod terapeutycznych, choroby nowotworowe wciąż stanowią jedną z głównych przyczyn zachorowalności i śmiertelności na świecie. W konsekwencji poszukiwanie nowych, skuteczniejszych rozwiązań farmakologicznych w terapii nowotworów pozostaje jednym z kluczowych wyzwań współczesnej medycyny. Obecnie podstawę leczenia systemowego w onkologii nadal stanowi chemioterapia, w której od ponad pięćdziesięciu lat dominującą rolę odgrywają związki platyny(II), takie jak cisplatyna, karboplatyna oraz oksaliplatyna, szeroko stosowane w terapii wielu typów nowotworów. Mimo wysokiej skuteczności klinicznej, leki te obarczone są istotnymi ograniczeniami, obejmującymi brak selektywności wobec komórek nowotworowych, znaczną toksyczność ogólnoustrojową oraz narastającą oporność na leczenie. Czynniki te istotnie obniżają zarówno jakość życia pacjentów, jak i efektywność długotrwałej terapii.

W odpowiedzi na powyższe problemy od wielu lat prowadzone są intensywne badania nad opracowaniem nowych cytostatyków opartych na związkach koordynacyjnych platyny(II), których mechanizm działania umożliwiłby przezwycięzenie ograniczeń charakterystycznych dla klasycznych leków platynowych. Szczególne zainteresowanie, obok kompleksów platyny(II), budzą związki koordynacyjne rutenu, wykazujące korzystne właściwości farmakologiczne, takie jak odmienny mechanizm działania, potencjalnie wyższa selektywność względem komórek nowotworowych i aktywność wobec nowotworów wtórnych. Aktualnie kilka kompleksów rutenu znajduje się na zaawansowanym etapie badań klinicznych, co podkreśla ich znaczący potencjał terapeutyczny. W rezultacie zarówno platyna, jak i ruten uznawane są za jedne z najbardziej perspektywicznych metali w badaniach nad nową generacją metalo-leków przeciwnowotworowych.

Projektując nowe nieorganiczne związki przeciwnowotworowe, należy jednak uwzględnić fakt, że o ich potencjale terapeutycznym w dużym stopniu decyduje charakter ligandów skoordynowanych z atomem centralnym. W tym kontekście szczególnie obiecującym kierunkiem badań wydaje się wykorzystanie ligandów zawierających pierścień triazolowy, który stanowi istotny element strukturalny wielu powszechnie stosowanych leków onkologicznych, odgrywając kluczową rolę w ich aktywności biologicznej. Połączenie udokumentowanej aktywności biologicznej, zdolności koordynacyjnych oraz możliwości modyfikacji struktury poprzez wprowadzanie

różnorodnych grup funkcyjnych sprawia, że pierścień triazolowy uznawany jest za atrakcyjny ligand w projektowaniu kompleksów o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Dane literaturowe wskazują, że włączenie ligandów triazolowych do sfery koordynacyjnej kompleksów platyny(II) i rutenu(II) prowadzi do powstania cytotoksycznych związków o zróżnicowanych zdolnościach do wiązania z biocząsteczkami oraz różnorodnym mechanizmie działania, często odmiennym od prezentowanego przez komercyjnie dostępne metalo-leki.



# **Wstęp teoretyczny**

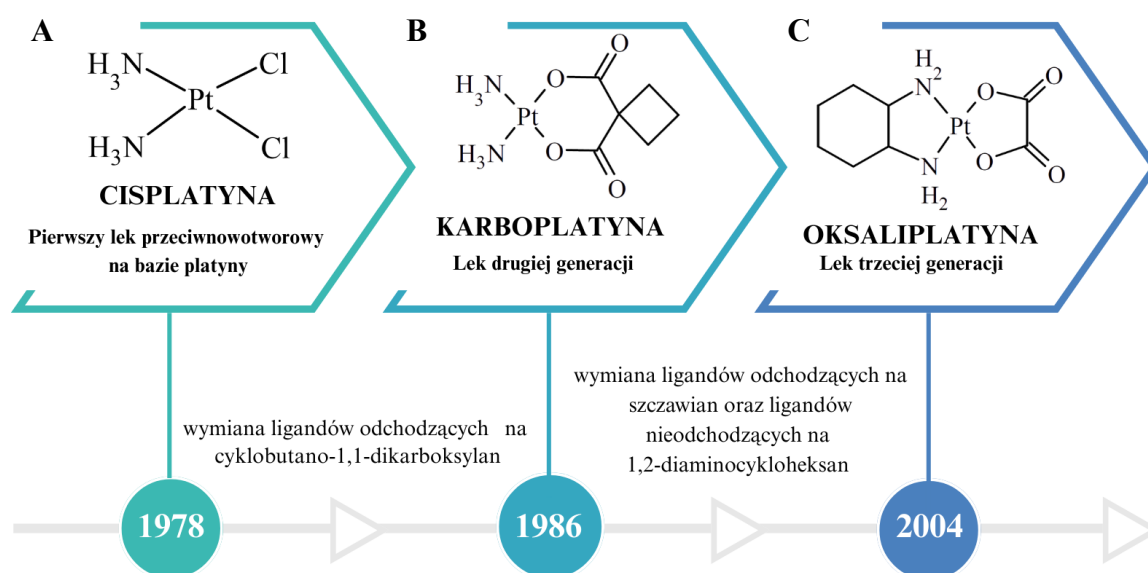
## 1. Aktywność biologiczna związków koordynacyjnych

Zainteresowanie projektowaniem leków opartych na związkach koordynacyjnych jonów metali przejściowych zapoczątkowano w XX wieku, wraz z wprowadzeniem do farmakoterapii arsfenaminy oraz cisplatyny. Do dziś kompleksy metali przejściowych pełnią istotną rolę w diagnostyce<sup>1-3</sup> i terapii<sup>4-7</sup> różnych chorób, a zasadność ciągłego projektowania leków opartych na związkach kompleksowych potwierdzona jest w licznych badaniach.<sup>8-13</sup> Analiza przeprowadzona przez Angelo Frei i współpracowników, obejmująca właściwości przeciwdrobnoustrojowe około 1000 różnych związków kompleksowych wykazała, że 27% z nich posiada aktywność w tym kierunku. Dla porównania, spośród przebadanych związków organicznych tylko 1,6% przejawia równoważne działanie.<sup>8</sup> Istnieje także wiele publikacji naukowych, które wykazują, że aktywność przeciwnowotworowa związków kompleksowych jest większa niż wolnych ligandów,<sup>9-12</sup> a w przypadku w terapii fotodynamicznej, obserwuje się wyższe wydajności generowania tlenu singletowego, dłuższe czasy życia stanu tripletowego i większą fotostabilność związków kompleksowych w porównaniu do ich odpowiedników organicznych.<sup>13</sup> Warto wspomnieć, że związki koordynacyjne metali przejściowych badane są także pod względem aktywności w terapii chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera i Parkinsona),<sup>14</sup> metabolicznych (cukrzyca),<sup>15</sup> czy też autoimmunologicznych (stwardnienie rozsiane).<sup>16</sup>

Nieustające poszukiwanie leków w kręgu związków kompleksowych wynika z ich licznych zalet, w porównaniu z chemioterapeutykami organicznymi, m.in. zdolności do zmiany liczby koordynacyjnej, stopnia utlenienia i geometrii.<sup>17</sup> Warto jednak zdać sobie sprawę, iż mnogość tych zmiennych sprawia, że racjonalne projektowanie nowych metalo-leków stanowi duże wyzwanie, gdyż konieczne jest rozważenie, które fragmenty związku mogą wpływać na jego właściwości farmakologiczne - czy jest to cały kompleks, jon metalu, czy też same ligandy.<sup>18</sup> Jednym ze współczesnych innowacyjnych obszarów badawczych jest dobór struktury związków tak aby charakteryzowały się kontrolowaną aktywacją i/lub uwalnianiem w docelowym miejscu działania. Dodatkowo, w przypadku terapeutyków przeciwnowotworowych inicjacja działania farmakologicznego może być dostrojona do środowiska panującego wewnątrz komórek nowotworowych i być aktywowana w oparciu o: i) redukcję powodowaną środowiskiem redokсовym guza,

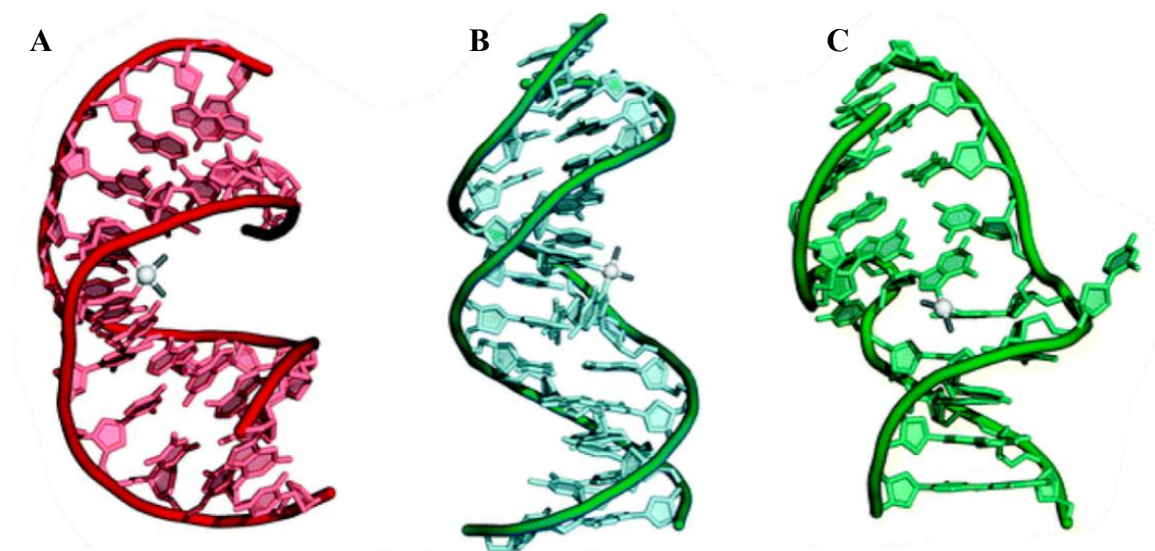
ii) czynniki fizykochemiczne, takie jak niedotlenienie i obniżone pH, iii) zmiany ekspresji enzymów.<sup>19</sup>

## 2. Przeciwnowotworowe związki koordynacyjne platyny(II) - dlaczego wciąż są przedmiotem badań?



Rys. 1 Cisplatyna (A), karboplatyna (B), oksaliplatyna (C) - trzy generacje przeciwnowotworowych leków platyny(II) dopuszczonych do obrotu na całym świecie.

Jednym z pierwszych, a zarazem najskuteczniejszych leków onkologicznych wywodzących się z obszaru chemii koordynacyjnej jest cisplatyna (Rys. 1 A). Mimo, że chemioterapeutyk ten stosowany jest od ponad 40 lat, według badań z 2021 roku wciąż zajmuje 2. miejsce na liście 20 najczęściej stosowanych leków przeciwnowotworowych.<sup>20</sup> Mechanizm cytotoksycznej aktywności cisplatyny przypisywany jest jej wiązaniu z DNA. Cisplatyna po wnikięciu do wnętrza komórek nowotworowych (gdzie stężenie jonów chlorkowych jest niższe (4 - 20 mM) niż we krwi (100 mM)) i ulega akwatacji, w wyniku czego powstaje  $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ , który wiąże się zazwyczaj z dwoma sąsiadującymi ze sobą zasadami purynowymi, prowadząc do zniekształceń i pęknięć podwójnej helisy DNA (Rys. 2).<sup>21</sup>



Rys. 2 Struktury adduktów dwuniciowego DNA z cisplatyną określone metodą rentgenowskiej analizy strukturalnej: wewnętrznicowe wiązanie z dwoma sąsiadującymi guaninami (A), wewnętrznicowe wiązanie z dwoma guaninami oddzielonymi tyminą (B), wiązanie międzyciowe (C).<sup>22</sup>

Cisplatyna jest stosowana w leczeniu szerokiego spektrum nowotworów litych, w tym raka jajnika, jąder, pęcherza moczowego, jelita grubego, płuc oraz głowy i szyi. Za niewątpliwy sukces terapeutyczny cisplatyny można uznać wzrost wskaźnika wyleczeń raka jąder do 95%, po wprowadzeniu jej do schematu leczenia tego nowotworu.<sup>22</sup> Lek ten często prowadzi do początkowej odpowiedzi terapeutycznej związanej z całkowitą remisją, częściową odpowiedzią lub stabilizacją choroby. Jednak leczenie cisplatyną zazwyczaj wymaga zastosowania terapii skojarzonej z innymi lekami.<sup>21</sup>

Do wad cisplatyny niewątpliwie można zaliczyć wysoką toksyczność względem komórek prawidłowych (przejawiającą się głównie jako nefro-, neuro- i ototoksyczność), znacznie ograniczającą dawkę,<sup>23</sup> a także generowanie lekooporności, zarówno pierwotnej jak i wtórnej.<sup>24</sup> Oporność na cisplatynę jest wieloczynnikowa,<sup>25</sup> jednakże za jeden z głównych mechanizmów uważa się duże powinowactwo do biocząsteczek zawierających w strukturze grupy tiolowe, głównie glutationu (GSH).<sup>26</sup> Wiązanie z tym tripeptydem powoduje dezaktywację i usunięcie z organizmu leku, zanim dotrze do miejsca docelowego działania.<sup>26</sup> Powstawanie wiązania Pt-GSH może być katalizowane poprzez S-transferazę glutationu (GST). Zwiększona ekspresja GST wraz z podwyższonym poziomem GSH w komórkach opornych potwierdza, że inaktywacja cisplatyny przyczynia się znacząco do fenotypu lekooporności. Zwiększony poziom GSH może dodatkowo powodować wzmocnienie mechanizmu naprawy DNA lub zmniejszenie stresu oksydacyjnego wywołanego przez cisplatynę.<sup>27</sup>

Poszukiwania sposobów na zniwelowanie licznych ograniczeń związanych ze stosowaniem cisplatyny skupiły się na modyfikacji ligandów wchodzących w skład sfery koordynacyjnej kompleksu, zarówno odchodzących ligandów chlorkowych jak i nieodchodzących ligandów aminowych. Badania te doprowadziły do zaprojektowania leków opartych na związkach koordynacyjnych platyny(II) drugiej i trzeciej generacji, tj. karboplatyny i oksaliplatyny (Rys. 1 B i C).

Zastosowanie cyklobutano-1,1-dikarboksylanu (CBDC) jako liganda odchodzącego w karboplatynie (Rys. 1 B) wpłynęło na zmniejszenie szybkości akwatacji kompleksu w porównaniu do cisplatyny. W konsekwencji obniżyła się reaktywność leku względem biocząsteczek, a tym samym toksyczność wobec komórek prawidłowych. Z uwagi na zmniejszony profil toksyczności, karboplatyna stosowana jest w bardziej intensywnej chemioterapii wysokodawkowej.<sup>21</sup> Obecnie karboplatyna w terapii skojarzonej z paclitaxelem stanowi pierwszą linię leczenia zaawansowanego nowotworu jajnika.<sup>28</sup>

Również zastosowanie szczawianu (ox) jako liganda odchodzącego w oksaliplatynie zmniejszyło reaktywność i toksyczność leku w porównaniu do cisplatyny, natomiast lipofilowy ligand nieodchodzący 1,2-diaminocykloheksan (DACH) (Rys. 1 C) wpłynął na zwiększenie biernego transportu do wnętrza komórek. Oksaliplatyna podobnie jak cisplatyna, oddziałuje z DNA tworząc addukty z sąsiadującymi zasadami purynowymi (Rys. 3), jednak powstające zniekształcenia konformacyjne są w mniejszym stopniu rozpoznawalne przez białka naprawcze.<sup>21</sup>

Należy podkreślić, że wszystkie trzy omówione powyżej leki platyny(II) wykazują silne działanie synergistyczne z inhibitorami punktów kontrolnych układu odpornościowego, co dodatkowo umacnia ich rolę w nowoczesnej terapii skojarzonej z immunoterapią.<sup>19</sup>

Mimo, że opisane powyżej modyfikacje sfery koordynacyjnej cisplatyny wpłynęły na poprawę właściwości farmakologicznych jej pochodnych drugiej i trzeciej generacji, ich wady nie zostały całkowicie wyeliminowane. Dlatego też, naukowcy z całego świata



Rys. 3 Struktura adduktu dwuniciowego DNA z oksaliplatyną: wewnątrznicowe wiązanie z dwoma sąsiadującymi guaninami.<sup>22</sup>

zainspirowani klinicznym sukcesem cytostatyków platyny(II), lecz świadomi ich licznych ograniczeń, poszukują nowych cytotoksycznych kompleksów Pt(II). Efektem ich działań jest wprowadzenie do badań klinicznych aż 35 związków koordynacyjnych platyny do 2025 roku.<sup>29</sup> Obecne badania ukierunkowane są na: i) otrzymanie związków o większej selektywności względem komórek nowotworowych, ii) zmniejszenie toksyczności i skutków ubocznych, iii) opracowanie nowych mechanizmów działania w celu poprawy skuteczności, iv) omijanie ścieżek oporności.<sup>19</sup>

Jeden z głównych trendów poszukiwania nowych leków platyny(II) jest zastosowanie ligandów N-heterocyklicznych. Wprowadzenie sterycznie rozbudowanych ligandów N-donorowych powoduje bowiem powstanie termodynamicznie stabilnego wiązania Pt-N i chroni kompleksy Pt(II) przed dezaktywacją biocząsteczkami. Podstawienie w cząsteczce cisplatyny jednego lub obu ugrupowań NH<sub>3</sub> innymi nieodchodzącymi ligandami N-donorowymi wpływa na zachowanie farmakologiczne leku.<sup>30</sup> W tym kontekście szczególnie interesujące, ze względu na swoje właściwości przeciwnowotworowe i koordynacyjne, wydają się być ligandy triazolowe.

### **3. Właściwości triazoli**

#### **3.1 Aktywność przeciwnowotworowa związków zawierających pierścienie triazolowy**

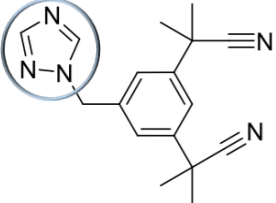
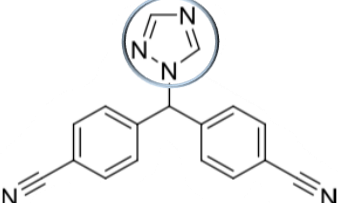
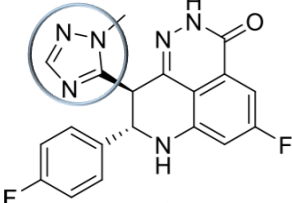
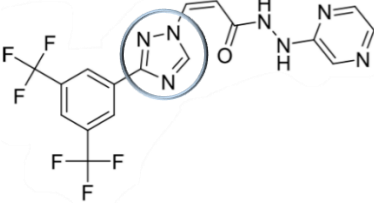
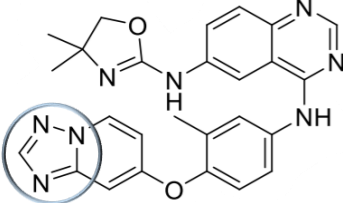
Wnikliwa analiza leków zarejestrowanych przez FDA (Agencja Żywności i Leków, ang. Food and Drug Administration) wskazuje na wzrastającą tendencję projektowania leków zawierających pierścienie N-heterocykliczne. Warto wspomnieć, iż spośród małowcząsteczkowych substancji czynnych zarejestrowanych do leczenia w latach 2013 - 2023, aż 82% zawiera w swojej budowie pierścień N-heterocykliczny, z czego 53% posiada więcej niż jeden taki układ pierścieniowy.<sup>31</sup> Duże zainteresowanie naukowców tym obszarem badawczym wynika między innymi ze znacznego rozpowszechniania układów N-heterocyklicznych w naturze, gdzie są składnikami wielu biologicznie aktywnych cząsteczek, w tym m.in. witamin, kwasów nukleinowych, antybiotyków czy hormonów.<sup>32-34</sup> Wydaje się, że projektowanie syntetycznych środków leczniczych, w oparciu o strukturę podobną do związków występujących w naturze, daje możliwość naśladowania ich w procesach biologicznych.<sup>35-38</sup> Co więcej, różnorodność struktur, rozmiarów pierścieni i aromatyczności układów N-heterocyklicznych<sup>39-41</sup> przekłada się na

szerokie spektrum aktywności biologicznych tych związków,<sup>32,42–45</sup> które następnie mogą być modyfikowane poprzez wymianę podstawników.<sup>44,46,47</sup>

Jednymi z najczęściej występujących ugrupowań w lekach są pięcioczłonowe pierścienie aromatyczne, spośród których najpowszechniejsze są pirazol, imidazol i triazol.<sup>31</sup> Obecnie związki zawierające pierścień triazolowy, zarówno izomer 1,2,3- jak i 1,2,4-, cieszą się znaczną uwagą naukowców w kontekście projektowania leków przeciwnowotworowych. To właśnie sztywny pierścień triazolowy, stabilny w warunkach redoks i odporny na hydrolizę,<sup>48</sup> oraz zdolność do tworzenia oddziaływań międzycząsteczkowych takich jak: wiązania wodorowe (zarówno jako donor, jak i akceptor), oddziaływania van der Waalsa, oddziaływania hydrofobowe lub oddziaływania  $\pi$  -  $\pi$  umożliwiają tym związkom łączenie z różnymi celami biologicznymi.<sup>49</sup> Ponadto struktura triazolu pozwala naśladować biocząsteczki, w tym amidy, estry i związki diazowe.<sup>48</sup> Co więcej, pierścień triazolowy jest często wykorzystywany jako łącznik między jednostkami farmakoforowymi, umożliwiając uzyskanie wielofunkcyjnych struktur terapeutycznych.<sup>50</sup> W zależności od podstawników, triazol może wykazywać różne mechanizmy działania, m.in.: i) wpływ na cykl komórkowy, ii) wiązanie z DNA, iii) hamowanie aktywności enzymów, iv) inhibicję angiogenezy, v) modulowanie genów.<sup>49</sup>

Obecnie jako chemioterapeutyki przeciwnowotworowe FDA zatwierdziła pięć związków organicznych zawierających w swojej strukturze pierścień triazolowy (Tab. 1).<sup>48</sup> Wnikliwe badania nad mechanizmem działania przeciwnowotworowego omówionych poniżej chemioterapeutyków potwierdziły, że pierścień triazolowy bierze bezpośredni udział w oddziaływaniach leków z inhibitowanymi enzymami.<sup>51–56</sup>

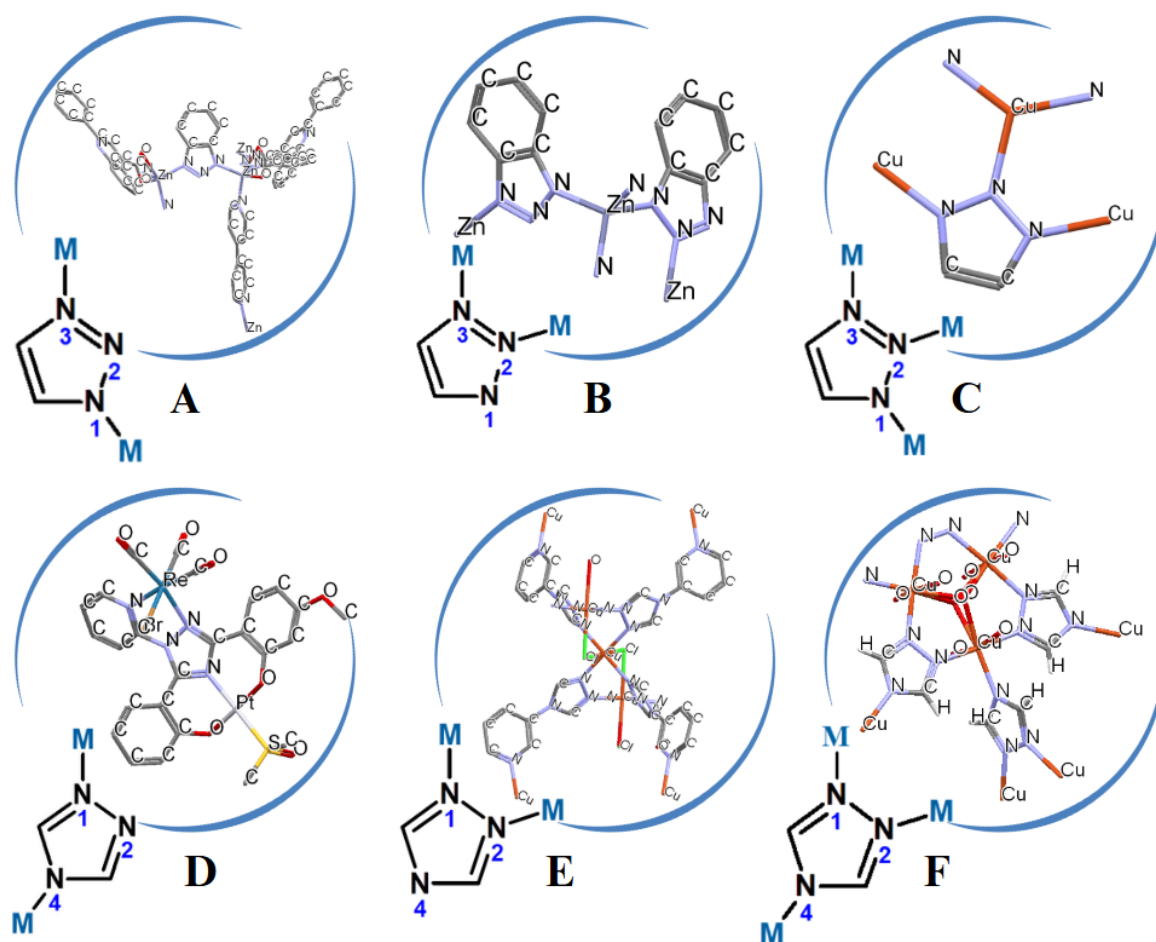
Tab. 1 Zestawienie zarejestrowanych przez FDA leków przeciwnowotworowych, zawierających w swojej strukturze pierścień triazolowy.

Wzór strukturalny, nazwa i rok wprowadzenia leku	Spektrum leczonych nowotworów i mechanizm działania
 <p><b>Anastrozol (1995 r.)</b> <sup>51</sup></p>	<p>Zarówno anastrozol jak i letrozol zarejestrowano do leczenia uzupełniającego u kobiet po menopauzie z wczesnym stadium raka piersi oraz przerzutowym rakiem piersi z dodatnimi receptorami hormonalnymi. Oba leki należą do grupy niesteroidowych inhibitorów aromatazy trzeciej generacji. <sup>51,52</sup></p>
 <p><b>Letrozol (1997 r.)</b> <sup>52</sup></p>	
 <p><b>Talazoparib (2018 r.)</b> <sup>54</sup></p>	<p>Zarejestrowany do leczenia raka piersi z mutacjami w genach BRCA1/BRCA2 i HER2- (zaawansowanym lub przerzutowym). <sup>54</sup> W 2023 roku spektrum leczonych tym lekiem nowotworów poszerzono o przerzutowy nowotwór prostaty z mutacjami w genach naprawy rekombinacji homologicznej (HRR), w tym BRCA1 i BRCA2. <sup>57</sup> Związek ten jest inhibitorem polimerazy poliadenozyny 5'-difosforybozy (PARP). <sup>58</sup></p>
 <p><b>Selinexor (2019 r.)</b> <sup>59</sup></p>	<p>Zarejestrowany do leczenia pacjentów z nawrotowym lub opornym na leczenie szpiczakiem mnogim. <sup>50</sup> Lek ten należy do grupy związków będących inhibitorami eksportera jądrowego ukierunkowanym na eksportynę 1 (XPO1). <sup>59</sup></p>
 <p><b>Tucatinib (2020 r.)</b> <sup>56</sup></p>	<p>Zarejestrowany do leczenia w terapii skojarzonej z trastuzumabem i kapecytabiną u pacjentek z zaawansowanym, nieoperacyjnym lub przerzutowym rakiem piersi HER2+, w tym pacjentek z przerzutami do mózgu, które otrzymały jeden lub więcej wcześniejszych schematów leczenia opartych na przeciwciałach HER2. Tucatinib jest selektywnym inhibitorem kinazy tyrozynowej HER2. <sup>56</sup></p>

Aktywność przeciwnowotworowa triazoli w połączeniu z obecnością w ich strukturze atomów azotu, zdolnych do pełnienia roli donorów w wiązaniu koordynacyjnym, sprawia, że układy te wydają się być obiecującymi ligandami w związkach kompleksowych metali przejściowych ukierunkowanych na działanie przeciwnowotworowe.

### 3.2 Właściwości koordynacyjne triazoli

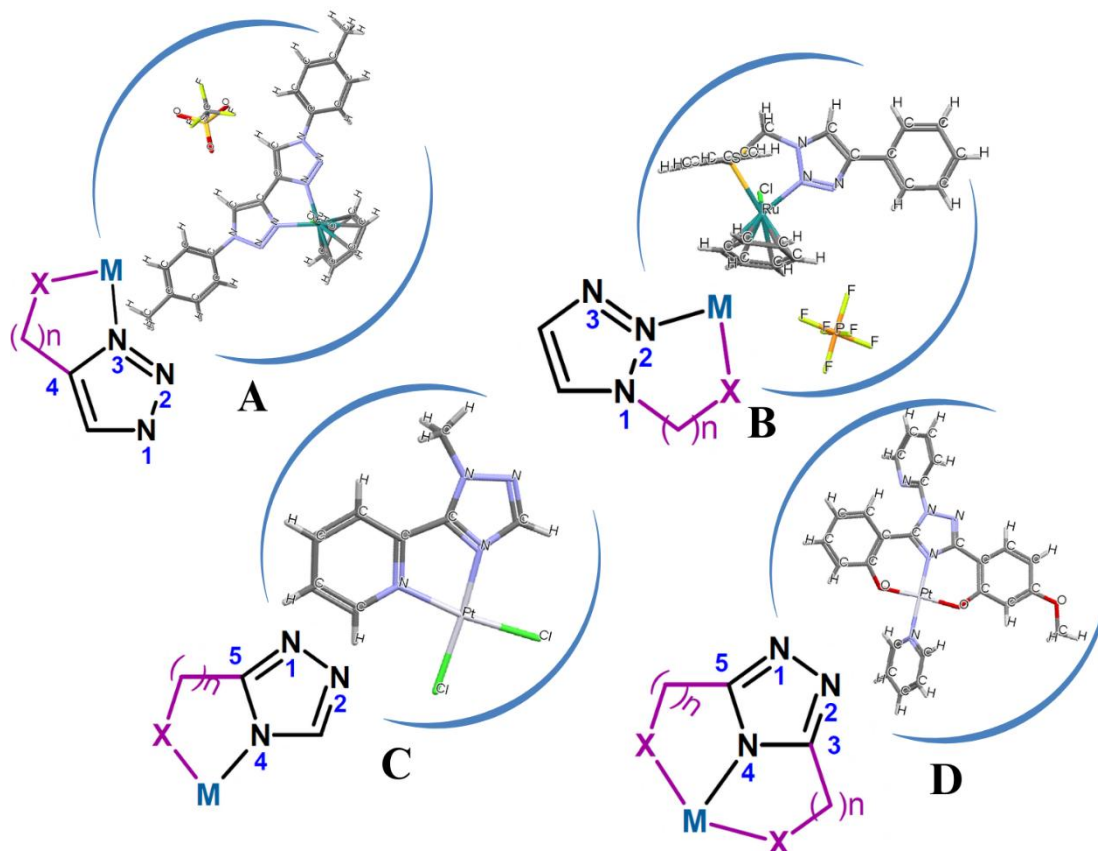
Układy triazolowe zyskały zainteresowanie jako ligandy w związkach kompleksowych metali przejściowych o różnorodnym zastosowaniu (m.in. optyka, czujniki redoks, medycyna i kataliza).<sup>60</sup> Obecność trzech atomów azotu umożliwia koordynację z jonami metali na różne sposoby (Rys. 4, Rys. 5, Rys. 6), a rodzaj koordynacji liganda zależy od izomerii (1,2,3- lub 1,2,4-) oraz od obecności i położenia podstawników.<sup>17,60-64</sup> W niniejszym rozdziale zaprezentowano typy koordynację triazoli z różnymi centrami metalicznymi wraz z zaprezentowaniem przykładowych literaturowych struktur krystalicznych związków kompleksowych.



Rys. 4 1,2,3-triazol (A-C) i 1,2,4-triazol (E-F) jako ligandy mostkujące wraz z przykładowymi strukturami krystalicznymi związków kompleksowych o określonych sposobach koordynacji.<sup>65-67</sup>

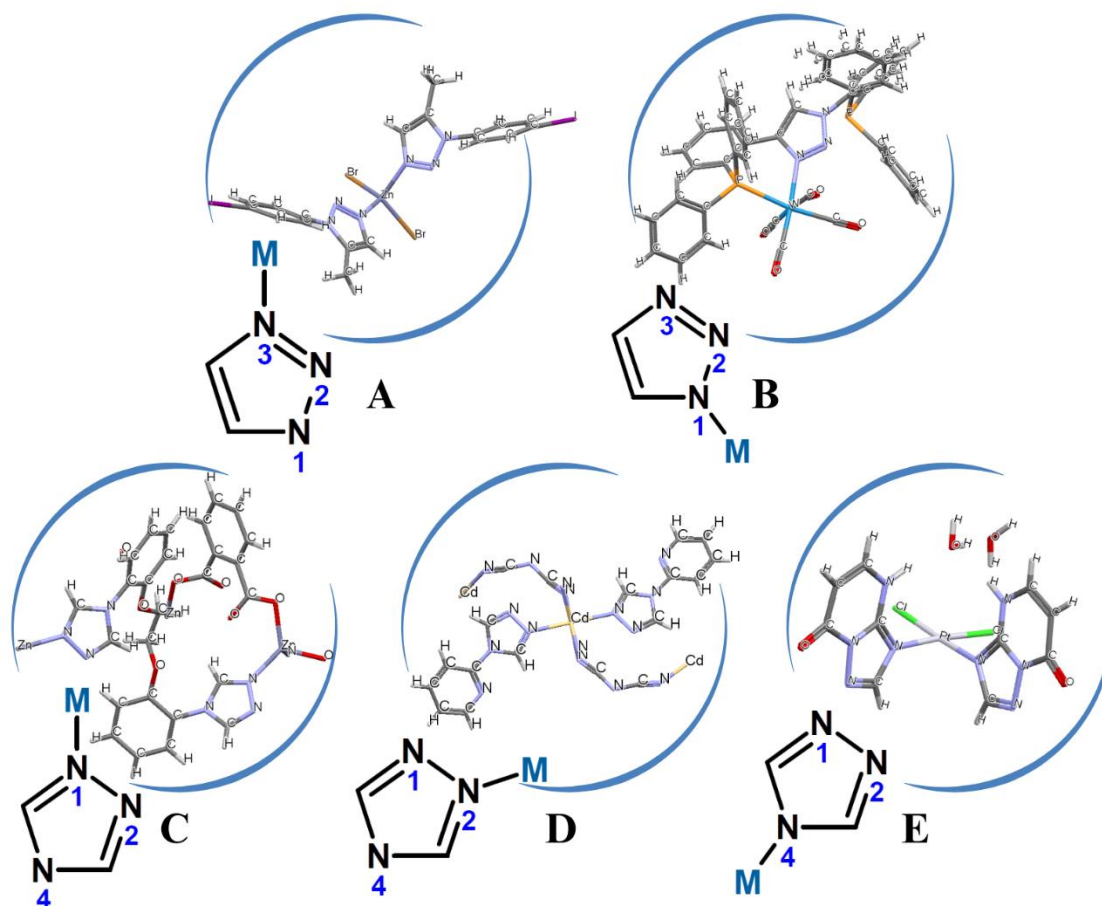
Najczęściej spotykana jest koordynacja bidentatna mostkująca (Rys. 4), o ile nie występują żadne ograniczenia przestrzenne.<sup>61,62</sup> W przypadku izomeru 1,2,3- donorami wiązania koordynacyjnego są najczęściej atomy azotu N1 i N3 (Rys. 4 A) lub N2 i N3 (Rys. 4 B), natomiast dla izomeru 1,2,4- odpowiednio atomy azotu N1 i N4 (Rys. 4 D)

lub N1 i N2 (Rys. 4 E). <sup>60-62</sup> Kompleksy, w których triazol spełnia rolę liganda tridentatnego mostkującego (Rys. 4 C i F) występują rzadko. <sup>62</sup>



Rys. 5 1,2,3-triazol (A i B) i 1,2,4-triazol (C i D) jako ligandy chelatujący, gdzie X - atom donorowy, wraz z przykładowymi strukturami krystalicznymi związków kompleksowych o określonych sposobach koordynacji. <sup>68-70</sup>

Drugim najczęściej spotykanym sposobem wiązania triazoli z atomami centralnymi jest koordynacja polidentatna chelatująca. <sup>17,60</sup> Występuje ona szczególnie wtedy, gdy pierścień triazolowy podstawiony jest innym elektronodonorowym ugrupowaniem (Rys. 5). Ligandy 1,2,3-triazolowe mogą być podstawione na atomie węgla C4 (Rys. 5 A) lub azotu N1 (Rys. 5 B), co zazwyczaj prowadzi do powstania 5- lub 6-członowych pierścieni chelatowych skoordynowanych przez atomy azotu N3 lub N2. Ligandy 1,2,4-triazolowe podstawione są zazwyczaj na atomie węgla C5 (Rys. 5 C) lub C3 i C5 (Rys. 5 D), pełniąc rolę ligandów bidentatnych chelatujących lub tridentatnych chelatujących. Powstawanie chelatów skutkuje delokalizacją elektronów  $\pi$  w chmurze elektronowej, co przekłada się na wzrost charakteru lipofilowego takich układów. <sup>17</sup>

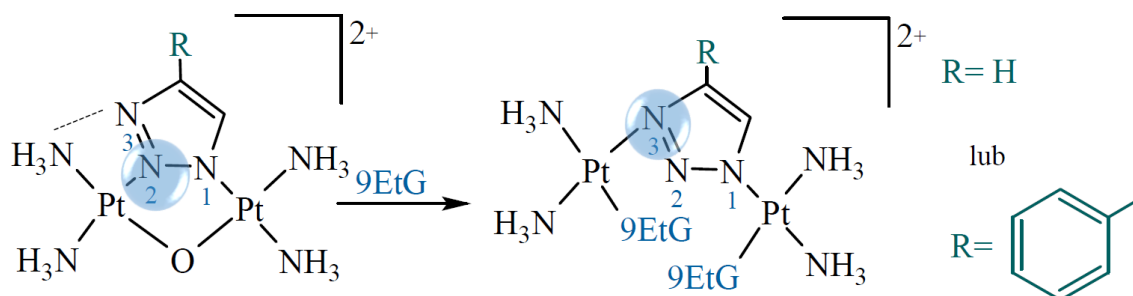


Rys. 6 1,2,3-triazol (A-B) i 1,2,4-triazol (C-E) jako ligandy monodentatne wraz z przykładowymi strukturami krystalicznymi związków kompleksowych o określonych sposobach koordynacji.<sup>71-75</sup>

Natomiast gdy pierścień triazolu podstawiony jest przez rozbudowane ugrupowania tworzące zawadę przestrzenną obserwuje się monodentatną koordynację do pojedynczego jonu metalu (Rys. 6). Taki sposób koordynacji sprawia, że wolna para elektronowa na atomie azotu może brać udział w tworzeniu wiązań wodorowych.<sup>63</sup>

W przypadku 1,2,3-triazoli silnie zasadowy atom azotu N3 jest najczęstszym miejscem koordynacji do jonów metali przejściowych.<sup>62,64</sup> Z kolei w przypadku 1,2,4-triazoli koordynacja zazwyczaj zachodzi przez atom azotu N4.<sup>62</sup> Warto wspomnieć, iż znane są doniesienia literaturowe o migracji wiązania koordynacyjnego między donorowymi atomami azotu.<sup>76</sup> Przykładem jest seria dijądrowych kompleksów Pt(II) z mostkiem triazolowym, gdzie substytucja 9-etyloguaniny (9EtG) do kompleksu platyny(II) powoduje migrację wiązania koordynacyjnego między atomem azotu N2 i N3 (Rys. 7). Substytucji 9EtG towarzyszy otwarcie pierścienia triazolowego, a atom azotu N3 podstawia N2 i koordynuje atom Pt(II) (Rys. 7). Wykazano, że reakcja izomeryzacji

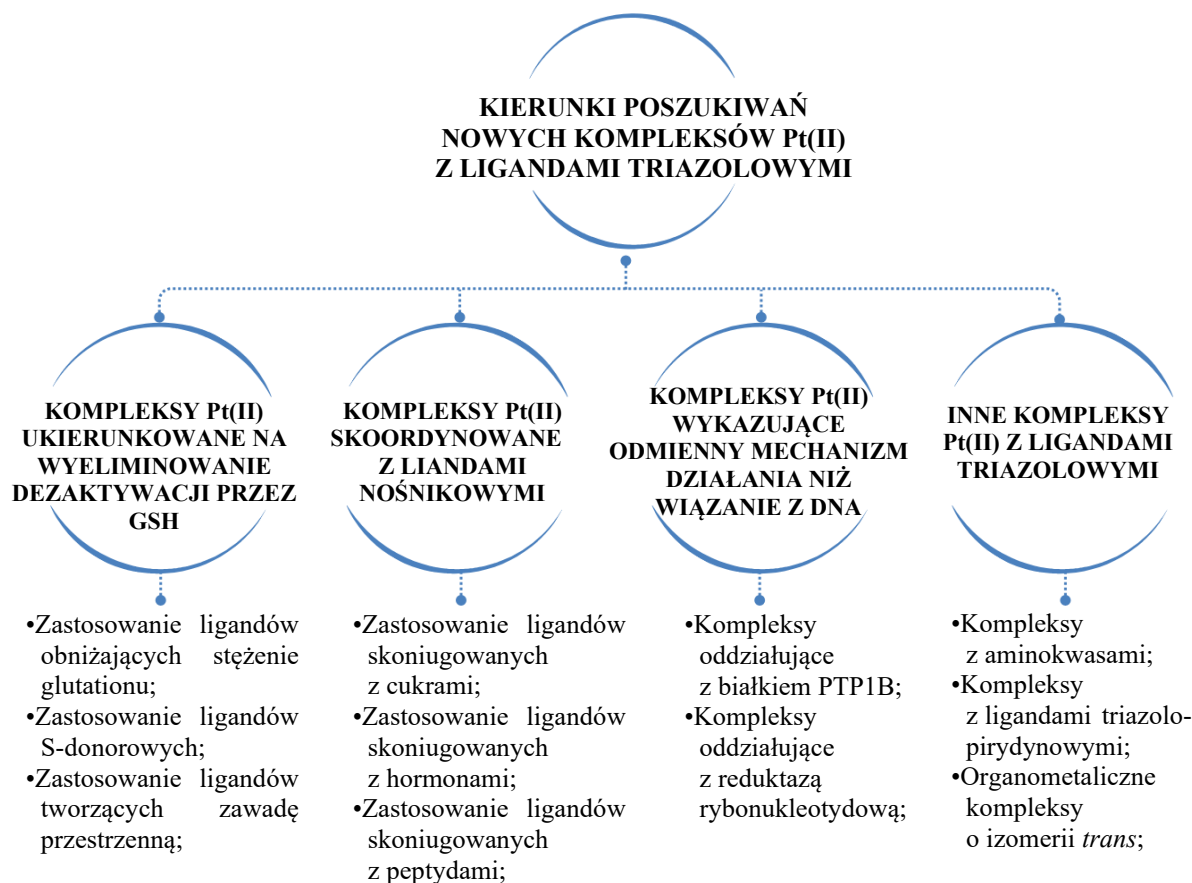
nie zachodzi bez udziału 9EtG. Ponadto, podstawienie pierwszej cząsteczki 9EtG powoduje obrót wokół osi Pt-N2, generujący zerwanie wiązania wodorowego (amoniak-N3) (Rys. 7).<sup>76</sup>



Rys. 7 Schematyczne przedstawienie migracji wiązania koordynacyjnego podczas reakcji dijadrowego kompleksu Pt(II) z 9EtG w roztworze wodnym.<sup>76</sup>

#### 4. Związki koordynacyjne platyny(II) z ligandami zawierającymi pierścień triazolowy

W niniejszym rozdziale przedstawione zostaną przykłady związków koordynacyjnych platyny(II) z ligandami zawierającymi pierścień triazolowy, o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Na podstawie prac naukowych opublikowanych w latach 2010 - 2025 określono główne kierunki poszukiwań w tym obszarze badawczym (Rys. 8). Do zestawienia wybrano jedynie te związki kompleksowe, dla których przebadano aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych. Przedstawiono zarówno kompleksy Pt(II), w których pierścień triazolowy tworzy wiązanie koordynacyjne, jak i takie, w których stanowi część bardziej rozbudowanego liganda skoordynowanego przez inne atomy donorowe.



Rys. 8 Główne kierunki poszukiwań związków kompleksowych platyny(II) z ligandami triazolowymi.

## 4.1 Kompleksy platyny(II) zaprojektowane w celu ograniczenia ich dezaktywacji przez glutation

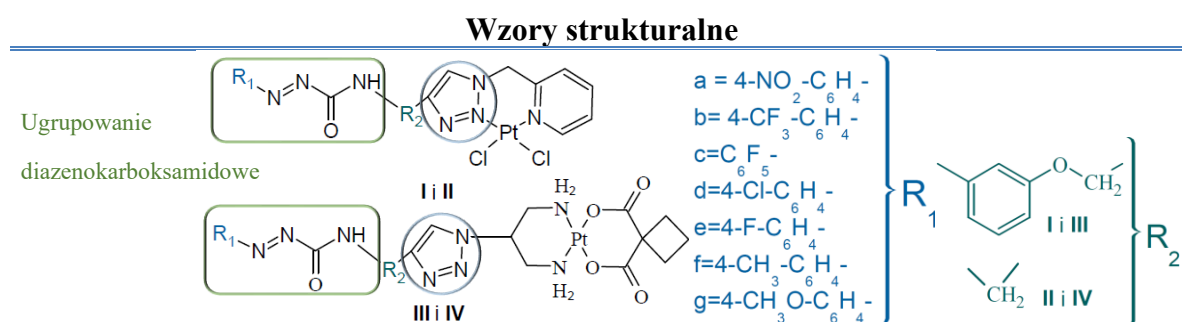
### 4.1.1 Zastosowanie ligandów obniżających stężenie glutationu

W terapii chorób nowotworowych powszechne jest leczenie skojarzone. Taki schemat umożliwia jednoczesne oddziaływanie na wiele celów, co w konsekwencji zwiększa efektywności i/lub zmniejsza wymaganą dawkę. Alternatywą dla tego schematu leczenia może okazać się zastosowanie tzw. leków hybrydowych, składających się z dwóch farmaceutyków związanych kowalencyjnie. Stojanovic i współpracownicy (2013 r.) zainspirowani takim podejściem zsyntezowali serię związków kompleksowych platyny(II) (kompleksy I - IV) z podstawionym ugrupowaniem diazenokarboksyamidowym (podstawniki a - g) (Tab. 2). Wcześniej udowodniono, że diazenokarboksyamidy charakteryzują się cytotoksycznością wobec komórek nowotworowych, synergistycznym działaniem z cisplatyną oraz aktywnością polegającą na obniżaniu stężenia GSH.<sup>27</sup>

Ponadto wykazano, że jednoczesne zastosowanie cisplatyny i diazenokarboksamidów powoduje wyeliminowanie nabytej oporności nowotworów.<sup>77</sup>

Badanie potencjału cytotoksycznego dowiodło, że wszystkie zsyntezowane kompleksy Pt(II) charakteryzują się niską aktywnością w tym kierunku (Tab. 2), co może być konsekwencją ich słabej rozpuszczalności w wodzie. Z kolei nieskoordynowane ligandy przejawiały większą cytotoksyczność ( $IC_{50} = 22,33 \mu M$  i  $162,40 \mu M$ ) od wszystkich przebadanych kompleksów z wyjątkiem IIa (Tab. 2).

Tab. 2 Związki kompleksowe platyny(II) z ugrupowaniem diazenokarboksyamidowym.<sup>27</sup>



### Otoczenie koordynacyjne Pt(II)

Kompleksy typu I i II	Kompleksy typu III i IV
<ul style="list-style-type: none"> <li>•N,N-chelatujące ugrupowanie pikolilo-triazolowe,</li> <li>•dwa jony chlorkowe;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•N,N-chelatujące ugrupowanie propano-diaminowe,</li> <li>•O,O-chelatujący CBDC;</li> </ul>

### Aktywność cytotoksyczna in vitro<sup>a</sup> ( $IC_{50}$ [ $\mu M$ ]) wobec linii komórkowej HeLa<sup>b</sup>

Ia-Id, IId, IIe	Ia	Ib	IIIa, IIIb, IVf	IId	IIe	Vg	cis-Pt <sup>c</sup>	karbo-Pt <sup>d</sup>
>300	7	77	>1000	14	49	90	16	444,1

<sup>a</sup> po 72 h inkubacji komórek z kompleksami;

<sup>b</sup> HeLa - ludzka linia komórkowa nowotworu szyjki macicy;

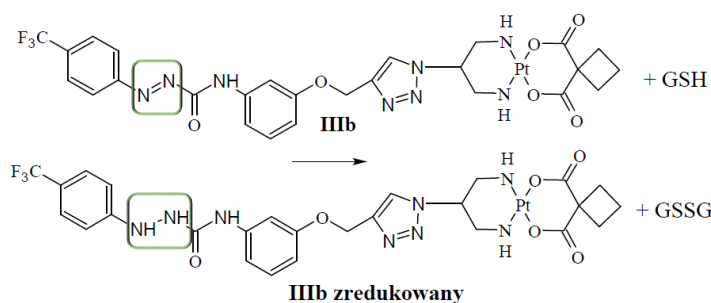
<sup>c</sup> cis-Pt = cisplatyna;

<sup>d</sup> karbo-Pt = karboplatyna;

W zaprojektowanych przez Stojanovic związkach koordynacyjnych mechanizm obniżenia dezaktywacji

kompleksów Pt(II) przez GSH opiera się o redukcję ugrupowania

diazenokarboksamidowego do semikarbazydu, podczas gdy GSH utlenia się do disiarczku glutationu



Rys. 9 Schemat redukcji GSH przez kompleks IIIb.

(GSSG) (Rys. 9). W dimerze GSSG powstaje mostek dwusiarczkowy między grupami

tiolowymi, w konsekwencji brak wolnych grup -SH uniemożliwia wiązanie się peptydu z centrum platyny(II). Na podstawie analiz NMR i MS ESI wykazano, że kompleksy Pt(II) z diazenokarboksyamidem zachowują właściwości utleniające wobec glutationu na równi z nieskoordynowanym ligandem.<sup>27</sup>

#### 4.1.2 Zastosowanie ligandów tworzących zawadę przestrzenną

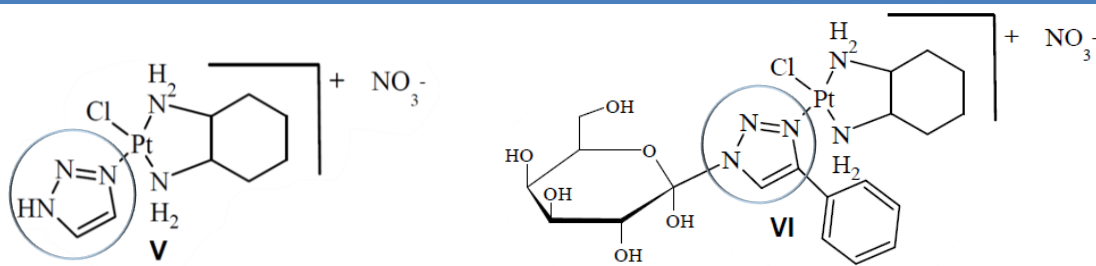
Li i współpracownicy (2021 r.) zsyntezowali dwie kationowe monofunkcyjne pochodne oksaliplatyny z ligandami tworzącymi zawadę przestrzenną (Tab. 3). Zaprojektowanie kompleksów o takiej strukturze miało na celu utrzymanie profilu cytotoksycznego kompleksów platyny(II) z DACH, przy jednoczesnej modyfikacji oksaliplatyny w bardziej rozpuszczalny w wodzie kompleks kationowy. W konsekwencji otrzymano związki koordynacyjne, których rozpuszczalność w wodzie (rozp.<sub>v i IV</sub> = 43,45 i 19,14 mg/ml) była znacznie większa niż cisplatyny (rozp.<sub>cis-Pt</sub> = 6,16 mg/ml) i oksaliplatyny (rozp.<sub>ox-Pt</sub> = 1,03 mg/ml).<sup>10</sup>

Spośród kompleksów największą cytotoksycznością wykazał się związek VI, który był aktywny zarówno względem komórek wrażliwych jak i opornych na leczenie oksaliplatyną, jednocześnie nie generując toksyczności względem komórek prawidłowych (Tab. 3). Natomiast wolne ligandy (1,2,3-triazol i 1-β-D-glukopiranozylo-4-fenyl-1H-1,2,3-triazol) nie obniżały przeżywalności komórek ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ). Ponadto kompleks VI zachował swoją aktywność cytotoksyczną w modelu badań *in vivo* względem komórek HT29/oxa (inhibicja wzrostu guza o 64,9 % vs. 30,4 % po zastosowaniu oksaliplatyny). Warto nadmienić, że różnice w skuteczności oksaliplatyny i kompleksu VI obserwowane w badaniu *in vivo* były bezpośrednio skorelowane z wewnątrzkomórkowymi stężeniami związków.<sup>10</sup>

Kolejną zaletą kompleksu VI jest zmniejszona reaktywność względem GSH w porównaniu z oksaliplatyną. Wykazano także, że kompleks VI oddziałuje z DNA, a analiza reaktywności z guanozyno-5'-monofosforanem (5'GMP) potwierdziła, szybsze powstawanie adduktów VI-5'GMP (7 h) niż oksaliplatyna-5'GMP (25 h).<sup>10</sup>

Tab. 3 Związki kompleksowe platyny(II) z 1,2,3-triazolem i 1-β-D-glukopiranozylo-4-fenyl-1H-1,2,3-triazolem.<sup>10</sup>

### Wzory strukturalne



### Otoczenie koordynacyjne Pt(II)

- N,N-chelatujący ligand DACH,
- monodentatny N-donorowy triazol,
- jon chlorkowy;

### Aktywność cytotoksyczna *in vitro*<sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> [μM])

Związek	Linia komórkowa				
	BEAS-2B-CM <sup>b</sup>	HepG2 <sup>b</sup>	Mel-RM <sup>b</sup>	HT29 <sup>b</sup>	HT29/oxa <sup>b</sup>
V	>200	>200	>200	39,63	155,22
VI	>200	>200	<b>22,56</b>	<b>9,77</b>	<b>11,12</b>
cis-Pt	7,89	9,90	4,72	26,62	248,62
ox-Pt <sup>c</sup>	12,54	45,19	21,14	6,32	335,34

<sup>a</sup> po 72 h inkubacji komórek z kompleksami;

<sup>b</sup> BEAS-2B-CM - ludzka linia komórkowa prawidłowa nabłonka oskrzeli; HepG2 - ludzka linia komórkowa nowotworu wątroby; Mel-RM - ludzka linia komórkowa czerniaka; HT29 - ludzka linia komórkowa nowotworu jelita grubego; HT-29/oxa - ludzka linia komórkowa nowotworu jelita grubego opornego na oksaliplatynę;

<sup>c</sup> ox-Pt = oksaliplatyna;

### 4.1.3 Zastosowanie ligandów S-donorowych

Inny sposób obniżenia reaktywności kompleksów platyny(II) względem GSH i zmniejszenia ich toksyczności wobec komórek prawidłowych zaproponował Jakubowski i współpracownicy (2018 r.), którzy zsyntezowali cztery karboksylanowe kompleksy platyny(II) z S-donorową cząsteczką DMSO (Tab. 4).<sup>78</sup> Dwa najbardziej lipofilowe kompleksy (IX i X) wykazały aktywność *in vitro* względem komórek nowotworowych A549 podobną do cisplatyny, przy jednocześnie mniejszej toksyczności względem prawidłowych komórek mysich fibroblastów (Tab. 4). Ponadto nowo otrzymane związki koordynacyjne wykazywały większą podatność na hydrolizę ( $K_1(\text{solv}) = 2,81 - 5,93 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) niż cisplatyna ( $K_1(\text{solv}) = 0,52 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ), a także mniejsze powinowactwo do glutationu w porównaniu z cisplatyną i karboplatyną.<sup>78</sup>

Tab. 4 Karboksylanowe kompleksy platyny(II) z *S*-donorową cząsteczką DMSO. <sup>78</sup>

Wzory strukturalne	Otoczenie koordynacyjne Pt(II)	
	VII i IX	VIII i X
<p>VII i IX VIII i X VII i VIII R = -CH<sub>3</sub> IX i X R = </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•N-donorowa triazolopirymidyna skoordynowana przez pierścień tiazolowy,</li> <li>•O,O-chelatujący malonian;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•N-donorowa triazolopirymidyna skoordynowana przez pierścień tiazolowy,</li> <li>•O,O-chelatujący ligand CBDC;</li> </ul>

#### Aktywność cytotoksyczna *in vitro* <sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> [μM])

Linia komórkowa	Związek					
	VII	VIII	IX	X	cis-Pt	karbo-Pt
A549 <sup>b</sup>	47,2	39,9	<b>10,1</b>	<b>15,4</b>	9,0	>100
BALB3/T3 <sup>b</sup>	>100	35,1	<b>37,1</b>	<b>40,5</b>	3,2	14,3

<sup>a</sup> po 24 h inkubacji komórek z kompleksami;

<sup>b</sup> A549 - ludzka linia komórkowa nowotworu płuca, A2780 - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika; BALB3/T3 - mysia linia komórkowa prawidłowych fibroblastów;

## 4.2 Kompleksy platyny(II) z bioaktywnymi ligandami nośnikowymi

Toksyczność kompleksów Pt(II) może zostać zniwelowana poprzez poprawę selektywności wychwytu leku przez komórki nowotworowe. Jedną ze strategii na zwiększenie stężenia leku w komórkach nowotworowych jest tworzenie koniugatów platyny z ligandami nośnikowymi np. peptydami, cukrami, czy hormonami. <sup>79</sup>

### 4.2.1 Ligandy skoniugowane z peptydami

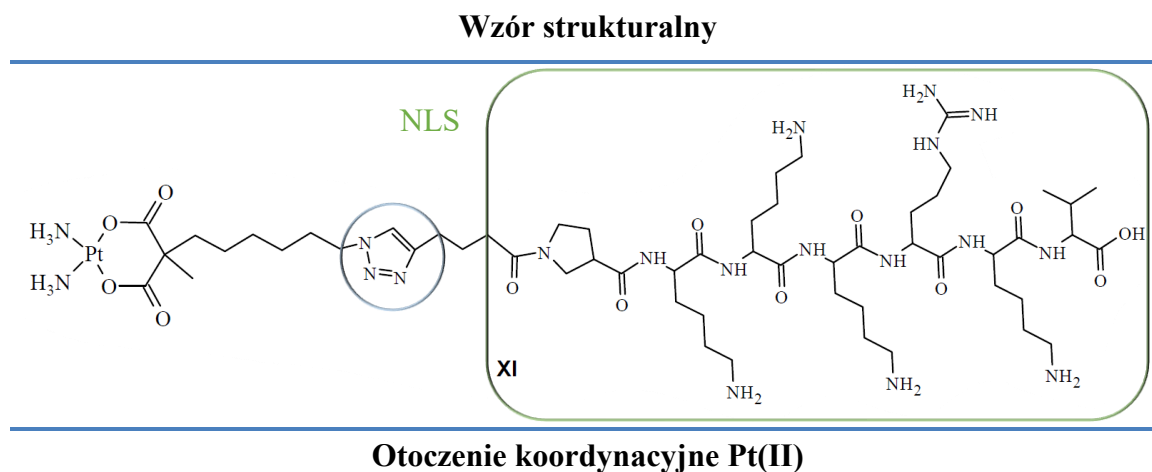
Włodarczyk i współpracownicy (2018 r.) otrzymali pochodną karboplatyny z dużym antygenem T wirusa SV40 (Tab. 5). Użyty peptyd posiadał sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), czyli sekwencję aminokwasową rozpoznawaną przez nośniki białkowe - importyny, co umożliwił transport do jądra komórkowego.

Z analizy potencjału cytotoksycznego wynika, że kompleks XI obniża żywotność wszystkich linii komórek nowotworowych, z wyjątkiem OV-90w, w większym stopniu niż karboplatyna (Tab. 5). Natomiast nieskoordynowany NLS w analogicznych stężeniach nie generuje zmian w żywotności komórek (%przeżywalności = 80 - 100%). <sup>79</sup>

Dodatkowo badania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej wykazały, że kompleks XI zarówno skutecznie przenika przez błonę komórkową i jądrową i zostaje równomiernie rozprowadzony w cytoplazmie i jądrze komórek nowotworowych CP-70.

Potwierdza to, że peptyd NLS wnika do obu przedziałów subkomórkowych i prawdopodobnie dlatego jest skutecznym nośnikiem małych cząsteczek leku. Co więcej, kompleks ten charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie (w stężeniu 35 mM jest rozpuszczalny całkowicie).<sup>79</sup>

Tab. 5 Kompleks platyny(II) z peptydem NLS.<sup>79</sup>



- dwa ligandy aminowe,
- O,O-chelatujący CBDC z podstawnikiem NLS;

**Aktywność cytotoksyczna *in vitro*<sup>a</sup> (% przeżywalności [%])**

Związek	Linia komórkowa					
	A2780 <sup>b</sup>	TOV-21G <sup>b</sup>	ES-2 <sup>b</sup>	CP-70 <sup>b</sup>	SKOV3 <sup>b</sup>	OV-90 <sup>b</sup>
XI	40	50	75	60	45	70
karbo-Pt	75	60	80	70	60	55

<sup>a</sup> po 72 h inkubacji komórek z roztworami kompleksów o stężeniach: 24,6 μM (A2780); 52,8 μM (CP70); 56,6 μM (TOV-21G); 56,6 μM (SKOV3); 18,4 μM (ES-2); 59,0 μM (OV-90);

<sup>b</sup> TOV21-G - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika; ES-2 - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika; CP-70 - ludzka linia komórkowa nowotworowa jajnika; SKOV3 - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika; OV-90 - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika;

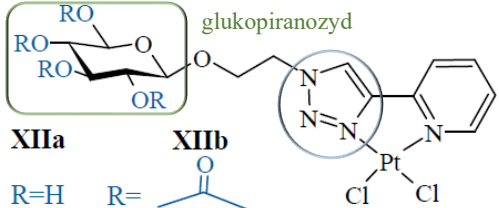

#### 4.2.2 Ligandy skoniugowane z cukrami

Niedotlenione komórki nowotworowe w celu wytworzenia ATP często opierają swój metabolizm na glikolizie, czyli beztlenowym rozkładzie glukozy. W konsekwencji takie komórki wykazują zwiększony wychwyty glukozy. Kierując się tymi przesłankami Yano i współpracownicy (2012 r.) zsyntezowali dwa związki koordynacyjne platyny(II) z ligandami triazolo-pirydynowymi podstawionymi glukopiranozydem (Tab. 6).<sup>80</sup>

Analiza potencjału cytotoksycznego przeprowadzona wobec komórek HeLa, dowiodła, że oba kompleksy charakteryzują się mniejszą aktywnością niż cisplatyna

(Tab. 6). Ponadto, niepożądanym parametrem była niska rozpuszczalność obu kompleksów w wodzie, która uniemożliwiła poszerzenie badań biologicznych.<sup>80</sup>

Tab. 6 Związki kompleksowe platyny(II) z triazolo-pirydynowymi ligandami podstawionymi glukopiranozydem.<sup>80</sup>

Wzory strukturalne	Otoczenie koordynacyjne Pt(II)	Aktywność cytotoksyczna <i>in vitro</i> <sup>a</sup> wobec linii komórkowej HeLa (%przeżywalności [%])		
 <p>XIIa      XIIb R=H      R= </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•N,N-chelatujące ugrupowanie triazolo-pirydynowe,</li> <li>•jon chlorkowy;</li> </ul>	XIIa	XXIIb	cis-Pt
		65	80	15

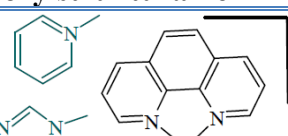
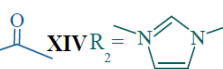

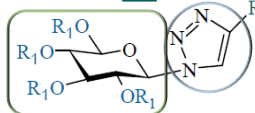
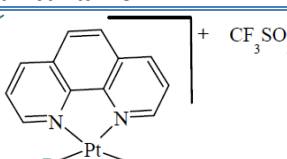
<sup>a</sup> po 72 h inkubacji komórek z roztworami kompleksów o stężeniu  $1 \times 10^{-4}$  M;

Z kolei Annunziata i współpracownicy (2021 r.) zsyntezowali serię związków kompleksowych platyny(II) z triazolowymi ligandami skoniugowanymi z glukozą (Tab. 7).<sup>81</sup>

Z badania właściwości cytotoksycznych wynika, że związki koordynacyjne XIIIa - XIVb generują wyższe efekty cytotoksyczne (Tab. 7) niż odpowiadające im nieskoordynowane ligandy ( $IC_{50}$  = od 2 do  $>200$   $\mu$ M). Największą aktywnością w tym kierunku, spośród nowo otrzymanych kompleksów, charakteryzuje się XIVb (Tab. 7). Analizę cytotoksyczności powtórzono po inkubacji komórek A431 z kwercytną - inhibitorem transporterów glukozy (GLUT). Jednak nie zaobserwowano zmiany w cytotoksyczności, co sugeruje, że receptory GLUT nie biorą udziału w transporcie kompleksu. Natomiast autorzy wykazali, że otrzymane związki koordynacyjne oddziałują z DNA poprzez interkalację.<sup>81</sup>

Warto tu jednak nadmienić, że znane są kompleksy Pt(II) z ligandami skoniugowanymi z cukrami, które zmniejszają swoją cytotoksyczność względem komórek inkubowanych z kwercytną, a ich transport do wnętrza komórek zachodzi przez transporter GLUT.<sup>82,83</sup>

Tab. 7 Kompleksy platyny(II) z triazolowymi ligandami podstawionymi glukozą.<sup>81</sup>

Wzory strukturalne		Otoczenie koordynacyjne Pt(II)	
<p>a <math>R_1=H</math> XIII <math>R_2=</math> </p> <p>b <math>R_1=</math>  XIV <math>R_2=</math> </p> <p>glukoza </p>	 + $CF_3SO_3^-$	XII	XIV
		<ul style="list-style-type: none"> <li>•N,N-chelatująca 1,10-fenantrolina,</li> <li>•N-donorowa pirydyna,</li> <li>•grupa metylowa;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•N,N-chelatująca 1,10-fenantrolina,</li> <li>•N-donorowy lub imidazol,</li> <li>•grupa metylowa;</li> </ul>

#### Aktywność cytotoksyczna *in vitro*<sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> [μM])

Związek	Linia komórkowa			
	HaCaT <sup>b</sup>	A431 <sup>b</sup>	H9c2 <sup>b</sup>	MCF-7 <sup>b</sup>
XIIIa	66	12	22	35
XIVa	>200	>200	>200	>200
XIVb	27	16	53	43
cis-Pt	6,6	39	8	18

<sup>a</sup> po 48 h inkubacji komórek z kompleksami;

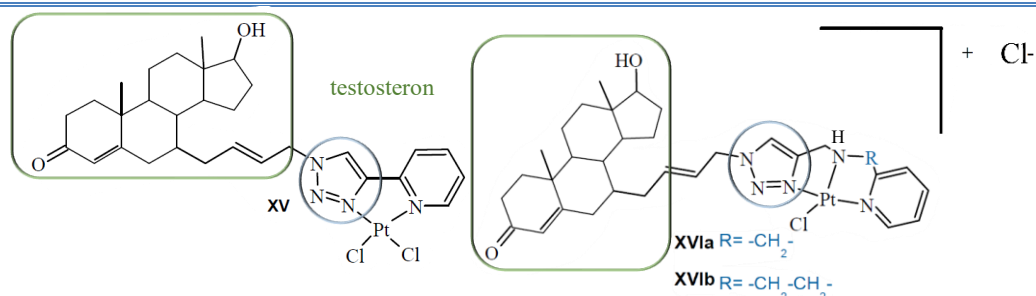
<sup>b</sup> HaCaT - ludzka linia komórkowa normalnych keratynocytów; A431 - ludzka linia komórkowa nowotworu naskórka; H9c2 - prawidłowa linia komórkowa mioblastów komorowych zarodkowych serc szczurzych; MCF-7 - ludzka linia komórkowa nowotworu piersi zależnego od hormonów;

### 4.2.3 Ligandy skoniungowane z hormonami

Ouellette i współpracownicy (2019 r.) zsyntezowali trzy nowe związki koordynacyjne platyny(II) skoordynowane z triazolem skoniungowanym z testosteronem (Tab. 8). Ich zdaniem, włączenie do sfery koordynacyjnej ligandów zawierających w swojej strukturze testosteron może przełożyć się na powinowactwo do receptorów androgenowych, których poziom w komórkach nowotworowych raka prostaty jest podwyższony. Największy efekt cytotoksyczny, spośród wszystkich przebadanych związków, wywołał kompleks XV (Tab. 8). Warto podkreślić, że związek ten był bardziej aktywny wobec komórek raka prostaty zależnego od hormonów w porównaniu do komórek raka prostaty niezależnego od hormonów (Tab. 8). Jednocześnie związek XV był mało aktywny zarówno w przypadku nowotworowych komórek HT-29, jak i prawidłowych HaCaT. Niekorzystnym parametrem była niska rozpuszczalność kompleksów Pt(II) w wodzie. Nieskoordynowane ligandy charakteryzowały się większym lub porównywalnym potencjałem cytotoksycznym (IC<sub>50</sub> = od 6,3 do > 50 μM) z kompleksami XXVIa i XVIb (Tab. 8).<sup>84</sup>

Tab. 8 Kompleksy platyny(II) z ligandami skoniungowanymi z testosteronem.

### Wzory strukturalne



### Otoczenie koordynacyjne Pt(II)

XV	XVI
<ul style="list-style-type: none"> <li>•N,N-chelatujące ugrupowanie triazolo-pirydynowe,</li> <li>•dwa jony chlorkowe;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•N,N,N-chelatujące ugrupowanie triazolo-amino-pirydynowe,</li> <li>• jon chlorkowy;</li> </ul>

### Aktywność cytotoksyczna *in vitro*<sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> [μM])

Związek	Linia komórkowa				
	LNCaP (AR+) <sup>b</sup>	PC3 (AR-) <sup>b</sup>	DU145 (AR-) <sup>d</sup>	HT29 <sup>e</sup>	HaCat <sup>f</sup>
XV	2,2	13,3	8,8	>25	>25
XVIa, XVIb	>25	>25	>25	>25	>25
cis-Pt	2,1	0,5	1,0	1,3	5,1

<sup>a</sup> po 24 h inkubacji komórek z kompleksami;

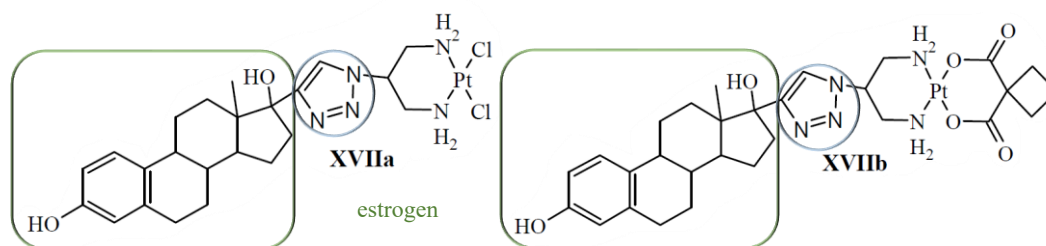
<sup>b</sup> LNCaP (AR+) - ludzka linia komórkowa nowotworu prostaty zależnego od hormonów; PC3 (AR-) - ludzka linia komórkowa nowotworu prostaty niezależnego od hormonów; DU145 (AR-) - ludzka linia komórkowa nowotworu prostaty niezależnego od hormonów;

Natomiast w tzw. hormonowrażliwym (ER+) raku piersi, jajników, jelita grubego i prostaty, obserwuje się nadekspresję receptorów estrogenowych (ER). W związku z tym, zaprojektowanie kompleksów skoniungowanych z estrogenami może stanowić interesujący kierunek badawczy. Kitteringham i współpracownicy (2019 r.) zsyntezowali dichlorkowy i cyklobutano-1,1-dikarboksylanowy kompleks platyny(II) z triazolo-pirydyną skoniungowaną z estradiolem (Tab. 9).<sup>85</sup>

Ocena właściwości cytotoksycznych kompleksów wykazała, że oba zsyntezowane związki są znacznie bardziej aktywne cytotoksycznie w porównaniu do cisplatyny i karboplatyny w hodowli 2D i generują ok. 30-krotnie wyższą cytotoksyczność względem komórek raka ER+ w porównaniu z referencyjną linią raka jelita grubego ER- (Tab. 9). Zarówno kompleks XVIIa jak i XVIIb zachowały swoją aktywność przeciwnowotworową w modelu hodowli 3D komórek nowotworu jajnika i zmniejszyły żywotność sferoidów komórek A2780 odpowiednio ok. 9-krotnie i 5-krotnie bardziej w porównaniu z cisplatyną (IC<sub>50</sub> XVIIa i XVIIb = 12,41 μM i 20,1 μM vs. IC<sub>50</sub> cis-Pt = 111,6 μM).<sup>85</sup>

Tab. 9 Kompleksy platyny(II) z ligandami skoniungowanymi z estradiolem. <sup>85</sup>

### Wzory strukturalne



### Otoczenie koordynacyjne Pt(II)

XVIIa	XVIIb
<ul style="list-style-type: none"> <li>•N,N-chelatujące ugrupowanie amino-propanowe,</li> <li>•dwa jony chlorkowe;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•N,N-chelatujące ugrupowanie amino-propanowe,</li> <li>•O,O-chelatujący CBDC;</li> </ul>

### Aktywność cytotoksyczna *in vitro* <sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> [μm])

Związek	Linia komórkowa				
	A2780	2008 <sup>b</sup>	A431 <sup>b</sup>	MCF-7	HCT-15 <sup>b</sup>
XVIIa	0,01	0,09	0,03	0,01	0,4
XVIIb	0,1	0,7	0,5	0,3	1,8
cis-Pt	2,6	2,2	1,7	7,6	13,9
karbo-Pt	3,6	5,8	12,3	>100	>100

<sup>a</sup> po 72 h inkubacji komórek z kompleksami;

<sup>b</sup> 2008 - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika; HCT-15 - ludzka linia komórkowa nowotworu jelita grubego;

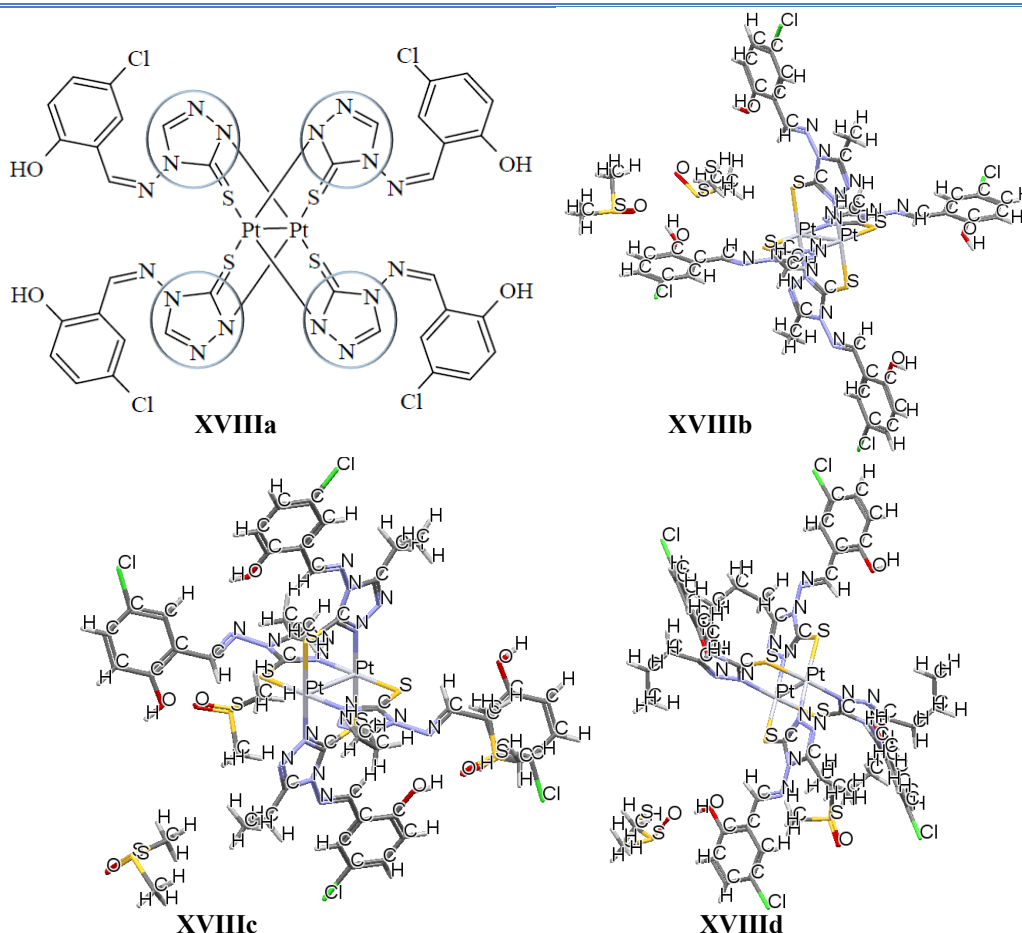
## 4.3 Kompleksy platyny(II) ukierunkowane na odmienny mechanizm działania niż wiązanie z DNA

### 4.3.1 Kompleksy oddziałujące z białkami PTP1B

Dijądrowe kompleksy platyny(II) to nowa klasa potencjalnych przeciwnowotworowych związków koordynacyjnych. Kompleksy te podobnie jak cisplatyna, preferencyjnie tworzą wewnątrzniowe wiązania krzyżowe z sąsiadującymi ze sobą guaninami, jednak coraz więcej badań wskazuje, że nukleozasady nie są jedynymi celami biologicznymi tych związków. Mogą one być zaangażowane w interakcje z innymi biocząsteczkami, szczególnie enzymami i białkami. Wang i współpracownicy (2021 r.) zsyntezowali 4 dijądrowe związki kompleksowe platyny(II) z pochodnymi 1,2,4-triazolu, pełniącymi rolę ligandów mostkujących (Tab. 10). <sup>86</sup>

Tab. 10 Diodrowe kompleksy platyny(II) z pochodnymi 1,2,4-triazolu pełniącymi rolę ligandów mostkujących.<sup>86</sup>

### Wzór strukturalny / struktury krystaliczne



### Otoczenie koordynacyjne Pt(II)

Dwa centra platyny(II) połączone czterema ligandami triazolowymi przez atom azotu ugrupowania triazolowego i cztery atomy siarki podstawnika;

### Aktywność cytotoksyczna *in vitro*<sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> [μM])

Linia komórkowa	Związek				
	XVIIIa	XVIIIb	XVIIIc	XVIIId	cis-Pt
MCF-7	39,8	48,5	<b>16,6</b>	48,7	6,3
HepG2	>50	16,6	<b>5,5</b>	28,2	5,9
A549	>50	>50	>50	>50	22,9
HI-7720 <sup>b</sup>	>50	>50	>50	>50	b.d. <sup>c</sup>

<sup>a</sup> po 48 h inkubacji komórek z kompleksami;

<sup>b</sup> HI-7720 - ludzka linia komórkowa białaczki;

<sup>c</sup> b.d. = brak danych;

Z analizy potencjału cytotoksycznego wynika, że największą aktywnością w tym kierunku charakteryzuje się kompleks XVIIIc (Tab. 10). Jednakże badanie oddziaływania z DNA wskazało na tworzenie bardzo słabych połączeń z tym biopolimerem, co sugeruje,

że interakcje z innymi celami biologicznymi są odpowiedzialne za antyproliferacyjne właściwości związku XVIIIc. Biorąc pod uwagę, że w komórkach MCF-7 obserwuje się nadekspresję białkowej fosfatazy tyrozynowej 1B (PTP1B), autorzy postanowili przebadać XVIIIc pod względem właściwości inhibitujących aktywność tego białka. Potwierdzono, że kompleks ten hamuje aktywność PTP1B ( $IC_{50} = 16 \mu M$ ) poprzez wiązanie z miejscami allosterycznymi, a stała wiązania wynosi  $5,28 \times 10^4 M^{-1}$ . Wyniki sugerują, że mechanizm antyproliferacyjny XVIIIc wobec komórek MCF-7 i HepG2 może być inny niż w przypadku cisplatyny.<sup>87</sup> Warto jednak nadmienić, że mechanizm działania oparty o inhibicję PTP1B nie jest domeną jedynie dijadrowych kompleksów o rozbudowanych strukturach. Yuan i współpracownicy w 2019 roku otrzymali znacznie prostszy pod względem strukturalnym, monofunkcyjny kompleks Pt(II) [PtHL(DMSO)Cl] (gdzie HL = 5-chlorosalicylidenoanilina), który wykazywał wyższą cytotoksyczność względem komórek MCF-7 ( $IC_{50} = 0,32$ ) niż cisplatyna ( $IC_{50} = 9,65$ ), ale znacznie mniejsze powinowactwo do DNA. Potwierdzono, że [PtHL(DMSO)Cl] hamuje aktywność PTP1B w większym stopniu ( $IC_{50} = 0,25 \mu M$ ) niż cisplatyna ( $IC_{50} = 1,48 \mu M$ ) i prawdopodobnie wiąże się z białkiem w miejscu allosterycznym.<sup>86</sup>

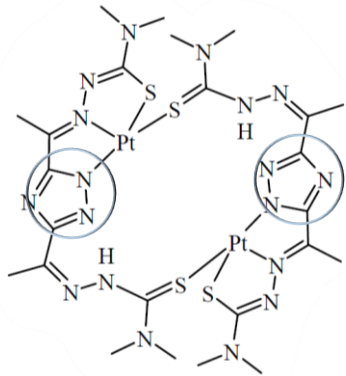
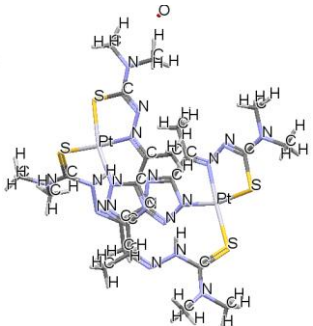
### 4.3.2 Kompleksy oddziałujące z reduktazą rybonukleotydową

W poszukiwaniu kompleksów Pt(II) o innym mechanizmie działania niż wiązanie z DNA szczególne zainteresowanie budzą związki ukierunkowane na reduktazę rybonukleotydową (RR), będącą enzymem niezbędnym do syntezy DNA. Potwierdzono korelację między aktywnością RR a szybkością wzrostu guzów nowotworowych. Za jedne z najskuteczniejszych inhibitorów RR uważane są  $\alpha$ -(N)-Heterocykliczne tiosemikarbazony, ((N)-TSC). Zainspirowani tymi doniesieniami naukowymi Matesanz i współpracownicy (2010 r.) zsyntezowali dwa ligandy 3,5-diacetylo-1,2,4-triazol-bis(<sup>4</sup>N-dimetylotiosemikarbazonowe) i ich dijadrowe kompleksy platyny(II) (Tab. 11).<sup>88</sup>

Związki oceniono pod kątem aktywności antyproliferacyjnej względem linii komórek nowotworowych i prawidłowych (Tab. 11), a współczynnik oporności (RF) (obliczony wg wzoru  $RF = (IC_{50}(A2780cisR))/(IC_{50}(A2780))$ ) pokazuje, że zarówno wolne ligandy jak i oba kompleksy omijają oporność na cisplatynę w komórkach A2780cisR ( $RF = 1,2 - 1,8$  vs.  $RF_{cis-Pt} = 10,7$ ). Badania nefrotoksyczności przeprowadzone na komórkach LLC-PK1 dowiodły, że zarówno kompleksy jak i wolne ligandy

(IC<sub>50</sub> >100 μM) generują bardzo niską nefrotoksyczością w stosunku do cisplatyny (Tab. 11).<sup>88</sup>

Tab. 11 Dijądrowe kompleksy z 3,5-diacetylo-1,2,4-triazolbis(<sup>4</sup>N-dimetylotiosemikarbazonem).<sup>88</sup>

Wzór strukturalny / struktura krystaliczna		Otoczenie koordynacyjne Pt(II)		
 <p><b>XIXa</b></p>	 <p><b>XIXb</b></p>	<p>Każde centrum Pt(II) skoordynowane jest z jednym atomem azotu pierścienia triazolowego, jednym atomem azotu ugrupowania iminowego i dwoma atomami siarki;</p>		
Aktywność cytotoksyczna in vitro (IC <sub>50</sub> [μM] <sup>a</sup> )				
Związek	Linia komórkowa			
	A2780	A2780cisR <sup>b</sup>	NCI-H460 <sup>b</sup>	LLC-PK1 <sup>b</sup>
XIXa	10	18	>100	20
XIXb	40	56	53,1	>100
cis-Pt	0,44	4,7	4,5	7,03

<sup>a</sup> po 48 h inkubacji komórek z kompleksami;

<sup>b</sup> A2780cisR - ludzka linia komórkowa nowotworowa jajnika opornego na cisplatynę; NCI-H460 - ludzka linia komórkowa ludzka linia komórkowa nowotworu płuca; LLC-PK1 - prawidłowa linia komórkowa nerki świni;

## 4.4 Inne związki kompleksowe platyny(II) z ligandami triazolowymi

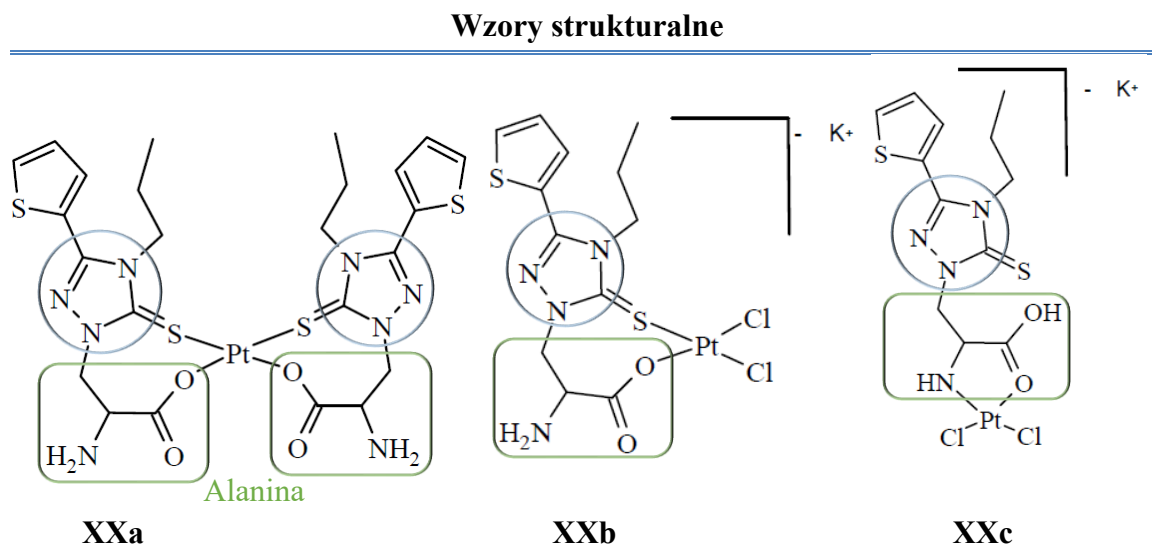
### 4.4.1 Kompleksy z aminokwasami

Riccardi i współpracownicy (2020 r.) zsyntezowali ligand na bazie alaniny (kwas (S)-2-amino-3-[4-propylo-3-(tiofen-2-yl)-5-tioakso-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-1-yl]propanowy) i serię związków kompleksowych platyny(II) z tym ligandem (Tab. 12).<sup>89</sup>

Analiza potencjału cytotoksycznego kompleksów i nieskoordynowanego liganda wykazała, że związek XXa (Tab. 12) i ligand (%przeżywalności = 85 - 100% przy stężeniu 50 μM) były mało aktywne wobec komórek nowotworowych, podczas gdy kompleksy XXb i XXc charakteryzowała umiarkowana cytotoksyczność wobec komórek A537 (Tab. 12). Badanie rodzaju śmierci komórek wykazało działanie nekrotyczne XXb i XXc na najbardziej wrażliwej linii komórek nowotworowych A375. Analiza oddziaływania z DNA dowiodła, że XXa, w odróżnieniu od XXb i XXc, nie tworzy wiązań

koordynacyjnych z mononuciowymi oligonukleotydami, co może być powodem braku jego aktywności cytotoksycznej.<sup>89</sup>

Tab. 12 Kompleksy platyny(II) z alaniną.<sup>89</sup>



<b>Otoczenie koordynacyjne Pt(II)</b>		
XXa	XXb	XXc
•dwa S,O-chelatujące ligandy;	•S,O-chelatujący ligand, •dwa jony chlorkowe;	•O,N-chelatujący ligand, •dwa jony chlorkowe;

<b>Aktywność cytotoksyczna <i>in vitro</i> <sup>a</sup> (%przeżywalności [%])</b>				
Linia komórkowa	Związek			
	XXa	XXb	XXc	cis-Pt
A375 <sup>b</sup>	85	65	65	25
HeLa	90	80	100	20
HDF <sup>b</sup>	100	100	100	65

<sup>a</sup> po inkubacji 48 h komórek z kompleksami o stężeniu: XXa-XXc 50 μM, cis-Pt 10 μM;

<sup>b</sup> A375 - ludzka linia komórkowa czerniaka; HDF - ludzka linia komórkowa prawidłowych fibroblastów skóry;

#### 4.4.2 Kompleksy z ligandami triazolo-pirydynowymi

Simona Rubino i współpracownicy (2016 r.) zsyntezowali trzy dichlorkowe kompleksy platyny(II) z monodentatnym oraz bidentatnym chelatującym ligandem tirazolo-pirydynowym (Tab. 13).<sup>90</sup>

Wstępna analiza aktywności cytotoksycznej związków koordynacyjnych wykazała, że kompleksy XXIIa i XXIIb generują nieznaczny efekt cytotoksyczny względem komórek nowotworowych (%przeżywalności = ~ 50 - 80% przy stężeniu 100 μM). Jedynie kompleks XXIIb redukował w istotnym stopniu przeżywalność komórkową, w konsekwencji badania nad tym związkiem poszerzono i wyznaczono parametr IC<sub>50</sub> (Tab. 13). Związek XXIIb był aktywny cytotoksycznie względem wszystkich badanych

komórek nowotworowych, jednocześnie nie wykazując toksyczności względem komórek prawidłowych CaCo-2 (%przeżywalności = ~ 90% przy stężeniu 100  $\mu\text{M}$ ). Wykazano, że śmierć komórek HepG2, MCF-7 i HCT116 zachodzi na drodze apoptozy.<sup>90</sup>

Tab. 13 Związki kompleksowe platyny(II) z triazolo-pirydyną.<sup>90</sup>

Wzory strukturalne			
		<p><b>a</b> R=C<sub>7</sub>F<sub>15</sub></p> <p><b>b</b> R=C<sub>3</sub>F<sub>7</sub></p>	
Otoczenie koordynacyjne Pt(II)			
XXI		XXII	
<ul style="list-style-type: none"> <li>•dwa monodentatne N-donorowe triazole,</li> <li>•dwa jony chlorkowe;</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>•N,N-chelatująca triazolo-pirydyna,</li> <li>•dwa jony chlorkowe;</li> </ul>	
Aktywność cytotoksyczna <i>in vitro</i> <sup>a</sup> (IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ])			
Związek	Linia komórkowa		
	HepG2	MCF-7	HCT116 <sup>b</sup>
XXIb	24,8	18,5	8,3
cis-Pt	50,0	8,1	9,1

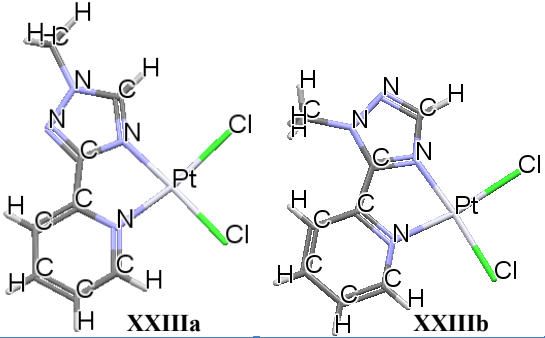
<sup>a</sup> po 24 h inkubacji komórek z kompleksami;

<sup>b</sup> HCT116 - ludzka linia komórkowa nowotworu jelita grubego;

Natomiast Yulia M. Ohorodnik i współpracownicy (2023 r.) zsyntezowali dwa dichlorkowe związki kompleksowe platyny(II) z N,N-chelatującą triazolo-pirydyną (Tab. 14).<sup>68</sup>

Związki koordynacyjne oceniono pod względem aktywności cytotoksycznej zarówno wobec komórek wrażliwych jak i opornych na działanie cisplatyny. Wykazano, że oba kompleksy generują większy efekt cytotoksyczny względem komórek niewrażliwych na cisplatynę (Tab. 14). Autorzy zaobserwowali, że kompleksy w roztworze DMSO szybko przechodzą proces solwolizy i postanowili pogłębić badania nad tym zagadnieniem. W przypadku związku XXIIIa utworzenie mieszaniny równowagowej nastąpiło po 4 godzinach i zawierała ona mniej niż 10% wolnego liganda, podczas gdy rozpad kompleksu XXIIIa trwał dłużej (ok. 20 godzin) przy wyższej szybkości solwolizy (mieszanina zawierała ok. 40% liganda). Te tendencje mogą być wyjaśnione wyższym efektem *trans* tworzonym przez ligand odpowiadający kompleksowi XXIIIb i przeszkodą steryczną występującą w związku XXIIIa. Słaba rozpuszczalność w wodzie i niska stabilność testowanych kompleksów uniemożliwiły ich dalsze badanie.<sup>68</sup>

Tab. 14 Kompleksy platyny(II) z triazolo-pirydyną.<sup>68</sup>

Struktury krystaliczne		Otoczenie koordynacyjne Pt(II)	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>•N,N-chelatującą triazolo-pirydyną,</li> <li>•dwa jony chlorkowe;</li> </ul>	
Aktywność cytotoksyczna <i>in vitro</i> <sup>a</sup> (IC <sub>50</sub> [μM])			
Linia komórkowa	Związek		
	XXIIIa	XXIIIb	cis-Pt
A2780	26	24	0,22
A2780cisR	6,1	20	4,3

<sup>a</sup> po 72 h inkubacji komórek z kompleksami;

#### 4.4.3 Organometaliczne kompleksy o izomerii *trans*

Klinicznie zarejestrowane do leczenia nowotworów kompleksy platyny(II) charakteryzuje izomeria *cis*, gdzie hydroliza jonów chlorkowych lub grupy karboksylanowej jest kluczowa dla aktywacji. Biorąc pod uwagę tę zależność przez dłuższy czas przewidywano, że związki koordynacyjne Pt(II) o geometrii *trans* nie będą wykazywały aktywności przeciwnowotworowej. Z tego powodu cytotoksyczność związków platyny(II) o takiej izomerii jest mniej eksplorowanym obszarem badań. Singh i współpracownicy po raz pierwszy zsyntezowali trzy metaloorganiczne kompleksy platyny(II) o izomerii *trans* z triazolem w strukturze (Tab. 15).<sup>91</sup>

Z analizy potencjału cytotoksycznego wynika, że wszystkie kompleksy charakteryzują się około 3 razy większą aktywnością niż cisplatyna (Tab. 15). Ponadto badanie cytoszkieletu i architektury jądrowej wskazuje na odmienny mechanizm generowania śmierci komórek po zastosowaniu nowo otrzymanych kompleksów niż cisplatyny. Zaobserwowano całkowite uszkodzenie jądra komórek z linii MG-63 po inkubacji z kompleksami XXIVa - XXIVc - sugerujący wyciekanie zdeintegrowanego DNA z jądra z powodu uszkodzenia błony jądrowej, co dowodzi uśmiercania komórek na drodze nekrozy. Dla porównania, leczenie cisplatyną spowodowało powiększenie komórek bez zmiany kształtu jądra. Potwierdzono także oddziaływanie kompleksów XXIVa - XXIVc z DNA, co obserwowane było jako degradacja kolistego jednoniciowego

DNA i zwiększenie intensywności prążków liniowego DNA. Sugeruje to, że związki te mogą przecinać koliste DNA, przekształcając je w liniowe DNA. <sup>91</sup>

Tab. 15 Organometaliczne kompleksy platyny(II) o izomerii trans. <sup>91</sup>

Wzory strukturalne / struktura krystaliczna		Otoczenie koordynacyjne Pt(II)		
<p>XXIVa R = </p> <p>XXIVb R = </p> <p>XXIVc</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>•grupa etynowa,</li> <li>•trietylofosfina,</li> <li>•jon jodkowy;</li> </ul>		
Cytotoksyczność <i>in vitro</i> <sup>a</sup> (IC <sub>50</sub> [μM])				
Linia komórkowa	Związek			
	XXIVa	XXIVb	XXIVc	cis-Pt
MG-63 <sup>b</sup>	18,05	13,74	16,47	44,64
MD-MB-231 <sup>b</sup>	16,61	22,47	16,78	>100
HDF	22,83	26,50	24,52	>100

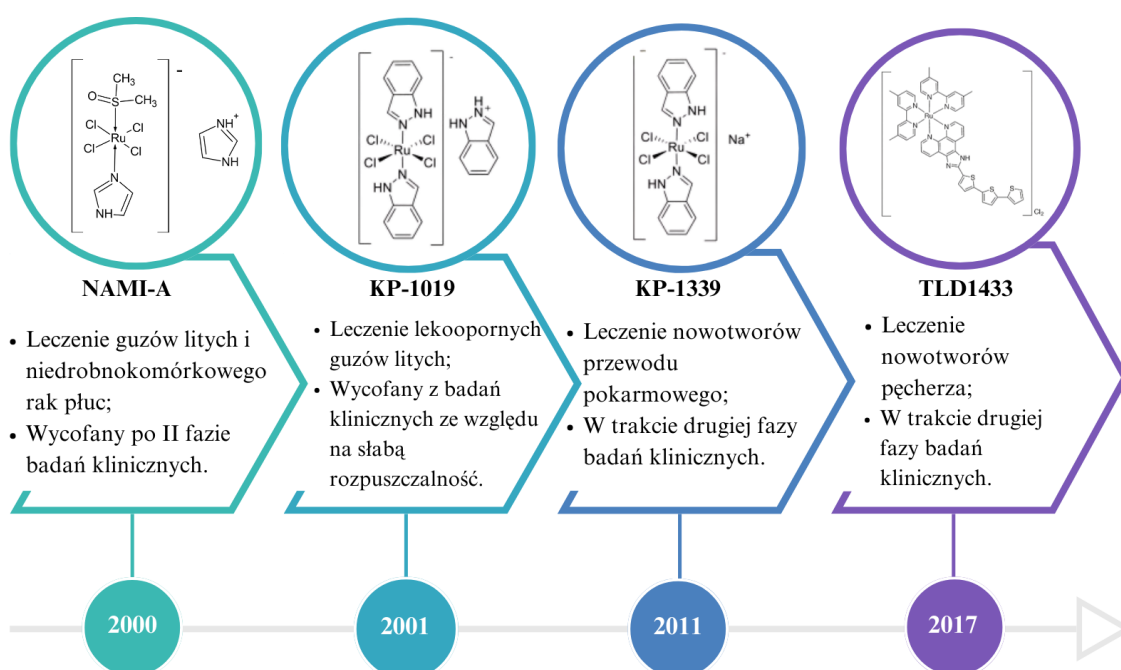
<sup>a</sup> po 24 h inkubacji komórek z kompleksami;

<sup>b</sup> MG-63 - ludzka linia komórkowa kostniakomięsaka; MD-MB-231 - ludzka linia komórkowa nowotworu piersi;

## 5. Związki koordynacyjne rutenu(II) - obiecująca alternatywa dla cytostatyków platyny(II)

Pomimo nieustającego zainteresowania naukowców projektowaniem przeciwnowotworowych kompleksów Pt(II), uważa się, że wymiana jonu centralnego kompleksu, może zniwelować liczne wady leków platyny(II). Jonem metalu, który zyskał szczególne zainteresowanie jest ruten(II)/(III). Wynika to z jego podobnych właściwości chemicznych i koordynacyjnych do atomów platyny(II), m.in. szybkość wymiany ligandów w kompleksach Ru(II) (w zakresie  $10^{-2}$  -  $10^{-3}$  s<sup>-1</sup>) jest podobna do tej w kompleksach Pt(II), co odpowiada średniej długości życia komórki. <sup>92</sup> Wiele związków rutenu charakteryzuje się mniejszą toksycznością niż leki platyny(II), a niektóre z nich są selektywne względem komórek nowotworowych. <sup>93-95</sup> Zjawiska te mogą wynikać z podobieństwa jonów rutenu do jonów żelaza i naśladowania ich w wiązaniu się z białkami. W konsekwencji nadmiernie ekspresjonowane receptory transferyny na komórkach nowotworowych mogą skutecznie dostarczać kompleksy Ru(III) do wnętrza komórek. <sup>92</sup>

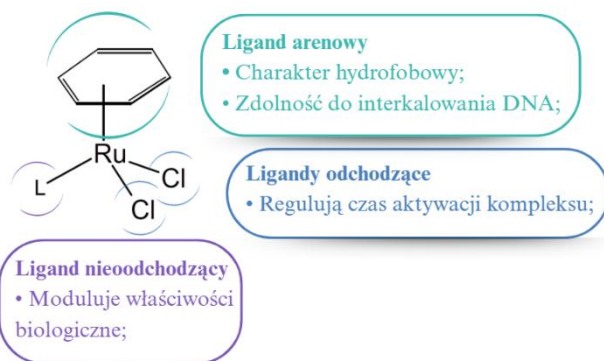
Zainteresowanie związkami koordynacyjnymi rutenu w ujęciu chemii leków rozpoczęło się wraz z odkryciem, że skoordynowanie ligandów charakterystycznych dla cisplatyny (jonów chlorkowych i cząsteczek amoniaku) z Ru(III), prowadzi do otrzymania kompleksów o aktywności przeciwnowotworowej (*fac*-[RuCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] i *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]Cl).<sup>96</sup> Kolejnym znaczącym krokiem było podstawienie ligandów aminowych dimetylosulfotlenkiem i imidazolem w NAMI-A (Rys. 10), co spowodowało pojawienie się aktywności antymetastatycznej<sup>97</sup> oraz wprowadzenie NAMI-A do badań klinicznych.<sup>98,99</sup> Następne modyfikacje struktury kompleksów rutenu, polegające na włączaniu kolejnych ligandów N-heterocyklicznych do sfery koordynacyjnej, poskutkowało wprowadzeniem trzech kolejnych kompleksów do badań klinicznych (KP-1019<sup>100,101</sup>, KP-1339<sup>102</sup>, TLD1433<sup>103</sup>) (Rys. 10).



Rys. 10 Kompleksy rutenu(III) w badaniach klinicznych.<sup>101-106</sup>

Obecnie jednym z kierunków poszukiwań rutenowych leków przeciwnowotworowych jest projektowanie związków koordynacyjnych rutenu(II) z ligandami arenowymi. Inspiracją do rozwoju tego obszaru chemii koordynacyjnej było odkrycie cytotoksycznych właściwości kompleksów rutenu z rodziny RAPTA, gdzie Ru(II) skoordynowany jest z arenem i 1,3,5-triaza-7-fosfatricyklo-[3.3.1.1]dekanem.<sup>104</sup> Kompleksy te charakteryzują się pseudooktaedryczną geometrią, w której ligand arenowy

zajmuje trzy miejsca koordynacyjne w oktaedrycznym otoczeniu, a pozostałe trzy mogą zostać podstawione przez ligandy monodentatne lub polidentatne chelatujące. W konsekwencji, kompleksy przybierają strukturę nazywaną „stołkiem do pianina” (ang. piano-stool), gdzie ligand arenowy tworzy „siedzisko”, a połączenie ligandów mono- lub bidentatnych tworzy trzy „nogi” (Rys. 11).<sup>92,104</sup>



Rys. 11 Struktura oraz rola ligandów w kompleksach rutenu(II) typu piano-stool.

Obecność ligandów arenowych może wpływać na zwiększony wychwytywanie związku przez komórki. Warto również zwrócić uwagę na możliwość dwukierunkowego oddziaływania arenowych kompleksów rutenu z DNA. Jony rutenu wiążą się preferencyjnie z atomem azotu N7 guaniny (podobnie jak cisplatyna), natomiast ugrupowania arenowe powodują dodatkowe istotne deformacje na skutek interkalacji DNA.<sup>105–107</sup> Ligandy odchodzące, którymi są zwykle jony chlorkowe, mogą wpływać na czas aktywacji kompleksu.<sup>108</sup> Natomiast w miejsce ligandów nieodchodzących można podstawić ugrupowanie o określonej aktywności biologicznej, np. pochodne imidazolu lub kwas etakrynowy mające na celu wyeliminowanie lekooporności.<sup>109</sup> Ze względu na hydrofobowość liganda arenowego i hydrofilowość jonu centralnego kompleksy te są amfifilowe,<sup>110,111</sup> co z jednej strony wpływa na rozpuszczalność w płynach ustrojowych, a z drugiej na przenikanie związków przez lipidowe błony komórkowe. Niewątpliwą zaletą w porównaniu do kompleksów Pt(II) jest fakt, że arenowe kompleksy Ru(II) są stosunkowo dobrze rozpuszczalne w wodzie.<sup>108</sup> Ponadto metaloorganiczne wiązanie Ru-aren charakteryzuje się stabilnością niezależnie od zmian pH i warunków fizjologicznych, a także jest odporne na warunki redoks.<sup>92</sup> Najczęściej stosowanymi ligandami arenowymi są benzen,<sup>108,110,112–114</sup> para-cymen,<sup>108,110,112,114–118</sup> bifenył,<sup>108,119–121</sup> dihydroantracen<sup>108,119,121</sup> i tetrahydroantracen.<sup>108,119,121</sup> Zauważalna jest tendencja, że cytotoksyczność *in vitro* kompleksów rutenu wzrasta wraz ze wzrostem wielkości liganda arenowego, przy zastosowaniu tego samego liganda nieodchodzącego.<sup>108,114,122,123</sup>

## 6. Arenowe związki koordynacyjne rutenu(II) z ligandami zawierającymi pierścień triazolowy

W niniejszym rozdziale przedstawiono przykłady arenowych związków koordynacyjnych rutenu(II) z ligandami zawierającymi pierścień triazolowy, o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, opublikowane w latach 2010 - 2025. Główne kierunki poszukiwań w tym obszarze badawczym przedstawiono na Rys. 12. Z zestawienia widać, że ten obszar badawczy jest eksplorowany przez naukowców w mniejszym stopniu niż poszukiwanie cytostatyków opartych na związkach koordynacyjnych platyny(II).



Rys. 12 Główne kierunki poszukiwań związków kompleksowych rutenu(II) z ligandami triazolowymi.

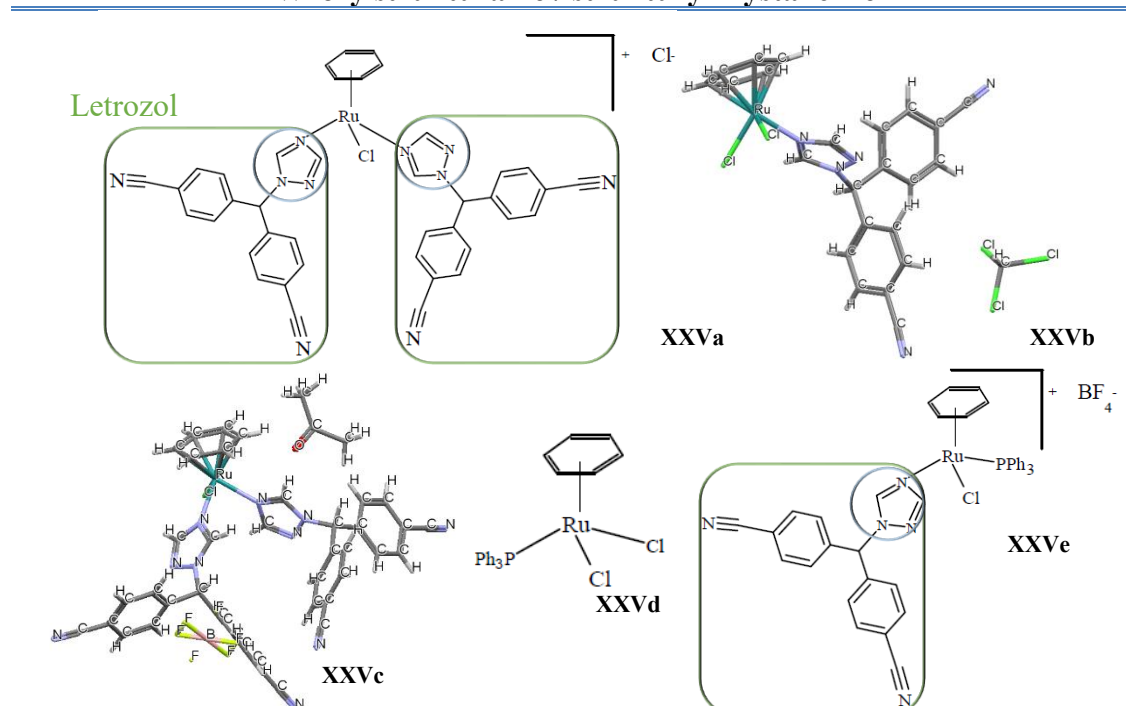
### 6.1 Kompleksy rutenu(II) skoordynowane z lekami

#### 6.1.1 Kompleksy rutenu(II) skoordynowane z letrozolem

Castonguay i współpracownicy (2012 r.) zsyntezowali serię związków koordynacyjnych rutenu(II) z letrozolem (Tab. 16). Naukowcy projektując te związki kierowali się połączeniem właściwości kompleksów Ru(II) do indukowania śmierci komórek nowotworowych poprzez wiązanie z DNA z antyproliferacyjnym działaniem letrozolu wobec komórek, które pozostały żywe.

Tab. 16 Arenowe kompleksy rutenu(II) z letrozolem.

Wzory strukturalne / struktury krystaliczne



Otoczenie koordynacyjne Ru(II)

XXVa i XXVc	XXVb	XXVd	XXVe
<ul style="list-style-type: none"> <li>•benzen,</li> <li>•dwa monodentatne N-donorowe ugrupowania triazolowe,</li> <li>•jon chlorkowy;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•benzen,</li> <li>•jedno monodentatne N-donorowe ugrupowanie triazolowe,</li> <li>•dwa jony chlorkowe;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•benzen,</li> <li>•monodentatna trifenylofosfina,</li> <li>•dwa jony chlorkowe;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•benzen,</li> <li>•jedno monodentatne N-donorowe ugrupowanie triazolowe,</li> <li>•trifenylofosfina,</li> <li>•jon chlorkowy;</li> </ul>

Aktywność cytotoksyczna *in vitro*<sup>a</sup> (%przeżywalności [%])

Linia komórkowa	Związek				
	XXVa	XXVc	XXVd	XXVe	letrozol
MCF-7	82	79	90	<b>62</b>	70
MCF-7 b.e.	85	95	71	<b>27</b>	30
U251N	100	100	90	<b>90</b>	90

<sup>a</sup> po 24 h inkubacji komórek z roztworami kompleksów o stężeniu 25  $\mu\text{M}$  i letrozolu o stężeniu 50  $\mu\text{M}$ ;

<sup>b</sup> MCF-7 b.e. - komórki MCF-7 hodowane bez estrogenu; U251N - ludzka linia komórkowa glejaka wielopostaciowego;

Związki koordynacyjne XXVa, XXVc, XXVd i XXVe przebadano pod kątem aktywności cytotoksycznej. Kompleks XXVe przejawiał szczególnie wysoką i selektywną cytotoksyczność względem komórek MCF-7 hodowanych w warunkach niedoboru estrogenu, większą niż letrozol (Tab. 16). Co więcej, związek ten indukował dwa razy większy efekt cytotoksyczny niż wynikałoby z addytywnego działania kompleksu rutenu

i letrozolu. Wykazano, że kluczową rolę w śmierci komórek indukowanej przez XXVe odgrywa autofagia. Żaden z badanych związków nie wykazał cytotoksyczności względem komórek U251N.<sup>53</sup>

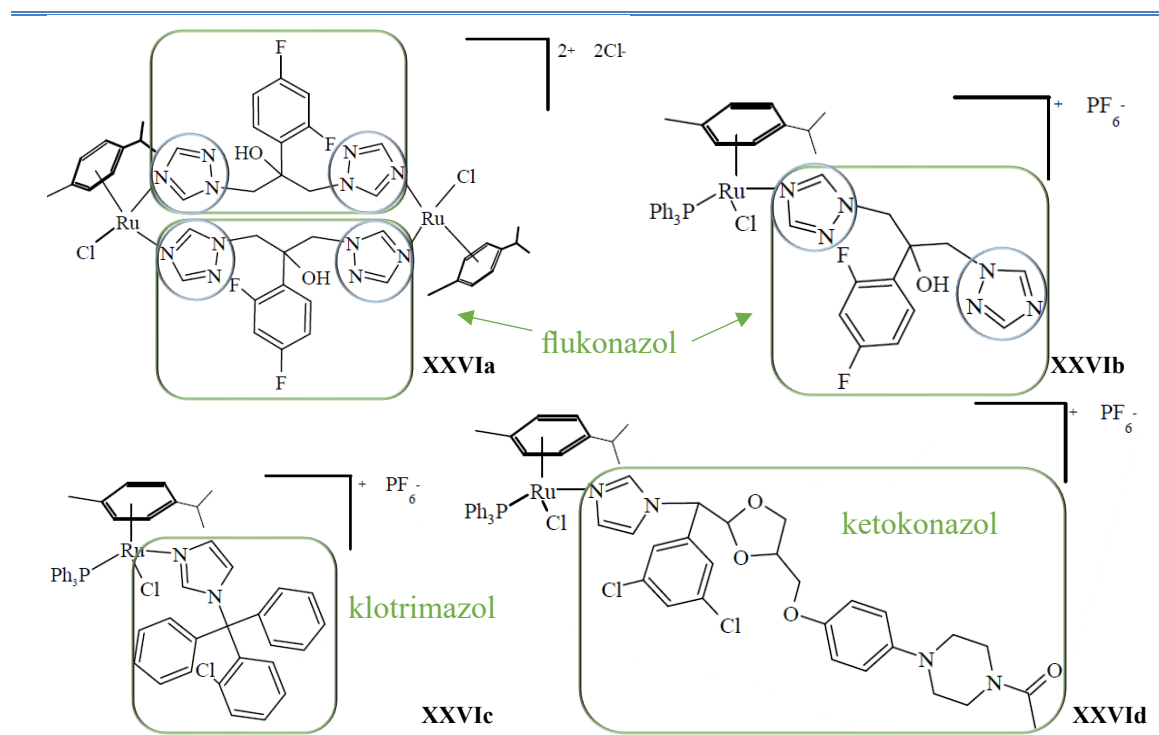
### 6.1.2 Kompleksy rutenu(II) skoordynowane z lekami przeciwgrzybicznymi

Colina-Vegas i współpracownicy (2018 r.) zsyntezowali cztery p-cymenowe kompleksy rutenu(II) skoordynowane ze znanymi lekami przeciwgrzybicznymi: klotrimazolem, ketokonazolem i flukonazolem (Tab. 17).<sup>124</sup>

Ocena właściwości cytotoksycznych dowiodła, że wszystkie kompleksy, z wyjątkiem XXVIa, są cytotoksyczne na poziomie porównywalnym z cisplatyną (Tab. 17), z kolei aktywność cytotoksyczna nieskoordynowanych leków przeciwgrzybiczych jest znacznie niższa ( $IC_{50}$  = od 9,74 do  $>100 \mu\text{M}$ ). Badanie oddziaływania z ludzką albuminą (HSA) wskazało na wiązanie kompleksów XXVIb-XXVI d z HSA z umiarkowanym powinowactwem, głównie na sposób oddziaływań elektrostatycznych ( $K_b = 1,78 - 7,90 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). Związki te odznaczają się także zdolnością do interkalacyjnego oddziaływania z DNA, gdzie największymi stałymi wiązania charakteryzowały się kompleksy skoordynowane z flukonazolem ( $K_{sv \text{ XXVIa}} = 56,71 \times 10^4 \text{ l} \times \text{M}^{-1}$ ;  $K_{sv \text{ XXVIb}} = 39,12 \text{ l} \times \text{M}^{-1}$ ). Analiza cyklu komórkowego wykazała, że kompleks XXVIc indukuje akumulację komórek w fazie sub-G1, co sugeruje odmienny mechanizm działania niż cisplatyny, która powoduje zatrzymanie komórek w fazie cyklu G2/M. Jednocześnie taki wpływ na cykl komórkowy jest spójny z doniesieniami literaturowymi dla innych arenowych kompleksów Ru(II) i zazwyczaj związany jest z indukowaniem śmierci komórek na drodze apoptozy, co również potwierdzono w kolejnych badaniach.<sup>124</sup>

Tab. 17 Związki kompleksowe rutenu(II) z lekami przeciwgrzybicznymi. <sup>124</sup>

### Wzory strukturalne



### Otoczenie koordynacyjne Ru(II)

XXVIa	XXVIb	XXVIc	XXVIId
<ul style="list-style-type: none"> <li>•p-cym,</li> <li>•dwa monodentatne N-donorowe ugrupowania triazolowe,</li> <li>•jon chlorkowy;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•p-cym,</li> <li>•monodentatne N-donorowe ugrupowanie triazolowe,</li> <li>•trifenylfosfina,</li> <li>•jon chlorkowy;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•p-cym,</li> <li>•monodentatne N-donorowe ugrupowanie imidazolowe,</li> <li>•trifenylfosfina,</li> <li>•jon chlorkowy;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•p-cym,</li> <li>•monodentatne N-donorowe ugrupowanie triazolowe,</li> <li>•trifenylfosfina,</li> <li>•jon chlorkowy;</li> </ul>

### Aktywność cytotoksyczna *in vitro* <sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> [μM])

Związek	Linia komórkowa				
	A549	DU-145	MDA-MB-231	MRC-5 <sup>b</sup>	L929 <sup>b</sup>
XXVIa	>100	>100	>100	>100	>100
XXVIb	2,94	3,90	2,35	2,02	2,00
XXVIc	0,61	5,13	0,63	1,16	1,15
XXVIId	0,64	4,45	0,62	1,09	1,80
cis-Pt	14,42	2,33	2,44	23,9	16,53

<sup>a</sup> po 48 h inkubacji komórek z kompleksami;

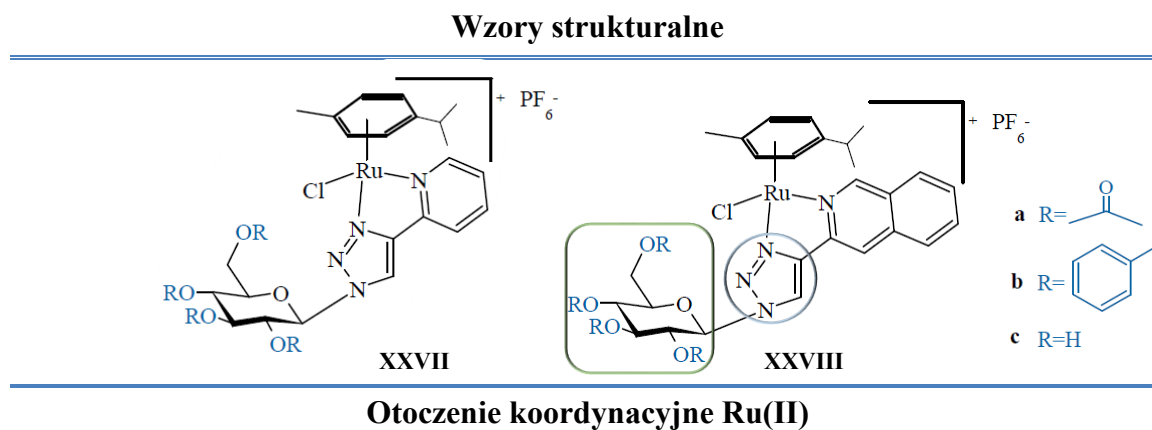
<sup>b</sup> MRC-5 - linia komórkowa zarodka ludzkiego; L929 - mysia fibroblastopodobna linia komórkowa pochodząca z podskórnej tkanki łącznej;

## 6.2 Kompleksy rutenu(II) z ligandami skoniungowanymi z cukrami

Mając na uwadze omówione już wcześniej powinowactwo cukrów do komórek nowotworowych, Kacsir i współpracownicy (2021 r.) zsyntezowali serię C- i N-glikopiranozylowych azoli i ich arenowych kompleksów rutenu(II) (Tab. 18).<sup>11</sup>

Do analizy aktywności cytotoksycznej wyselekcjonowano lipofilowy (logD = 2,85) kompleks XXVIIb. Związek ten charakteryzuje się wysoką cytotoksycznością względem wszystkich przebadanych linii komórek nowotworowych (Tab. 18), podczas gdy żaden z wolnych ligandów glikopiranozylowych nie wykazywał aktywności w tym kierunku. Co więcej, autorzy postulują że aktywność cytotoksyczna kompleksów Ru(II) związana jest z generowaniem ROS.<sup>11</sup>

Tab. 18 Arenowe kompleksy rutenu(II) z ligandami skoniungowanymi cukrami.<sup>11</sup>



- p-cym,
- N,N-chelatujące ugrupowanie triazolo-pirydynowe,
- jon chlorkowy;

### Aktywność cytotoksyczna *in vitro*<sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> [μM])

Związek	Linia komórkowa				
	A2780	ID8 <sup>b</sup>	U251N	MCF-7	Capan2
XXVIIb	0,9	1,53	2,82	1,29	2,18
cis-Pt	1,21	10,80	b.d.	b.d.	b.d.
karbo-Pt	27,98	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
ox-Pt <sup>b</sup>	0,12	4,59	b.d.	b.d.	b.d.

<sup>a</sup> po 48 h inkubacji komórek z kompleksami;

<sup>b</sup> ID8 - mysia linia komórkowa nabłonkowego nowotworu jajnika; Capan-2 - ludzka linia komórkowa gruczolakoraka trzustki;

### 6.3 Inne kompleksy rutenu(II) z ligandami chelatującymi

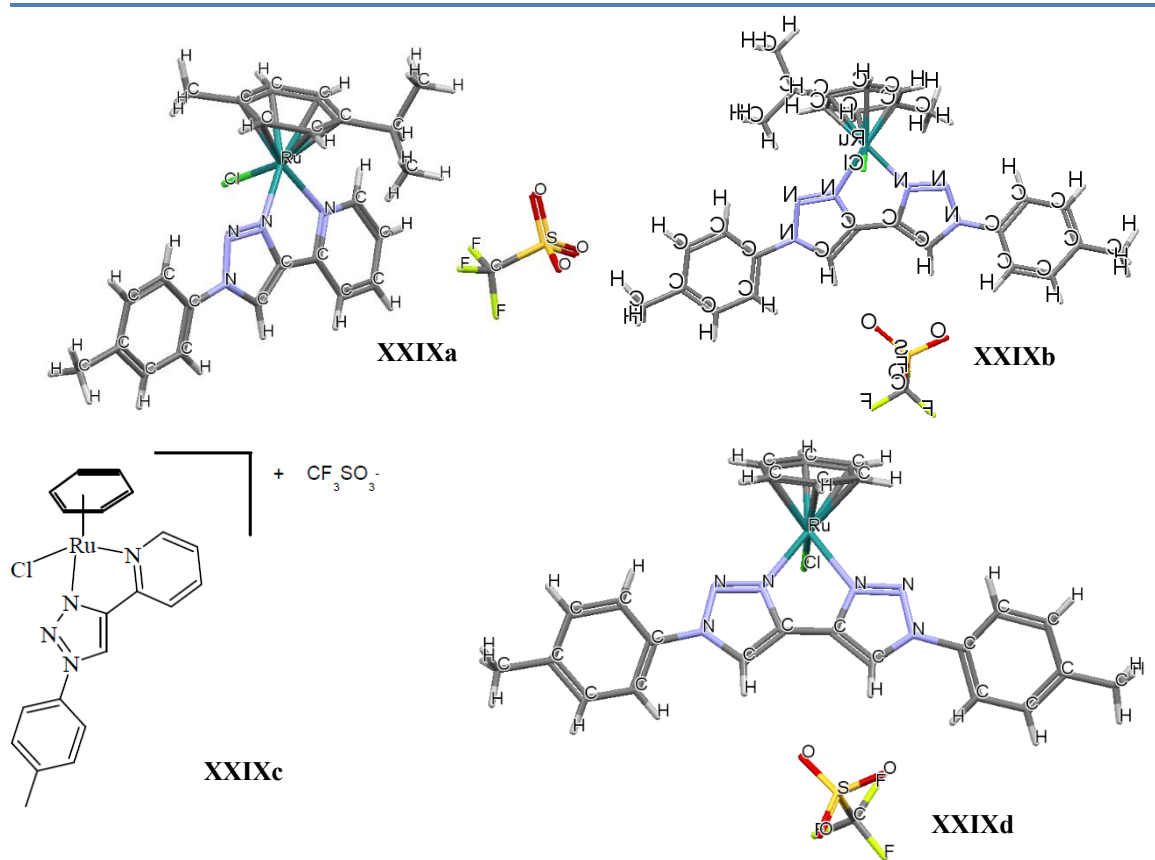
Zastosowanie ligandów polidentatnych N,N-chelatujących jest jedną z najpowszechniej stosowanych strategii dostrajania właściwości przeciwnowotworowych kompleksów typu  $[\text{Ru}(\eta_6\text{-aren})(\text{L})\text{X}]^{n+}$ . Jednakże zastosowanie triazoli jako ligandów chelatowych w kompleksach Ru(II) do tej pory przyciągnęło niewielką uwagę naukowców.<sup>125</sup>

Lenis-Rojas i współpracownicy (2021 r.) syntezowali kationowe benzenowe i p-cymenowe kompleksy rutenu(II) skoordynowane z N,N-chelatującymi ligandami ditriazolowymi lub triazolo-pirydynowymi (Tab. 19).<sup>125</sup>

Badanie potencjału cytotoksycznego związków koordynacyjnych Ru(II) wykazało aktywność cytotoksyczną kompleksów XXIXa i XXIXc względem komórek nowotworowych raka A2870, przy jednoczesnym braku toksyczności względem prawidłowych komórek fibroblastów (Tab. 19). Związek XXIXa wykazywał również cytotoksyczność w stosunku do komórek HCT116 (Tab. 19). Brak szkodliwej toksyczności kompleksów potwierdzono także w warunkach *in vivo* na zarodkach Danio Pręgowanego - nie zaobserwowano efektów letalnych względem embrionów. Ponadto kompleks XXIXa hamuje migrację komórek i opóźnia prawidłowy postęp cyklu komórkowego. Zarówno XXIXa jak i XXIXc nie oddziałują z DNA, natomiast indukują powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS), co wyzwała śmierć komórek poprzez autofagię (po zastosowaniu XXIXa) lub autofagię i apoptozę (po zastosowaniu XXIXc). Uzyskane wyniki sugerują, że mechanizmy cytotoksycznego działania związków XXIXa i XXIXc są odmienne od standardowego mechanizmu charakterystycznego dla znanych metalo-leków przeciwnowotworowych.<sup>125</sup>

Tab. 19 Arenowe kompleksy rutenu z chelatującym ugrupowaniem ditriazolowym i tiazolo-pirydynowym.<sup>125</sup>

Wzór strukturalny / struktury krystaliczne



Otoczenie koordynacyjne Ru(II)

XXIXa i XXIXb	XXIXc i XXIXd
<ul style="list-style-type: none"> <li>•p-cym,</li> <li>•N,N-chelatujące ugrupowanie triazolo-pirydynowe,</li> <li>•jon chlorkowy;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•benzen,</li> <li>•N,N-chelatujące ugrupowanie triazolo-pirydynowe,</li> <li>•jon chlorkowy;</li> </ul>

Aktywność cytotoksyczna *in vitro*<sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> [μM])

Linia komórkowa	Związek					
	XXIXa	XXIXb	XXIXc	XXIXd	cis-Pt	doksorubicyna
A2780	7,6	47,6	7,26	>50	1,9	b.d.
HCT116 <sup>b</sup>	12,1	>50	>50	>50	b.d.	0,5
HCT116dox <sup>b</sup>	>50	>50	>50	>50	b.d.	>6
fibroblasty	44,2	0,50	>50	>50	b.d.	b.d.

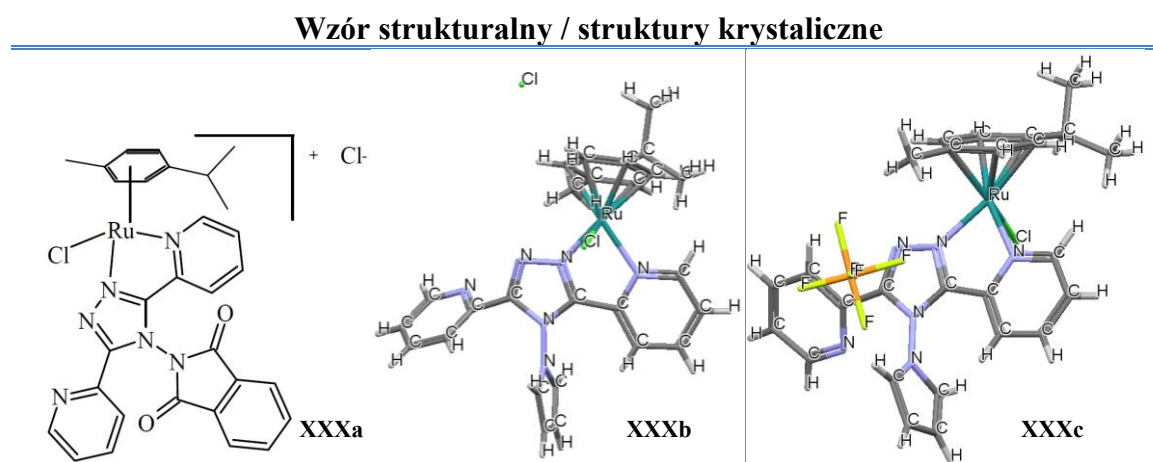
<sup>a</sup> po 48 h inkubacji komórek ze związkami;

<sup>b</sup> HCT116dox - ludzka linia komórkowa nowotworu jelita grubego opornej na doksorubicynę;

Z kolei Muley i współpracownicy (2021 r.) zsyntezowali serię p-cymenowych kompleksów rutenu(II) z dipirydino-triazolem jako ligandem N,N-chelatującym (Tab. 20).

Badania autorów skupiły się na analizie cytotoksyczności. Wykazano, że wszystkie kompleksy (Tab. 20) w większym stopniu redukują żywotność komórek linii A549 niż MDA-MB-231, a związkiem o największej aktywności przeciwnowotworowej jest XXXb.<sup>126</sup>

Tab. 20 Kompleksy rutenu(II) z dipirydino-triazolem.<sup>126</sup>



**Otoczenie koordynacyjne Ru(II)**

- p-cym,
- N,N-chelatujące ugrupowanie triazolo-pirydynowe,
- jon chlorkowy;

**Aktywność cytotoksyczna *in vitro*<sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> [μM])**

Linia komórkowa	Związek		
	XXXa	XXXb	XXXc
A549	6,56	4,74	13,67
MDA-MB-231	15,99	9,415	56,885

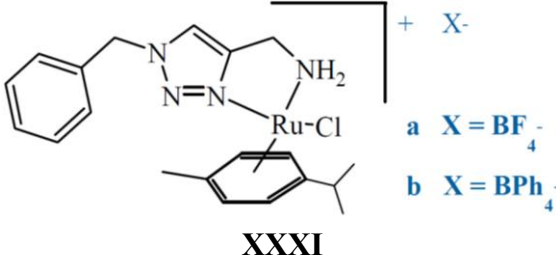
<sup>a</sup> po 72 h inkubacji komórek z kompleksami;

Natomiast Chu i współpracownicy (2024 r.) zsyntezowali p-cymenowe kompleksy rutenu(II) z N,N-chelatującym ligandem triazolo-aminowym (Tab. 21).<sup>127</sup>

Ocena aktywności cytotoksycznej kompleksów i wolnego liganda triazolo-aminowego wskazała XXXIb jako jedyny kompleks aktywny wobec wszystkich przebadanych linii komórek nowotworowych (Tab. 21). Dodatkowo, związek XXXIa był selektywnie cytotoksyczny względem komórek MT4. Z kolei nieskoordynowane ligandy wykazywały bardzo niską lub całkowity brak cytotoksyczności (IC<sub>50</sub> = od 681 do >1300 μM). Analizy <sup>1</sup>H NMR i UV-Vis potwierdziły wiązanie XXXIb

z imidazolem i biocząsteczkami zawierającymi imidazol (L-His, NADH, BSA, i 5'-GMP). Mechanizm wiązania wynika najprawdopodobniej z zastępowania odchodzącego liganda chlorkowego pierścieniem imidazolowym. Reaktywność względem biocząsteczek może wyjaśniać jego wysoką cytotoksyczność *in vitro* w porównaniu z innymi testowanymi kompleksami. Dodatkowo na aktywność przeciwnowotworową XXXIb może wpływać zdolność do łatwego przekraczania błony komórkowej zapewnioną przez przeciwjon  $\text{BPh}_4^-$ .<sup>127</sup>

Tab. 21 Arenowe kompleksy rutenu(II) z *N,N*-chelatującym ligandem triazolo-aminowym.<sup>127</sup>

Wzory strukturalne		Otoczenie koordynacyjne Ru(II)			
 <p style="text-align: center;"><b>XXXI</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• aren,</li> <li>• <i>N,N</i>-chelatuujące ugrupowanie triazolo-aminowe,</li> <li>• jon chlorkowy;</li> </ul>			
<b>Aktywność cytotoksyczna <i>in vitro</i> <sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> [μM])</b>					
Związek	Linia komórkowa				
	A549	HEK293	HeLa	MT4 <sup>b</sup>	BHK21 <sup>b</sup>
XXXIa	b.a. <sup>c</sup>	>500	258	16	>500
XXXIb	27	20	16	9	23
auranofin	12	<0,1	<2	<2	<0,1

<sup>a</sup> po 96 h inkubacji komórek ze związkami;

<sup>b</sup> MT4 - ludzka linia komórkowa białaczki; BHK21 - prawidłowa linia komórkowa nerki chomika;

<sup>c</sup> b.a. = brak aktywności cytotoksycznej;

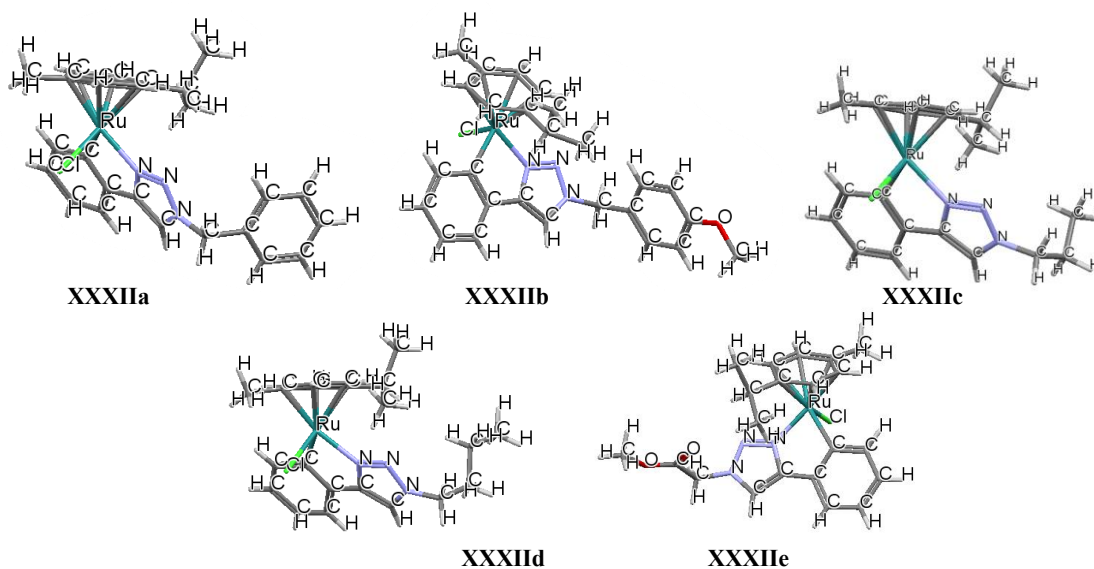
Riedl i współpracownicy (2016 r.) zsyntezowali serię *p*-cymenowych kompleksów rutenu(II) skoordynowanych *N,C*-chelatującym z fenylo-triazolem (Tab. 22).<sup>12</sup>

Z oceny właściwości cytotoksycznych wynika, że nowo otrzymane związki metaloorganiczne wykazują aktywność przeciwnowotworową (Tab. 22), podczas gdy nieskoordynowane ligandy charakteryzują się znikomym efektem cytotoksycznym (IC<sub>50</sub> = od >50 do >200 μM). Wartości IC<sub>50</sub> kompleksów zwiększały się wraz ze wzrostem lipofilowości wolnych ligandów, co przypisano wyższej akumulacji komórkowej. Najbardziej cytotoksyczny kompleks XXXIIb wykazał wyraźny wpływ na dystrybucję cyklu komórkowego - indukuje wzrost liczby komórek w fazie S przy stężeniu 25 μM, podczas gdy XXXIIe wymaga wyższych stężeń dla uzyskania porównywalnych efektów.

Ponadto wszystkie badane kompleksy charakteryzują się powinowactwem względem aminokwasów (histydyny, metioniny i cysteiny).<sup>12</sup>

Tab. 22 Arenowe kompleksy rutenu(II) z triazolo-fenylem.<sup>12</sup>

### Struktury krystaliczne



### Otoczenie koordynacyjne Ru(II)

- p-cym;
- N,C-chelatujący ligand triazolo-fenylowy;
- jon chlorkowy;

### Aktywność cytotoksyczna *in vitro*<sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> [μM])

Związek	Linia komórkowa		
	A549	SW480 <sup>b</sup>	CH1/PA-1 <sup>b</sup>
XXXIIa	16	6,8	5,7
<b>XXXIIb</b>	<b>13</b>	<b>6,6</b>	<b>4,6</b>
XXXIIc	>50	30	15
XXXIId	>12,5	>12,5	10

<sup>a</sup> po 96 h inkubacji komórek z kompleksami;

<sup>b</sup> SV-480 - ludzka linia komórkowa gruczolakoraka okrężnicy; CH1/PA-1 - ludzka linia komórkowa nowotworu jajnika;

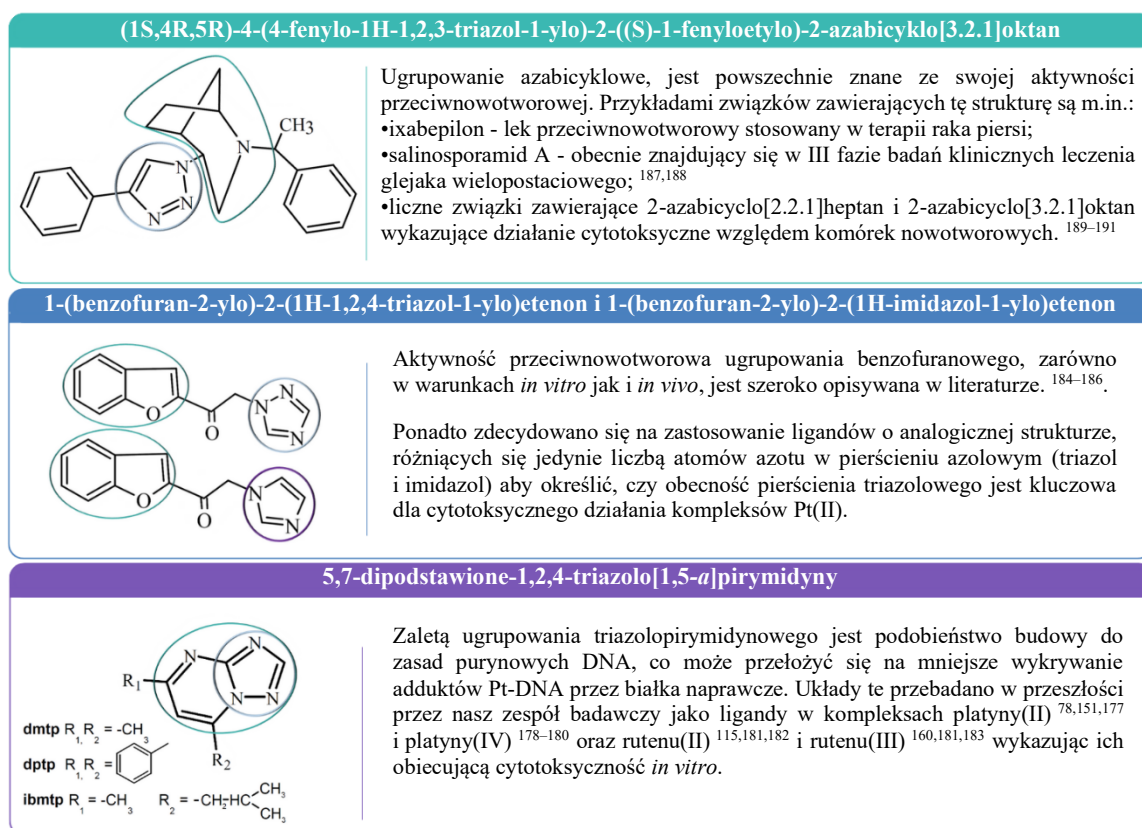
# **Część**

# **eksperymentalna**

## 7. Cele pracy

Podstawowym celem badań stanowiących zakres rozprawy doktorskiej było otrzymanie nowych związków koordynacyjnych platyny(II) i rutenu(II), które wykazywałyby porównywalną lub wyższą aktywność cytotoksyczną oraz niższą toksyczność względem komórek prawidłowych w porównaniu do cisplatyny, a także omijałyby najpowszechniejszy mechanizm lekooporności leków opartych na związkach kompleksowych Pt(II), jakim jest wiązanie z glutationem.

Kierując się przesłankami literaturowymi poprawę właściwości przeciwnowotworowych kompleksów platyny(II) i rutenu(II) zakładano osiągnąć poprzez wprowadzenie do sfery koordynacyjnej N-donorowych ligandów zawierających w swojej strukturze pierścień azolowy. Dodatkowo, efekt cytotoksyczny starano się wzmocnić poprzez rozbudowanie pierścieni azolowych o ugrupowania wykazujące aktywność biologiczną. W konsekwencji do kompleksowania Pt(II) i Ru(II) zastosowano trzy grupy ligandów N-donorowych (Rys. 13).



Rys. 13 Zestawienie ligandów N-donorowych wyselekcjonowanych do syntezy nowych związków koordynacyjnych platyny(II) i rutenu(II) będących przedmiotem badań niniejszej rozprawy doktorskiej.

Po dokonaniu doboru ligandów przystąpiono do realizacji założonego podstawowego celu badawczego poprzez:

1. Opracowanie metodyki syntez:
  - związków koordynacyjnych platyny(II) typu: i)  $[\text{PtCl}_2(\text{N-donor})_2]$ , ii)  $[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})(\text{N-donor})]$ , iii)  $[\text{Pt}(\text{N-donor})_2(\text{ox})]$ ;
  - bifenylowych związków koordynacyjnych rutenu(II) typu  $[(\eta^6\text{-bip})\text{RuCl}_2(\text{N-donor})]$ .
2. Określenie czystości produktów oraz składu sfery koordynacyjnej i sposobu koordynacji ligandów w nowo otrzymanych związkach kompleksowych Pt(II) i Ru(II) z zastosowaniem: analizy elementarnej (C, H, N), analizy MS, metod spektroskopowych ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{195}\text{Pt}$  NMR, IR, X-ray) i obliczeń teoretycznych DFT.
3. Oznaczenie lipofilowości kompleksów Pt(II) i Ru(II), będącej głównym parametrem determinującym bierny transport związków do wnętrza komórek.
4. Ocenę potencjału do generowania lekooporności przez związki koordynacyjne Pt(II) poprzez zbadanie ich oddziaływania z glutationem.
5. Ustalenie potencjału przeciwnowotworowego związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) poprzez wyznaczenie aktywności cytotoksycznej i antyproliferacyjnej z użyciem testów MTT i BrdU.
6. Wstępne badania nad mechanizmem działania kompleksów Pt(II) i Ru(II) poprzez analizę oddziaływania z DNA oraz określenie wpływu tych kompleksów na przebieg cyklu komórkowego.
7. Wykazanie korelacji struktura-aktywność badanych związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II).

## 8. Odczynniki chemiczne

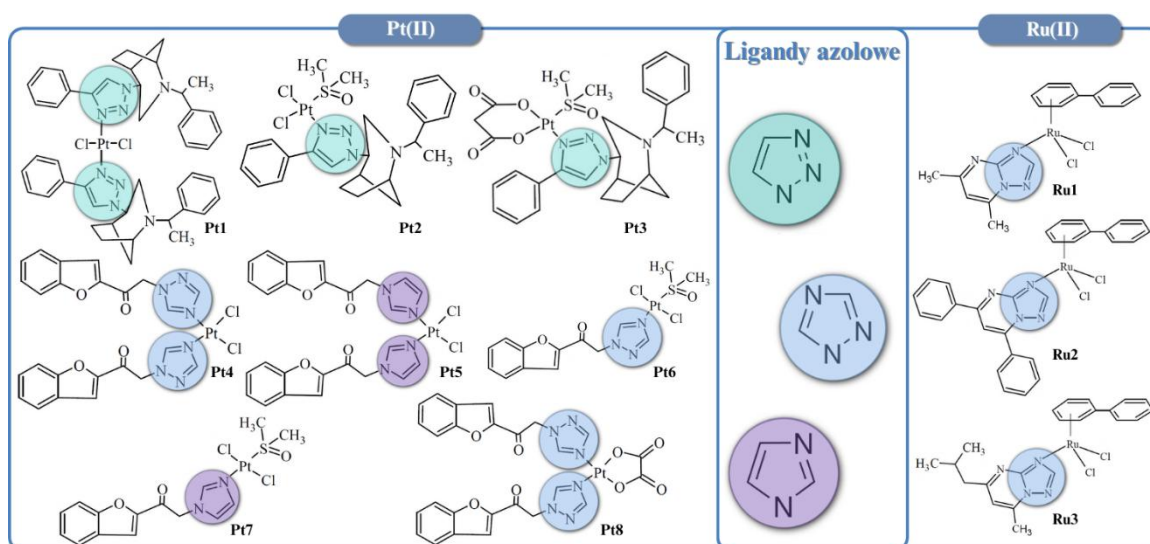
Nazwa	Wzór	Czystość	Firma
1,3-difenylo-1,3-propanodion	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	98%	Sigma-Aldrich
2,4-pentanodion	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	≥99,5%	Sigma-Aldrich
3-amino-1,2,4-triazol	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	≥95%	Sigma-Aldrich
6-metylo-2,4-heptanodion	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	≥98%	Sigma-Aldrich
Agaroz			NIPPON Genetics Europe
Azotan(V) srebra	AgNO <sub>3</sub>	CZDA	Avantor S.A.
Bifenyl	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	≥99%	SAFC
Bufor PBS		pastylki	Sigma-Aldrich
Bufor TAE			NYZtech
Chlorek rutenu(III)	RuCl <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	≥95%	Pol-Aura
Chlorek sodu	NaCl	CZDA	Avantor S.A.
Cisplatyna	[PtCl <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	≥99.90%	
DTNB	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	≥98%	Sigma-Aldrich
Kwas chlorowodorowy	HCl		POCH
Kwas malonowy	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	99%	Sigma-Aldrich
L-glutation	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	≥98%	Sigma-Aldrich
Lit	Li	≥98%	Sigma-Aldrich
Midori Green Xtra			NIPPON Genetics Europe
Pluronic®F127	(C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O·C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>x</sub>		Sigma-Aldrich
PluronicP®123	(C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O·C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>x</sub>		Sigma-Aldrich
Szczawian potasu	(COOK) <sub>2</sub>	≥99%	POCH Gliwice
Tetrachloroplatynian(II) potasu	K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>	98%	Sigma-Aldrich
Tris(hydroksymetylo)aminometan	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	≥99,9%	Sigma-Aldrich
Wersenian disodu	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub>	≥99,9%	Sigma-Aldrich
Wodorotlenek sodu	NaOH	CZDA	Stanlab
α-Terpinen	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	85%	Sigma-Aldrich

Rozpuszczalniki organiczne (1-oktanol, chloroform, etanol, dimetyloformamid, DMSO, DMF eter dietylowy, eter naftowy, metanol) o czystości CZDA zakupiono z firmy Chempur.

Wszystkie linie komórkowe użyte w eksperymentach uzyskano z American Type Culture Collection. Odczynniki do hodowli komórkowej, sulforodaminę B, bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazolu, Triton X-100, albuminę surowicy bydlęcej, Alexa Fluor 488 oraz DAPI zakupiono w firmie Corning, natomiast bromodeoksyurydynę oraz Tali™ Cell Cycle Kit w firmie Thermo Fisher Scientific.

## 9. Preparatyka

W niniejszym rozdziale przedstawiono procedury syntez ośmiu związków koordynacyjnych platyny(II) i trzech związków koordynacyjnych rutenu(II) o zróżnicowanej sferze koordynacyjnej (Rys. 14). Opracowanie metodyki syntez kompleksów stanowiło pierwszy i zarazem kluczowy etap badań nad nowymi sterycznie rozbudowanymi związkami kompleksowymi Pt(II) i Ru(II).



Rys. 14 Struktury nowych związków koordynacyjnych platyny(II) i rutenu(II) będących przedmiotem badań niniejszej rozprawy doktorskiej.

Szczegółową metodykę syntez związków koordynacyjnych platyny(II) i rutenu(II) opisano w podrozdziałach 9.2 i 9.3.

## 9.1 Synteza substratów

### 9.1.1 (1S,4R,5R)-4-(4-fenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-((S)-1-fenyletylo)-2-azabicyklo[3.2.1]oktan

Ligand (1S,4R,5R)-4-(4-fenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-((S)-1-fenyletylo)-2-azabicyklo[3.2.1]oktan (**ffeo**) zsyntezowano i przekazano do kompleksowania przez zespół naukowy prof. dr hab. inż. Elżbiety Wojaczyńskiej z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Metodę syntezy liganda opisano we wspólnie opublikowanym artykule naukowym.<sup>128</sup>

### 9.1.2 (Benzofuran-2-yl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)etenon i 1-(benzofuran-2-yl)-2-(1H-imidazol-1-yl)etenon

Ligandy (benzofuran-2-yl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)etenon (**bfe**) i 1-(benzofuran-2-yl)-2-(1H-imidazol-1-yl)etenon (**bfie**) zsyntezowano i przekazano do kompleksowania przez dr Agnieszkę Tafelską-Kaczmarek z Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.<sup>129</sup>

### 9.1.3 5,7-dipodstawione-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirymidyny

5,7-dimetylo-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirymidynę (**dmtp**), 7-izobutylo-5-metylo-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirymidynę (**ibmtp**) i 5,7-difenyl-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirymidynę (**dptp**) zsyntezowano zgodnie z preparatyką opisaną w rozprawie doktorskiej dr. Mateusza Jakubowskiego, opracowaną w naszym zespole naukowym.<sup>130</sup>

### 9.1.4 Malonian srebra

300 mg (2,89 mmola) kwasu malonowego rozpuszczono w 5 ml wody destylowanej i dodano 230 mg (5,77 mmola) wodorotlenku sodu rozpuszczonego w 6 ml tego samego rozpuszczalnika. Roztwór reakcyjny mieszano przez 15 minut. Następnie dodano 980 mg (5,77 mmola) azotanu(V) srebra rozpuszczonego w 5 ml wody destylowanej. Mieszanie kontynuowano przez 15 min. bez dostępu światła, po czym mieszaninę reakcyjną schłodzono w temperaturze 4 °C. Powstały osad przesączono i przemyto trzykrotnie 5 ml wody destylowanej, etanolu i eteru dietylowego. Po wysuszeniu w liofilizatorze otrzymano 486 mg produktu (wydajność 53,11%).

### 9.1.5 1,4-dihydrofenyl

30,8 g (0,20 mola) bifenyłu rozpuszczono w 1000 ml eteru dietylowego, dodano 2000 ml ciekłego amoniaku i 3,2 g (0,45 mola) litu. Roztwór reakcyjny mieszano przez 40 minut. Następnie kolejno dodano: 147,8 g (2,76 mola) chlorku amonu, 500 ml wody destylowanej i 400 ml eteru dietylowego. Amoniak usunięto z mieszaniny reakcyjnej, a warstwę eterową oddzielono od warstwy wodnej. Następnie eter dietylowy odparowano na wyparce obrotowej, a otrzymaną frakcję poddano destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem (0,25 mmHg; 70,0 - 72,0 °C). Otrzymano 26,6 g produktu (wydajność 89%).

## 9.2. Synteza związków koordynacyjnych platyny(II)

### 9.2.1 Prekursorowy kompleks platyny(II) *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>2</sub>]

*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>2</sub>] zsyntezowano według opisaną w literaturze procedury.<sup>131</sup> Kompleks ten stanowi substrat do syntez związków koordynacyjnych platyny(II) **Pt2**, **Pt6** oraz **Pt7**, których syntezę opisano w dalszych podrozdziałach (9.2.2.2 i 9.2.3.2). [27]

### 9.2.2 Kompleksy platyny(II) z (1*S*,4*R*,5*R*)-4-(4-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-((*S*)-1-fenyletylo)-2-azabicyklo[3.2.1]oktanem

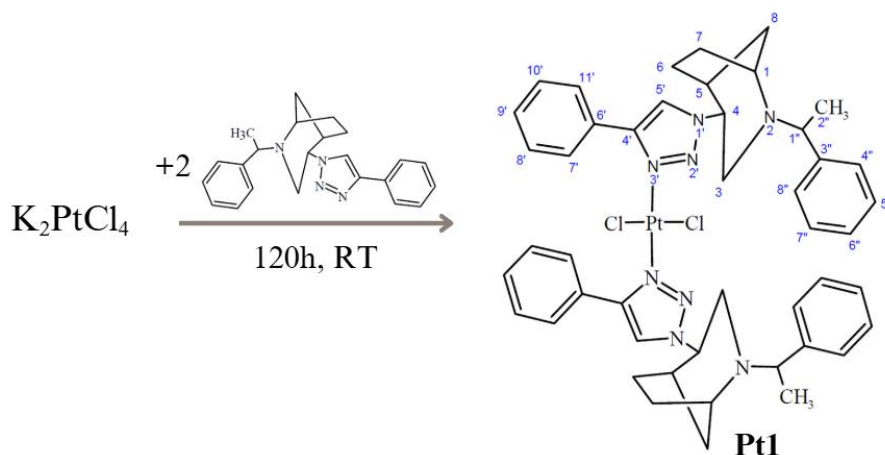
Badania nad związkami koordynacyjnymi z ligandem **ffeo** stanowią kontynuację eksperymentów rozpoczętych w ramach realizacji mojej pracy licencjackiej i magisterskiej. Wykonując badania do tych prac dyplomowych:

- opracowano metodykę syntezy dwóch dichlorkowych i jednego malonianowego kompleksów platyny(II) o wzorach ogólnych *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ffeo)<sub>2</sub>] (**Pt1**), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)(ffeo)] (**Pt2**) i [Pt(DMSO)(ffeo)(mal)] (**Pt3**).
- dokonano charakterystyki strukturalnej **Pt1** - **Pt3** przy użyciu spektroskopii wielojądrowego (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N <sup>195</sup>Pt) rezonansu magnetycznego i spektroskopii w podczerwieni;
- wykonano wstępną ocenę właściwości biologicznych: i) lipofilowości, ii) oddziaływania z GSH, iii) wstępnej analizy aktywności cytotoksycznej *in vitro* dla **Pt1** i **Pt3** względem komórek nowotworowych pęcherza 5637 i prawidłowych komórek izolowanych z moczowodów SV-HUC-1.

Pozostałe zaprezentowane w niniejszej rozprawie badania dla związków koordynacyjnych **Pt1** - **Pt3** wykonałam w ramach realizacji projektu doktorskiego.

### 9.2.2.1 Synteza *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ftfeao)<sub>2</sub>] (Pt1)

25,0 mg (0,06 mmola) K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> rozpuszczono w 5 ml wody i dodano 43,7 mg (0,12 mmola) ftfeao rozpuszczonego w 15 ml chloroformu. Roztwór reakcyjny mieszano przez 120 h w temperaturze pokojowej. Następnie rozdzielono warstwę wodną od chloroformowej. Osad powstały po zateżeniu fazy organicznej przemyto trzykrotnie 5 ml wody destylowanej i eteru dietylowego, a następnie wysuszono w liofilizatorze otrzymując 41,7 mg produktu (wydajność 70,65%) (Rys. 15).



Rys. 15 Schematyczne przedstawienie metodyki syntezy *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ftfeao)<sub>2</sub>] (Pt1).

#### Wybrane parametry strukturalne dla kompleksu Pt1:

**MS ESI LR:** *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ftfeao)<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>m/z 983,3;

**Analiza elementarna (%<sub>eksp.</sub>/<sub>teor.</sub>):** %C 56,15/56,20; %H 5,41/5,34; %N 11,37/11,40;

**<sup>195</sup>Pt NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** -2003;

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3,71 (H1); 2,42; 2,26 (H3); 4,01 (H4); 2,45 (H5); 1,31; 1,19 (H6); 1,84; 1,47 (H7); 1,79; 1,48 (H8); 7,75 (H5'); 7,81 (H7'=11'); 7,00 (H8'=10'); 7,16 (H9'); 3,28 (H1''); 1,35 (H2''); 7,35 (H4''=8''); 7,49 (H5''=7''); 7,49 (H6'');

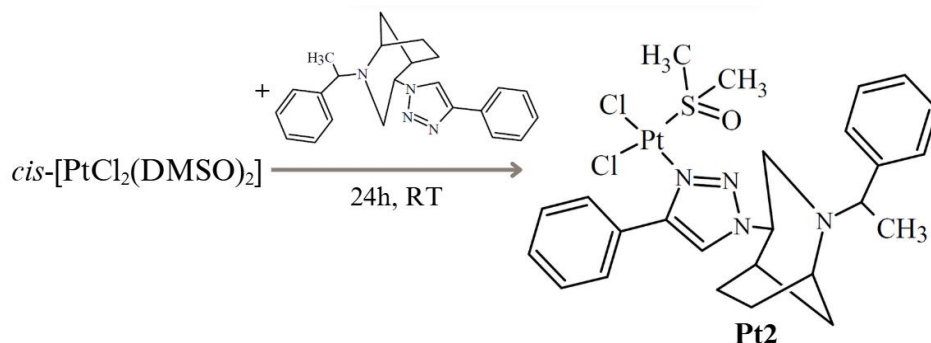
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 55,5 (C1); 47,4 (C3); 60,7 (C4); 33,6 (C5); 33,4 (C6); 21,0 (C7); 26,9 (C8); 146,9 (C4'); 122,4 (C5'); 127,8 (C7'=11'); 128,2 (C8'=10'); 128,3 (C9'); 62,7 (C1''); 21,1 (C2''); 145,4 (C3''); 127,4 (C4''=8''); 128,6 (C5''=7''); 127,4 (C6'');

**<sup>15</sup>NNMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** -322,2 (N2); -120,7 (N1'); -139,5 (N2'/N3');

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1668 ν(C=N); 1452 ν(N=N); 337 ν(Pt=Cl);

### 9.2.2.2 Synteza *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)(ftfeao)] (Pt2)

50,0 mg (0,12 mmola) *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>2</sub>] zawieszono w 5 ml roztworu woda:etanol (v/v 1:1) i dodano 42,5 mg (0,12 mmola) **ftfeao** rozpuszczonego w 5 ml chloroformu. Roztwór reakcyjny mieszano przez 24 h w temperaturze pokojowej. Powstały osad przesączono i przemyto trzykrotnie 5 ml etanolu, acetonu i eteru dietylowego. Po wysuszeniu w liofilizatorze otrzymano 55,6 mg produktu (wydajność 67,70%) (Rys. 16).



Rys. 16 Schematyczne przedstawienie metodyki syntezy *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)(ftfeao)] (**Pt2**).

#### Wybrane parametry strukturalne dla kompleksu Pt2:

**MS ESI LR:** *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(ftfeao)+H]<sup>+</sup> m/z 703,14;

**Analiza elementarna (%<sub>eksp.</sub>/<sub>teor.</sub>):** %C 41,77/41,66; %H 4,01/4,06; %N 7,81/7,76;

**<sup>195</sup>Pt NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** -2999;

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3,82 (H1); 2,76; 2,64 (H3); 4,52 (H4); 2,83 (H5); 1,60; 1,40 (H6); 1,88; 1,55 (H7); 1,91; 1,59 (H8); 8,27 (H5'); 8,18 (H7'=11''); 7,57 (H8'=10'); 7,52 (H9'); 3,35 (H1''); 1,40 (H2''); 7,33 (H4''=8''); 7,34 (H5''=7''); 7,28 (H6''); 3,43; 3,41 (DMSO CH<sub>3</sub>);

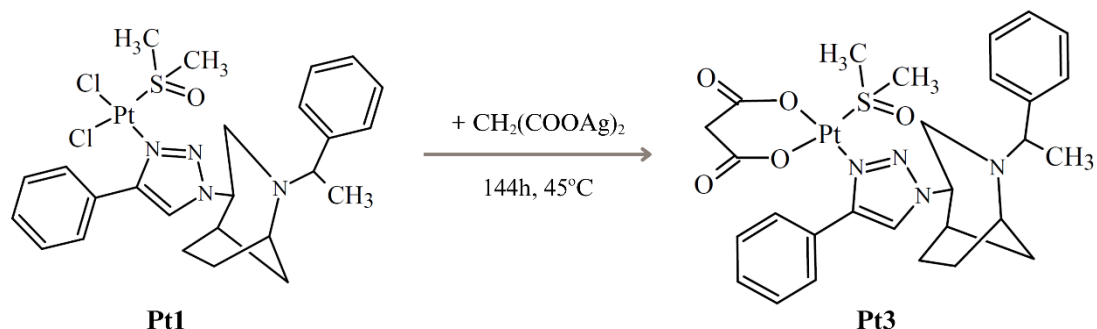
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 55,9 (C1); 47,3 (C3); 61,5 (C4); 40,1 (C5); 33,8 (C6); 21,5 (C7); 27,0 (C8); 147,3 (C4'); 123,7 (C5'); 127,8 (C6'); 128,6 (C7'=11'); 128,8 (C8'=10'); 129,8 (C9'); 62,8 (C1''); 20,9 (C2''); 144,5 (C3''); 127,2 (C4''=8''); 128,8 (C5''=7''); 127,8 (C6''); 44,0; 43,8 (DMSO CH<sub>3</sub>);

**<sup>15</sup>N NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** -322,6 (N2); -119,0 (N1'); -126,8 (N2'/N3');

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1664 ν(C=N); 1461 ν(N=N); 1135 ν(S=O); 342, 317 ν(Pt=Cl);

### 9.2.2.3 Synteza [Pt(DMSO)(ftfeao)(mal)] (Pt3)

30,0 mg (0,04 mmola) **Pt2** rozpuszczono w 20 ml chloroformu i dodano 13,7 mg (0,04 mmola) malonianu srebra zawieszony w 20 ml etanolu. Roztwór reakcyjny mieszano przez 144 h bez dostępu światła w temperaturze 35 - 45 °C. Powstały osad przesączono i przemyto trzykrotnie 5 ml wody destylowanej i eteru dietylowego. Po wysuszeniu w liofilizatorze otrzymano 13,7 mg produktu (wydajność 43,80%) (Rys. 17).



Rys. 17 Schematyczne przedstawienie metodyki syntezy [Pt(DMSO)(ftfeao)(mal)] (**Pt3**).

#### Wybrane parametry strukturalne dla kompleksu Pt3:

**MS ESI LR:** [Pt(DMSO)(ftfeao)(mal)+H]<sup>+</sup> m/z 734,20;

**Analiza elementarna (%<sub>eksp.</sub>/<sub>teor.</sub>):** %C 45,90/45,83, %H 4,70/4,67; %N 7,59/7,64;

**<sup>195</sup>Pt NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** -2530;

**<sup>1</sup>H NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ/ppm):** 3,77 (H1); 3,07;2,85 (H3); 4,71 (H4); 2,83 (H5); 1,91; 1,72 (H6); 1,91; 1,58 (H7); 1,66; 1,39 (H8); 8,61 (H5'); 8,27 (H7'=11'); 7,70 (H8'=10'); 7,63 (H9'); 3,59 (H1''); 1,40 (H2''); 7,47 (H4''=8''); 7,26 (H6''); 3,53 (DMSO CH<sub>3</sub>); 3,35 (mal CH<sub>2</sub>);

**<sup>13</sup>C NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ/ppm):** 56,3 (C1); 46,5 (C3); 62,2 (C4); 40,1 (C5); 26,8 (C6); 22,2 (C7); 33,5 (C8); 147,8 (C4'); 124,8 (C5'); 128,1 (C6'); 128,7 (C7'=11'); 129,1 (C8'=10'); 130,1 (C9'); 62,4 (C1''); 20,0 (C2''); 144,9 (C3''); 127,6 (C4''=8''); 128,5 (C5''=7''); 127,2 (C6''); 42,33 (DMSO CH<sub>3</sub>); 49,8 (mal CH<sub>2</sub>); 172,1; 172,6 (mal COO<sup>-</sup>);

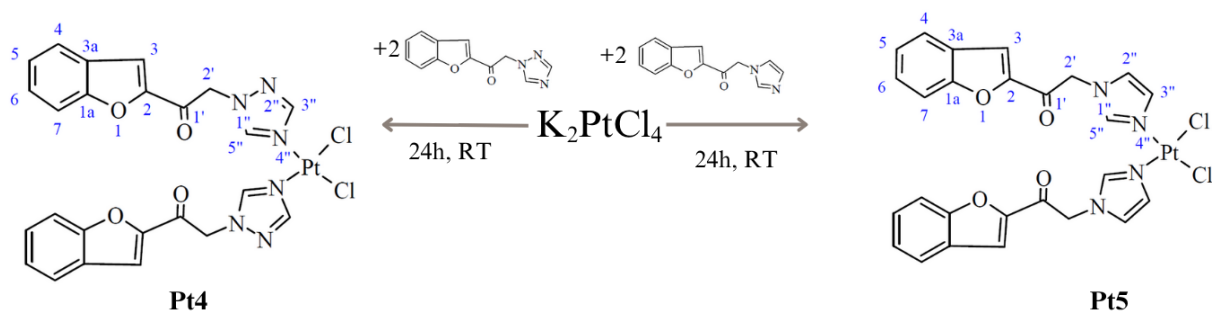
**<sup>15</sup>N NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ/ppm):** -324,8 (N2); -117,3 (N1'); -150,0 (N2'/N3');

**IR (cm<sup>-1</sup>):** pasmo ν(C=N) zasłonięte pasmem drgań rozciągających asymetrycznych ν<sub>as</sub>(COO<sup>-</sup>); ν(N=N) 1453; ν<sub>as</sub>(COO<sup>-</sup>) 1646; ν<sub>s</sub>(COO<sup>-</sup>) 1345;

## 9.2.3 Kompleksy platyny(II) z 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylo)etenonem i 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-imidazol-1-ylo)etenonem

### 9.2.3.1 Synteza *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(bfte)<sub>2</sub>] (Pt4) i *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(bfie)<sub>2</sub>] (Pt5)

31,0 mg (0,075 mmola) K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> rozpuszczono w 3 ml wody destylowanej i dodano 34,0 mg (0,15 mmola) **bfte** lub 34,6 mg (0,15 mmola) **bfie** rozpuszczonego w 5 ml metanolu. Roztwór reakcyjny mieszano przez 24 h w temperaturze pokojowej. Powstałe osady przesączono i przemyto trzykrotnie 5 ml wody destylowanej, metanolu i eteru dietylowego. Po wysuszeniu w liofilizatorze otrzymano 18,0 mg **Pt4** (wydajność 33,36%) lub 14,4 mg **Pt5** (wydajność 24,58%) (Rys. 18).



Rys. 18 Schematyczne przedstawienie metodyki syntezy *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(bfte)<sub>2</sub>] (**Pt4**) i *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(bfie)<sub>2</sub>] (**Pt5**).

#### Wybrane parametry strukturalne dla kompleksu Pt4:

MS ESI(-) HR: [*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(bfte)<sub>2</sub>]+H]<sup>+</sup> m/z: 719,03, C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>Pt;

<sup>195</sup>Pt NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ/ppm): -2042;

<sup>1</sup>H NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ/ppm): 8,16 (H3); 7,94 (H4); 7,45 (H5); 7,64 (H6); 7,77 (H7); 6,18 (H2'); 8,45 (H3''); 9,38 (H5'');

<sup>13</sup>C NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ/ppm): 155,8 (C1a); 150,2 (C2); 115,6 (C3); 127,0 (C3a); 124,1 (C4); 124,5 (C5); 129,3 (C6); 112,4 (C7); 181,9 (C1'); 56,4 (C2'); 150,4 (C3''); 147,5 (C5'');

<sup>15</sup>N NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ/ppm): -170,3 (N1''); -81,1 (N2''); -220,6 (N4);

IR (cm<sup>-1</sup>): 1683 ν(C=N); 1549 ν(N=N); 335 ν(Pt-Cl);

### Wybrane parametry strukturalne dla kompleksu Pt5:

**MS ESI(-) HR:** [*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(bfie)<sub>2</sub>]+ H]<sup>+</sup> m/z: 717,04, C<sub>26</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>Pt;

<sup>195</sup>Pt NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ/ppm): -1996;

<sup>1</sup>H NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ/ppm): 8,06 (H3); 7,93 (H4); 7,45 (H5); 7,64 (H6); 7,76 (H7); 5,96 (H2'); 7,48 (H2''); 7,06 (H3''); 8,31 (H5'');

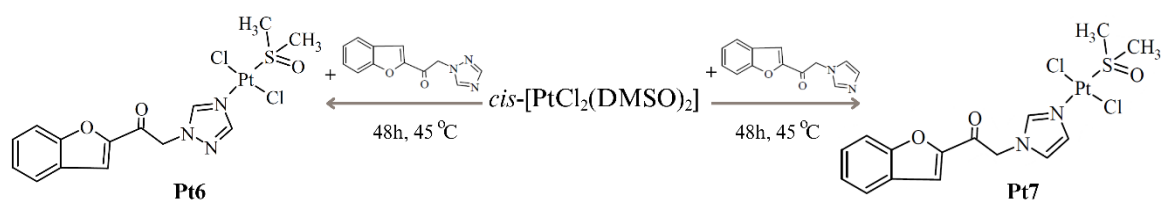
<sup>13</sup>C NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ/ppm): 155,7 (C1a); 150,5 (C2); 114,7 (C3); 127,1 (C3a); 124,0 (C4); 124,4 (C5); 129,1 (C6); 112,3 (C7); 183,3 (C1'); 53,7 (C2'); 122,1 (C2''); 128,5 (C3''); 140,7 (C5'');

<sup>15</sup>N NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ/ppm): -215,4 (N1''); -220,5 (N4'');

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1684 ν(C=N); 323 ν(Pt-Cl);

### 9.2.3.2 Synteza *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)(bfte)] (Pt6) i *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)(bfie)] (Pt7)

31,6 mg (0,075 mmola) *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>2</sub>] zawieszono w 5 ml roztworu woda:etanol (v/v 1:1) i dodano 17,2 mg (0,075 mmola) liganda **bfte** lub 28,9 mg (0,075 mmola) liganda **bfie** rozpuszczonego w 3 ml metanolu. Roztwór reakcyjny mieszano przez 48 h w temperaturze 45 °C. Powstałe osady przesączono i przemyto trzykrotnie 5 ml wody destylowanej, metanolu i eteru dietylowego. Po wysuszeniu w liofilizatorze otrzymano 25,6 mg **Pt6** (wydajność 59,72%) lub 20,1 mg **Pt7** (wydajność 48,58%) (Rys. 19).



Rys. 19 Schematyczne przedstawienie metodyki syntezy *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)(bfte)] (**Pt6**) i *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)(bfie)] (**Pt7**).

### Wybrane parametry strukturalne dla kompleksu Pt6:

**MS ESI(-) HR:** [*trans*-[PtCl<sub>2</sub>(bfte)(DMSO)] + H]<sup>+</sup> m/z: 568.97, C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SCl<sub>2</sub>Pt;

<sup>195</sup>Pt NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ /ppm): -3077;

<sup>1</sup>H NMR (DMF-D<sub>7</sub>, δ/ppm): 8,18 (H3); 7,95 (H4); 7,46 (H5); 7,65 (H6); 7,79 (H7); 6,24 (H2'); 8,67 (H3''); 9,53 (H5''); 3,54 (DMSO CH<sub>3</sub>);

$^{13}\text{C}$  NMR (DMF- $\text{D}_7$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ): 155,8 (C1a); 150,2 (C2); 115,5 (C3); 127,0 (C3a); 124,1 (C4); 124,5 (C5); 129,3 (C6); 112,4 (C7); 181,9 (C1'); 56,5 (C2'); 148,7 (C3''); 146,5 (C5''); 42,9 (DMSO  $\text{CH}_3$ );

$^{15}\text{N}$  NMR (DMF- $\text{D}_7$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ): -169,7 (N1''); -81,7 (N2''); -206,6 (N4'');

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1694  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 1556  $\nu(\text{N}=\text{N})$ ; 1130  $\nu(\text{S}=\text{O})$ ; 347  $\nu(\text{Pt}-\text{Cl})$ ;

#### **Wybrane parametry strukturalne dla kompleksu Pt7:**

MS ESI(-) HR: [*trans*-[PtCl<sub>2</sub>(bfie)(DMSO)] + H]<sup>+</sup> m/z: 568,98, C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>Pt;

$^{195}\text{Pt}$  NMR (DMF- $\text{D}_7$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ): -3056;

$^1\text{H}$  NMR (DMF- $\text{D}_7$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ): 8,08 (H3); 7,94 (H4); 7,45 (H5); 7,64 (H6); 7,79 (H7); 6,02 (H2'); 7,54 (H2''); 7,49 (H3''); 8,56 (H5''); 3,49 ( $\text{CH}_3$  DMSO);

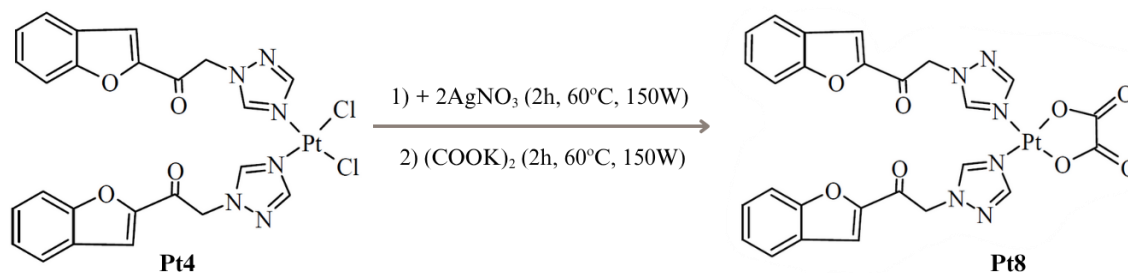
$^{13}\text{C}$  NMR (DMF- $\text{D}_7$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ): 155,7 (C1a); 150,5 (C2); 114,7 (C3); 127,1 (C3a); 124,0 (C4); 124,4 (C5); 129,1 (C6); 112,3 (C7); 183,2 (C1'); 53,9 (C2'); 121,7 (C2''); 127,0 (C3''); 140,1 (C5''); 42,9 (DMSO  $\text{CH}_3$ );

$^{15}\text{N}$  NMR (DMF- $\text{D}_7$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ): -214,3 (N1''); -207,6 (N4'');

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1693  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 1136  $\nu(\text{S}=\text{O})$ ; 345  $\nu(\text{Pt}-\text{Cl})$ ;

#### **9.2.3.3 Synteza [(Pt(bfte)<sub>2</sub>(ox)] (Pt8)**

28,0 mg (0,038 mmola) kompleksu **Pt4** rozpuszczono w 2 ml DMF i dodano 47,7 mg (0,076 mmola) azotanu(V) srebra rozpuszczonego w 3 ml DMF. Reakcję prowadzono przez 2 h w synteźatorze mikrofalowym Discover 2.0 (60 °C, 150 W). Następnie odwirowano wytrącony osad chlorku srebra, a do supernatantu dodano 19,3 mg (0,038 mmola) szczawianu potasu rozpuszczonego w 3 ml wody destylowanej i ponownie wstawiono na 2 h mieszania do synteźatora mikrofalowego (60 °C, 150 W). Powstały osad odsączono, a po zateżeniu przesączu otrzymano produkt końcowy, który przemyto trzykrotnie 5 ml wody destylowanej, acetonu i eteru dietylowego. Po wysuszeniu w liofilizatorze otrzymano 10,54 mg produktu (wydajność 39%) (Rys. 20)



Rys. 20 Schematyczne przedstawienie metodyki syntezy kompleksu  $[(Pt(bfte)_2(ox)]$  (**Pt8**).

### Wybrane parametry strukturalne dla kompleksu Pt8:

$^{195}\text{Pt}$  NMR (DMF- $D_7$ ,  $\delta$  /ppm): - 1738;

$^1\text{H}$  NMR (DMF- $D_7$ ,  $\delta$ /ppm): 8,19 (H3); 7,95 (H4); 7,45 (H5); 7,65 (H6); 7,77 (H7); 6,23 (H2'); 8,58 (H3''); 9,45 (H5'');

$^{13}\text{C}$  NMR (DMF- $D_7$ ,  $\delta$ /ppm): 155,8 (C1a); 150,1 (C2); 115,8 (C3); 127,0 (C3a); 124,1 (C4); 124,5 (C5); 129,4 (C6); 112,4 (C7); 181,9 (C1'); 56,5 (C2'); 150,6 (C3''); 147,6 (C5''); 166,0 (ox  $\text{COO}^-$ );

$^{15}\text{N}$  NMR (DMF- $D_7$ ,  $\delta$ /ppm): - 169,1 (N1''); -79,9 (N2''); -234,8 (N4'');

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): pasmo  $\nu(\text{C}=\text{N})$  zasłonięte pasmem drgań rozciągających asymetrycznych  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ; 1549  $\nu(\text{N}=\text{N})$ ; 1668  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ; 1368  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ ;

## 9.3 Synteza związków koordynacyjnych rutenu(II)

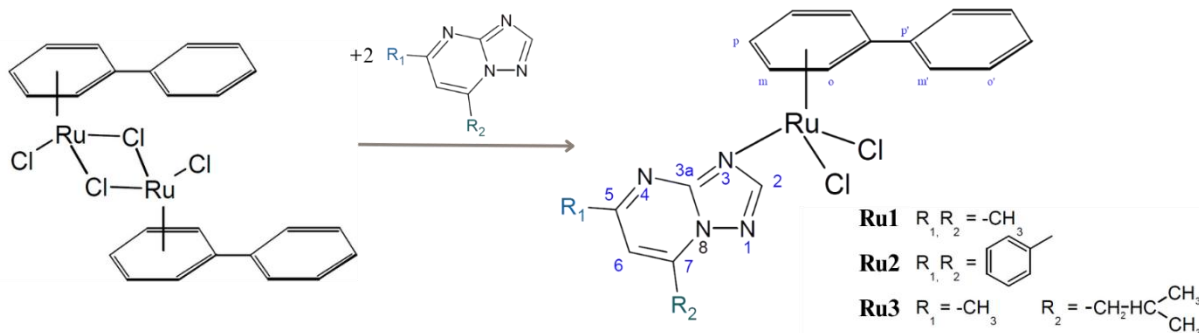
### 9.3.1 Synteza prekursorowego dimerycznego kompleksu rutenu(II) $[\{(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\mu\text{-Cl})\}_2\text{Cl}_2]$

716,5 mg (0,0345 mola) chlorku rutenu(III) rozpuszczono w 20 ml etanolu i dodano 2 ml 1,4-dihydrobifenylu. Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 14 h. Następnie mieszaninę schłodzono do 4 °C. Powstały osad przesączono i przemyto trzykrotnie 5 ml eteru dietylowego. Po wysuszeniu w liofilizatorze otrzymano 1,1 g produktu (wydajność 48,9%).

### 9.3.2 Synteza $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{dmtpt})\text{Cl}_2]$ , $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{dptp})\text{Cl}_2]$ i $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{ibmtpt})\text{Cl}_2]$

50,0 mg (0,075 mmola)  $[\{(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\mu\text{-Cl})\}_2\text{Cl}_2]$  dodano odpowiednio do 23,1 mg (0,15 mmola) **dmtpt** lub 42,2 mg (0,15 mmola) **dptp** rozpuszczonych w 15 ml metanolu

lub 29,4 mg (0,15 mmola) **ibmtp** rozpuszczonego w 15 ml wody destylowanej. Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 15 h. Osady powstałe po odparowaniu rozpuszczalników przemyto trzykrotnie 5 ml eteru dietylowego. Po wysuszeniu w liofilizatorze otrzymano 45,0 mg **Ru1** (wydajność 62,01%), 52,1 mg **Ru2** (wydajność 57,13%) lub 68,5 mg **Ru3** (wydajność 86,76%) (Rys. 21).



Rys. 21 Schematyczne przedstawienie metodyki syntezy  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{dmtpt})\text{Cl}_2]$  (**Ru1**),  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{dptpt})\text{Cl}_2]$  (**Ru2**) i  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{ibmtp})\text{Cl}_2]$  (**Ru3**).

#### Wybrane parametry strukturalne dla kompleksu Ru1:

**MS ESI LR:**  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{dmtpt})\text{Cl}_2]^+$  m/z 427,99;

**Analiza elementarna (%<sub>eksp.</sub>/<sub>teor.</sub>):** %C 48,30/48,11; %H 3,98/3,83; %N 11,61/11,81;

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 8,73 (H<sub>2</sub>); 6,91 (H<sub>6</sub>); 2,71 (5-CH<sub>3</sub>); 2,74 (7-CH<sub>3</sub>); 6,42 (o-ph); 7,74 (o-ph'); 6,08 (m-ph); 7,35 (m-ph'); 6,24 (p-ph); 7,35 (p-ph');

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 156,0 (C<sub>2</sub>); 154,0 (C<sub>3a</sub>); 166,3 (C<sub>5</sub>); 111,8 (C<sub>6</sub>); 148,5 (C<sub>7</sub>); 25,3 (5-CH<sub>3</sub>); 16,8 (7-CH<sub>3</sub>); 96,6 (ph); 135,3 (ph'); 84,9 (o-ph); 128,7 (o-ph'); 80,8 (m-ph); 128,7 (m-ph'); 85,5 (p-ph); 129,2 (p-ph');

**<sup>15</sup>N NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** -112,1 (N<sub>1</sub>); -218,5 (N<sub>3</sub>); -116,2 (N<sub>4</sub>); -155,3 (N<sub>8</sub>);

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1630 ν(C=N); 1550 ν(N=N); 290, 302 ν(Pt-Cl);

#### Wybrane parametry strukturalne dla kompleksu Ru2:

**MS ESI LR:**  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{dptpt})\text{Cl}_2]^+$  m/z 597,02;

**Analiza elementarna (%<sub>eksp.</sub>/<sub>teor.</sub>):** %C 58,10/58,19; %H 3,77/3,71; %N 9,33/9,36;

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 8,84 (H2); 7,72 (H6); 8,20 (5-ph); 8,03 (7-ph); 6,42 (o-ph); 7,73 (o-ph'); 6,20 (m-ph); 7,34 (m-ph'); 6,33 (p-ph); 7,35 (p-ph');

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 156,7 (C2); 155,0 (C3a); 163,4 (C5); 108,0 (C6); 149,6 (C7); 127,9 (5-ph); 129,5 (7-ph); 97,0 (ph); 135,0 (ph'); 84,6 (o-ph); 128,6 (o-ph'); 81,4 (m-ph); 128,7 (m-ph'); 85,1 (p-ph); 129,3 (p-ph');

**<sup>15</sup>N NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** -111,1 (N1); -217,0 (N3); -123,7 (N4); -159,7 (N8);

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1609 ν(C=N); 1547 ν(N=N); 295, 280 ν(Pt-Cl);

### **Wybrane parametry strukturalne dla kompleksu Ru3:**

**MS ESI LR:** [(η<sup>6</sup>-bip)Ru(ibmtp)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> m/z 515,03;

**Analiza elementarna (%<sub>eksp.</sub>/<sub>teor.</sub>):** %C 51,51/51,16; %H 4,74/4,87; %N 10,86/10,85;

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 8,68 (H2); 6,85 (H6); 2,73 (5-CH<sub>3</sub>); 2,94 (7-CH<sub>2</sub>); 2,26 (7-CH); 0,97 (7-CH<sub>3</sub>); 6,40 (o-ph); 7,73 (o-ph'); 6,11 (m-ph); 7,35 (m-ph'); 6,24 (p-ph); 7,35 (p-ph');

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 155,9 (C2); 154,1 (C3a); 166,2 (C5); 111,6 (C6); 151,5 (C7); 25,4 (5-CH<sub>3</sub>); 39,2 (7-CH<sub>2</sub>); 26,4 (7-CH); 22,4 (7-CH<sub>3</sub>); 96,9 (ph); 135,3 (ph'); 84,5 (o-ph); 128,7 (o-ph'); 81,3 (m-ph); 128,7 (m-ph'); 84,9 (p-ph); 129,2 (p-ph');

**<sup>15</sup>N NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** -112,0 (N1); -219,0 (N3); -116,5 (N4); -156,0 (N8);

**IR (cm<sup>-1</sup>):** νC=N 1609; νN=N 1546; νPt-Cl 296, 280;

## **10. Metodyka badań i aparatura**

### **10.1 Charakterystyka strukturalna związków koordynacyjnych**

#### **10.1.1 Analiza elementarna**

Analizę elementarną kompleksów Pt(II) i Ru(II) wykonano na aparacie Vario MACRO CHN firmy ELEMENTAR Analysensysteme GmbH.

#### **10.1.2 Spektrometria mas**

Pomiary spektrometrii mas dla kompleksów **Pt1 - Pt3** i **Ru1 - Ru3** przeprowadzono przy użyciu spektrometru masowego Synapt G2-S (Waters)

wyposażonego w źródło jonów elektrorozpylanych (ESI) i analizator mas kwadrupolowy z pomiarem czasu przelotu (qTOF), natomiast dla kompleksów **Pt4 - Pt7** przy użyciu spektrometru masowego Synapt G2-S (Waters) wyposażonego w źródło jonów elektrorozpylanych oraz analizator mas kwadrupolowych z analizatorem czasu przelotu. Zdolność rozdzielcza analizatora TOF wynosiła 35000 FWHM.

### 10.1.3 Spektroskopia wielojądrowego rezonansu magnetycznego

Widma NMR zarejestrowano na spektrofotometrze Varian INOVA 500, pracującego przy 499,8; 125,7; 50,6 i 107,4 MHz odpowiednio dla  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ . Odnośnikiem dla  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  był TMS, dla  $^{15}\text{N}$   $\text{CH}_3\text{NO}_2$  oraz  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  dla  $^{195}\text{Pt}$ . Jako rozpuszczalnik dla kompleksów **Pt1**, **Pt2**, **Ru1**, **Ru2**, **Ru3** i odpowiadających im ligandów N-donorowych zastosowano  $\text{CDCl}_3$  natomiast dla kompleksów **Pt4 - Pt8** i odpowiadających im ligandów N-donorowych zastosowano DMF- $\text{D}_7$ .

### 10.1.4 Spektroskopia oscylacyjna

Widma oscylacyjne wykonano na aparacie aparatu Vertec 70v FTIR, wykorzystującym metodę osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR), w zakresie  $4000\text{ cm}^{-1}$  -  $200\text{ cm}^{-1}$ .

### 10.1.5 Rentgenowska analiza strukturalna

Monokryształy związków koordynacyjnych wykorzystane do analiz rentgenostrukturalnych otrzymano następującymi metodami:

- monokryształ **Pt2a** → rekrytalizacja bezpostaciowego osadu poprzez rozpuszczenie w acetonie i umieszczenie w szczelnym naczyniu wypełnionym eterem dietylowym;
- monokryształy **Pt6** i **Pt7** → rekrytalizacja bezpostaciowych osadów w mieszaninie DMF:metanol (v/v 3:1), a następnie powolne odparowanie rozpuszczalników;
- monokryształ **Ru1** → rekrytalizacja bezpostaciowego osadu w mieszaninie etanol:eter dietylowy (v/v 1:1), a następnie powolne odparowanie rozpuszczalników;
- monokryształ **Ru3** → powolne odparowanie rozpuszczalnika z roztworu mieszaniny reakcyjnej.

W rentgenowskiej analizie strukturalnej dane dyfrakcyjne dla monokryształów **Ru1** i **Ru3** zebrano używając dyfraktometru CCD Oxford Sapphire i źródła promieniowania  $\text{MoK}\alpha$   $\lambda = 0,71073\text{ \AA}$ , natomiast do analizy pozostałych struktur krystalicznych użyto

XtaLAB Synergy (Dualflex) z detektorem HyPix i źródłem promieniowania  $\text{CuK}\alpha$   $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$  dla **Pt2** i  $\text{MoK}\alpha$   $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$  dla **Pt5** i **Pt6**.

### 10.1.6 Teoria funkcjonału gęstości

W badaniach DFT połączono zestaw baz funkcjonału wB97XD i LANL2DZ. Aby dokładniej ocenić wpływ środowiska wodnego, zastosowano standardowy model PCM. (ang. Polarizable Continuum Model) zaimplementowany w programie Gaussa 16.<sup>132</sup>

### 10.1.7 Transmisyjna Mikroskopia Elektronowa

Obrazowanie miceli metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykonano przy użyciu kamery TEM firmy FEI Europe, modelu Tecnai F20 X-Twin 2011, serii mikroskopów Tecnai G2.

### 10.1.8 Dynamiczne Rozpraszanie Światła

Do pomiaru średnic hydrodynamicznych miceli zastosowano system Malvern Zetasizer Nano ZS wykorzystujący dynamiczne rozpraszanie światła.

### 10.1.9 Spektrometria masowa z plazmą indukcyjnie sprzężoną

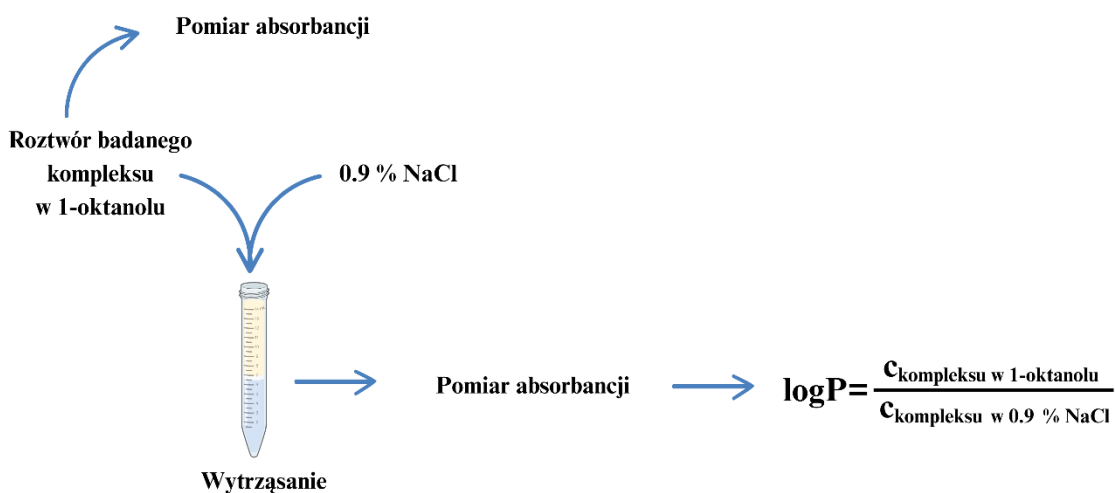
Analizy ICP-MS przeprowadzono przy użyciu spektrometru mas NexION 2000 (PerkinElmer) w standardowym trybie pomiaru. Urządzenie skalibrowano przy użyciu wzorców platyny (Pt) i rutenu (Ru) (PerkinElmer) w zakresie stężeń 1 – 50  $\mu\text{g/l}$ . Próbki zmineralizowane wodą królewską w stosunku 1:2 rozcieńczono 100 - krotnie 1%  $\text{HNO}_3$  przed pomiarem, a następnie zarejestrowano sygnały dla izotopów  $^{194}\text{Pt}$  i  $^{102}\text{Ru}$ . Zawartość platyny i rutenu w próbkach obliczono na podstawie odpowiednich krzywych kalibracyjnych.

## 10.2 Badania biologiczne

### 10.2.1 Lipofilowość

Lipofilowość kompleksów **Pt1**, **Pt3**, **Pt4 - Pt8** i **Ru1 - Ru3** wyznaczono metodą wytrząsania w układzie dwóch niemieszających się rozpuszczalników: n-oktanolu i 0,9 % roztworu NaCl (Rys. 22). Rozpuszczalniki uprzednio saturowano przez okres 7 dni. Następnie przygotowano wyjściowe roztwory badanych kompleksów w 1-oktanolu ( $c_0 \text{ kompleks} = 0,06 \text{ mg/ml}$ ) i zarejestrowano ich widma spektrofotometryczne. W kolejnym etapie zmieszano 2 ml roztworu  $c_0 \text{ kompleks}$  z 2 ml 0,9 % roztworu NaCl, wytrząsano przez

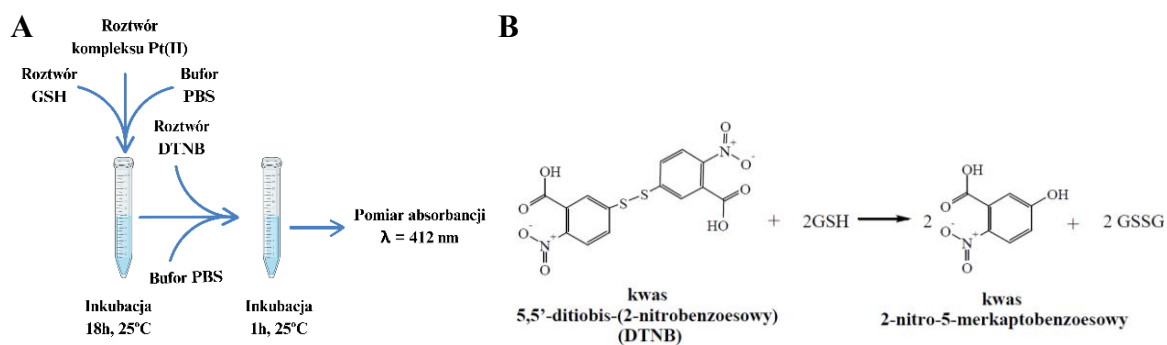
30 min., po czym oddzielono fazę organiczną od nieorganicznej. Roztwór warstwy oktanolowej poddano ponownie analizie spektrofotometrycznej, a z różnicy absorbancji roztworów wyjściowych i roztworów po wytrząsaniu wyznaczono zmianę stężeń, a następnie wartość logP. Dla każdego ze związków oznaczenie powtórzono pięciokrotnie.



Rys. 22 Schematyczne przedstawienie metodyki wyznaczania lipofilowości.

### 10.2.2 Reaktywność względem glutationu

Reaktywność kompleksów platyny(II) względem glutationu wyznaczono przy użyciu metody Ellmana (Rys. 23 A). Procedura ta opiera się na redukcji kwasu 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowego) (DTNB), przez obecne w GSH grupy tiolowe, do kwasu 2-nitro-5-merkaptobenzoesowego (Rys. 23 B), wykazującego maksimum absorbancji przy długości fali  $\lambda = 412$  nm. W wyniku tej reakcji GSH przechodzi w formę utlenioną GSSG.

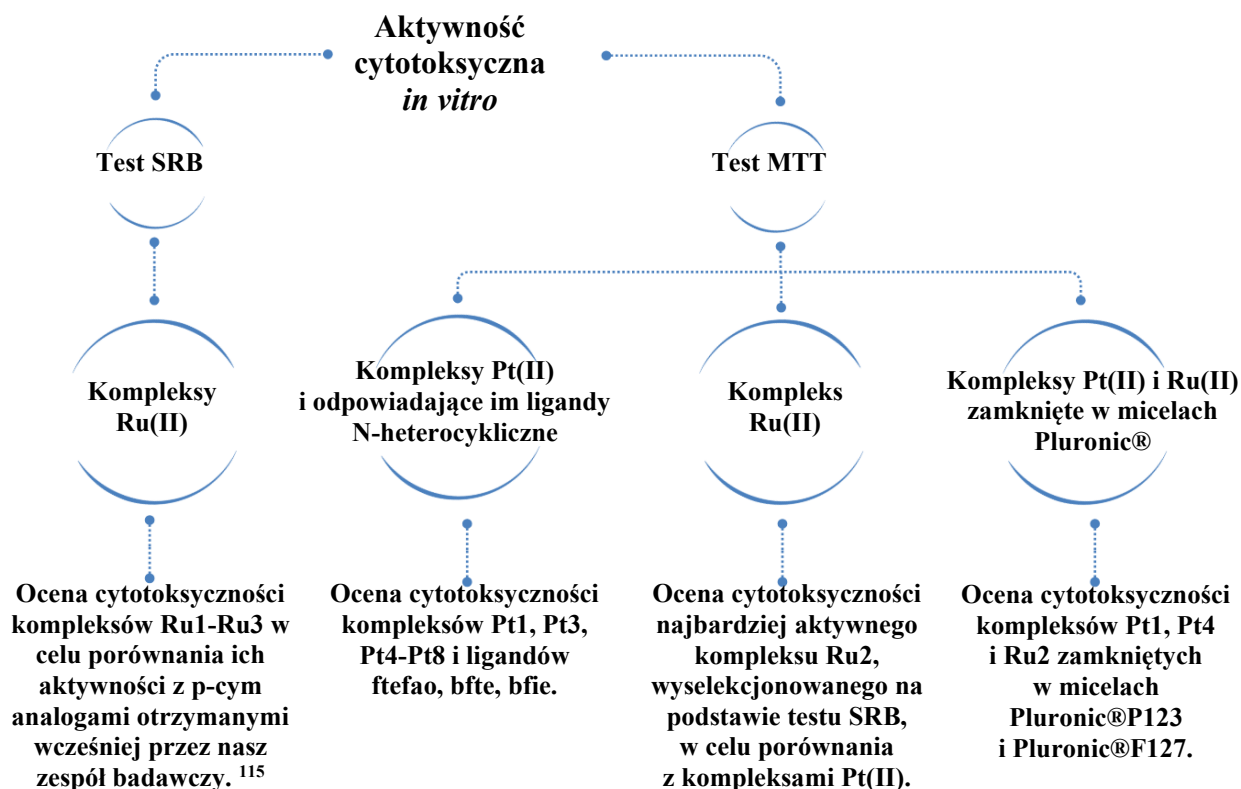


Rys. 23 Schematyczne przedstawienie wyznaczenia reaktywności kompleksów Pt(II) względem GSH przy użyciu metody Ellmana.

Sporządzono roztwory wyjściowe: i) wodny roztwór GSH ( $c_{0 \text{ GSH}} = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ ), ii) roztwór DTNB w buforze PBS ( $c_{0 \text{ DTNB}} = 2,50 \times 10^{-3} \text{ M}$ ), iii) roztwory kompleksów Pt(II) w etanolu (Pt1), DMF (Pt3 - Pt7) lub wodzie destylowanej (cisplatyna) ( $c_{0 \text{ kompleks}} = 5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$ ). Następnie przygotowano próby badane poprzez zmieszanie 0,1 - 1,0 ml roztworu  $c_{0 \text{ GSH}}$ , 1,0 ml roztworu  $c_{0 \text{ kompleks}}$  i uzupełnienie buforem PBS do 10 ml. Przygotowane w ten sposób mieszaniny inkubowano przez 18 h w 25 °C. Po tym czasie 0,5 ml każdej próby zmieszano z 0,5 ml roztworu  $c_{0 \text{ DTNB}}$ , uzupełniono buforem PBS do 10 ml i ponownie inkubowano przez 1 h w 25 °C. Otrzymane w ten sposób mieszaniny zbadano spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 412 \text{ nm}$  i porównano wartości stężeń GSH w roztworach przed i po inkubacji z badanymi związkami. Dla każdego ze związków oznaczenie powtórzono dwukrotnie.

### 10.2.3 Aktywność cytotoksyczna *in vitro*

Aktywność cytotoksyczną *in vitro* kompleksów Pt(II) i Ru(II) zbadano przy użyciu dwóch różnych testów: i) testu z barwieniem sulforodaminą B (SRB), ii) testu z barwieniem bromkiem 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazoliowym (MTT) (Rys. 24).



Rys. 24 Zestawienie przeprowadzonych w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej badań cytotoksyczności *in vitro* kompleksów Pt(II) i odpowiadających im ligandów N-heterocyklicznych oraz kompleksów Ru(II).

Aktywność cytotoksyczną *in vitro* kompleksów **Ru1 - Ru3** zbadano przy użyciu testu SRB, który służy do oznaczania ilości białka w żywych komórkach. SRB wiąże się z zasadowymi aminokwasami białek komórkowych, a ilość związanego barwnika jest proporcjonalna do liczby żywych komórek.

Związki przebadano w panelu trzech ludzkich linii komórek nowotworowych: piersi (T47D), płuca (A549), jelita grubego (LoVo) oraz linii komórkowej prawidłowych mysich fibroblastów (BALB3T3). Komórki wysiano na płytce 96-dołkowej w gęstości  $3 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>. Przygotowano roztwory wyjściowe kompleksów **Ru1 - Ru3** poprzez rozpuszczenie 1 mg kompleksu w 100  $\mu$ l DMSO. Roztwory te rozcieńczono następnie odpowiednimi pożywkami do stężeń końcowych 0,1 - 100 mg/ml. Po 24 h wstępnej inkubacji komórek pożywki usunięto i dodano roztwory końcowe badanych związków. Komórki hodowano następnie przez 72 h. Po inkubacji roztwory końcowe badanych związków usunięto, do wszystkich dołków dodano odczynnik SRB, a następnie próbki zbadano spektrofotometrycznie przy analitycznej długości fali  $\lambda = 540$  nm za pomocą czytnika Synergy H4 Hybrid Reader. Dla każdego z badanych związków koordynacyjnych Ru(II) oznaczenie powtórzono trzykrotnie. Oceniono również potencjalny wpływ DMSO w zastosowanych stężeniach. Nie zaobserwowano zmian w żywotności komórek pomiędzy kontrolą standardową, a kontrolą inkubowaną z DMSO.

Aktywność cytotoksyczną *in vitro* kompleksów **Pt1, Pt3 i Pt4 - Pt8** oraz **Ru1** i ligandów **ftfeao, bfte i bfie** wykonano przy użyciu testu MTT, który pozwala na ocenę aktywności metabolicznej komórek. Analiza ta opiera się na przekształcaniu rozpuszczalnego w wodzie MTT w nierozpuszczalny formazan przez metabolicznie aktywne komórki. Analityczna długość fali absorpcji formazanu wynosi  $\lambda = 570$  nm, a zmierzony spektrofotometrycznie sygnał jest proporcjonalny do liczby żywych komórek.

Związki przebadano w panelu ludzkich linii komórek nowotworowych: płuca (A549) oraz pęcherza (T24, HT1376, HB-CLS-1 i 5637), a także jednej linii komórek prawidłowych izolowanych z moczowodu (SV-HUC-1). Komórki wysiano na płytce 96-dołkowej w gęstości  $5 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup> (T24 i A549),  $10 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup> (HT1376),  $20 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup> (5637) lub  $25 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup> (SV-HUC-1). Przygotowano roztwory wyjściowe badanych związków w etanolu (**ftfeao, Pt1**), DMF (**bfte, bfie, Pt3 i Pt4 - Pt8**) lub DMSO (**Ru1**) o stężeniu 1 mM. Roztwory te rozcieńczono następnie odpowiednimi pożywkami do stężeń końcowych 1 - 10  $\mu$ M (**Pt1, Pt3 i Pt4 - Pt8, ftfeao, bfte, bfie**) lub 5 - 25  $\mu$ M (**Ru1**). Po 24 h wstępnej inkubacji komórek pożywki

usunięto i dodano roztwory końcowe badanych związków. Komórki hodowano następnie przez 72 h. Po inkubacji roztwory końcowe badanych związków usunięto, do wszystkich dołków dodano odczynnik MTT o stężeniu 1 mg/ml, a następnie inkubowano przez 2 h w temperaturze 37 °C. Po tym czasie dodano DMSO w celu rozpuszczenia formazanu, a próbki zbadano spektrofotometrycznie przy analitycznej długości fali  $\lambda = 570$  nm za pomocą czytnika mikropłytek Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific). Wartości absorbancji dla próby ślepej odjęto od wszystkich badanych dołków. Oceniono również potencjalny wpływ rozpuszczalników organicznych w zastosowanych stężeniach. Nie zaobserwowano zmian w żywotności komórek pomiędzy kontrolą standardową, a kontrolą inkubowaną z rozpuszczalnikami organicznymi.

Tę samą procedurę zastosowano dla kompleksów **Pt1**, **Pt4** i **Ru1** zamkniętych w micelach Pluronic®, z tą różnicą, że micelle zawieszono w buforze PBS, a stosowane stężenia mieściły się w zakresie 0,05 - 1,5  $\mu$ M.

Dla każdego z badanych kompleksów Pt(II) i Ru(II), ligandów **fffeo**, **bfte** i **bfi** oraz kompleksów Pt(II) i Ru(II) zamkniętych w micelach oznaczenie powtórzono trzykrotnie.

#### 10.2.4 Aktywność antyproliferacyjna *in vitro*

Bromodeoksyurydynę (BrdU) użyto do oceny wpływu kompleksów na proliferację komórek. Test opiera się na inkorporacji BrdU do DNA podczas replikacji i jego późniejszej detekcji za pomocą przeciwciała anti-BrdU poprzez ilościowe obrazowanie fluorescencyjne.

Komórki z linii HT1376, T24, 5637, SV-HUC-1 wysiano na płytki 96-dołkowe w takiej samej gęstości jak w przypadku testu MTT. Roztwory badanych kompleksów Pt(II) i Ru(II) również przygotowano analogicznie jak w przypadku testu MTT.

Po 24 h wstępnej inkubacji komórek usunięto pożywkę, dodano końcowe roztwory badanych związków i hodowano komórki przez 72 h. Roztwór BrdU dodano 24 h przed zakończeniem eksperymentu. Komórki utrwalono 4% bezmetanolem formaldehydem zawierającym 0,1% Triton X-100 przez 15 min., a następnie przemyto buforem PBS. Po utrwaleniu komórki inkubowano z 2 M HCl, a następnie z 0,01 M buforem cytrynianowym (pH = 6). Po przemyciu dodano 4% BSA (albumina surowicy bydlęcej) zawierający 0,1% Triton X-100 w celu zablokowania nieswoistych miejsc wiązania przeciwciał. Komórki barwiono sprzężonym z Alexa Fluor 488 monoklonalnym przeciwciałem anti-BrdU przez 1 h, a następnie barwiono DAPI w stężeniu 1  $\mu$ g/ml przez

15 min. Płytki wielodołkowe obrazowano za pomocą w pełni zautomatyzowanego mikroskopu IX83 z jednostką kompensacji Z-Drift (Olympus, Japonia). Najpierw ustawiono czasy obrazowania dla każdej linii komórkowej i kanału, używając próbek kontrolnych. Następnie, używając zdefiniowanych parametrów, dołki skanowano za pomocą obiektywu LUCPlanFL N 0,45NA 20x skorygowanego do odpowiedniej grubości dna płytki. Odległość ogniskowania korygowano w czasie rzeczywistym za pomocą jednostki kompensacji Z-Drift. Próbkę z każdego powtórzenia danej linii komórkowej obrazowano przy użyciu dokładnych ustawień umożliwiających porównanie ilościowe. Po akwizycji obrazu, obrazy poddano wstępnemu przetwarzaniu za pomocą oprogramowania CellSens Dimensions (Olympus, Niemcy) i przygotowano do analizy za pomocą oprogramowania HCS ScanR (Olympus, Niemcy). Analiza wymagała najpierw ustawienia parametrów detekcji obiektów jądra komórkowego z kanału DAPI, a następnie zdefiniowania obszaru wykrytego jako obszaru wyróżnionego dla integracji sygnału fluorescencji kanału 488 (BrdU). Postprodukcja danych umożliwiła wykluczenie wszelkich obiektów błędnie wykrytych i fałszywie wykrytych. Dzięki temu podejściu, w trakcie eksperymentu analizowano wyłącznie obiekty jednokomórkowe. Proliferację komórek obliczono poprzez porównanie odsetka komórek DAPI-pozytywnych całkowitych z komórkami BrdU-pozytywnymi dzielącymi się.

### 10.2.5 Analiza cyklu komórkowego

Analiza cyklu komórkowego opiera na pomiarze ilości DNA z zastosowaniem barwnika fluorescencyjnego. Różnice w intensywności fluorescencji odpowiadają zmianom w zawartości DNA w różnych fazach cyklu komórkowego, co pozwala na identyfikację rozmieszczenia komórek w fazach G0/G1, S i G2/M.

Komórki z linii HT1376, T24, 5637, SV-HUC-1 wysiano na płytce 96-dołkowej w takiej samej gęstości jak w przypadku testu MTT. Roztwory badanych kompleksów o stężeniu 1  $\mu\text{M}$  (**Pt1**, **Pt4** i **Pt8**) lub 5  $\mu\text{M}$  (**Ru1**) również przygotowano analogicznie jak w przypadku testu MTT.

Po 24 h wstępnej inkubacji komórek pożywki usunięto i dodano roztwory końcowe badanych związków. Komórki hodowano następnie przez 72 h. Po inkubacji komórki utrwalono w zimnym etanolu (96%,  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Próbkę odwirowano i zawieszono w PBS zawierającym komercyjnie dostępny, gotowy do użycia roztwór jodku propidyny (zestaw Tali™ Cell Cycle Kit) w stężeniu 25  $\mu\text{l}/1 \times 10^6$  komórek. Analizę cyklu komórkowego przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego CytoFLEX (Beckman Coulter),

a wyniki przetworzono za pomocą oprogramowania CytExpert. Dla każdego z badanych związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) oznaczenie powtórzono trzykrotnie.

## 10.2.6 Oddziaływanie z DNA

### 10.2.6.1 Elektroforeza DNA plazmidowego pUC18

Roztwór DNA plazmidowego pUC18 w buforze TE (pH = 7,5) przygotowano zgodnie z wytycznymi producenta. Stężenie początkowe DNA plazmidowego pUC18 ( $c_{0\text{pUC18}} = 2,25$ ) zbadano spektrofotometrycznie mierząc absorbancję przy analitycznej długości fali  $\lambda = 260\text{nm}$  oraz sprawdzono stosunek absorbancji  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} > 1,8$ , aby upewnić się, że w próbce nie występują znaczące ilości białka. Przygotowano roztwory wyjściowe kompleksów w DMF (**Pt1**, **Pt4**, **Pt8**), DMSO (**Ru2**) lub wodzie destylowanej (cisplatyna) o stężeniu  $c_{0\text{kompleks}} = 1\text{ mM}$ , do dalszych rozcieńczeń posłużył bufor TE. Próbkę o stałym stężeniu pUC18 ( $c_{\text{pUC18}} = 21,5\ \mu\text{M}$ ) i zmiennym stężeniu kompleksów **Pt1**, **Pt4**, **Pt8** i **Ru2** ( $c_{\text{kompleks}} = 2,15 - 215\ \mu\text{M}$ ) oraz próbę kontrolną cisplatyny ( $c_{\text{kompleks}} = 21,5\ \mu\text{M}$ ) inkubowano 24 h w 37°C. Analogicznie oceniono również potencjalny wpływ DMF w największym zastosowanym stężeniu. Po zakończeniu inkubacji do próbek dodano bufor obciążeniowy i próbki naniesiono na żel agarozowy (1% agarozy w buforze TE + barwnik Midori Green). Elektroforezę prowadzono przy napięciu 60 V przez 2 h, a następnie żel uwidoczniono poprzez ekspozycję na światło ultrafioletowe (312 nm) za pomocą systemu obrazowania Gel Doc XR + (Bio-Rad).

### 10.2.6.2 Lepkość

Do pomiaru lepkości zastosowano wiskozymetr kapilarny typu półmikro „Cannon-Ubbelohde”. Do przyrządu wprowadzono 3,0 ml roztworu buforowego (NaCl 0,1 M, NaCac 2,5 mM, pH = 7,0) i termostatowano temperaturze 25 °C przez 15 min. Następnie dodając odpowiednie odczynniki zmierzono czasy przepływów dla: i) użytego rozpuszczalnika ( $t_{\text{rozp.}}$ ), ii) mieszaniny rozpuszczalnik + DNA ( $t_{\text{DNA}}$ ) iii) mieszaniny DNA + roztwór **Pt4** ( $t_{\text{próbka}}$ ). Wszystkie pomiary powtórzono co najmniej pięciokrotnie.

Lepkość względną DNA  $\eta/\eta_0$  obliczono ze wzoru:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t_{\text{próbka}} - t_{\text{rozp.}}}{t_{\text{DNA}} - t_{\text{rozp.}}}$$

### 10.2.6.3 Spektrofotometryczny pomiar zmian widma DNA w czasie

Do kuwety pomiarowej zawierającej 1000  $\mu\text{l}$  buforu ( $\text{NaCl}$  0,1 M,  $\text{NaCac}$  2,5 mM,  $\text{pH} = 7,0$ ) dodano 25  $\mu\text{l}$  roztworu **Pt4** ( $c_{\text{Pt4}} = 20 \mu\text{M}$ ) i 110  $\mu\text{l}$  DNA ( $c_{\text{DNA}} = 200 \mu\text{M}$ ). Natomiast do kuwety odniesienia dodano 1110  $\mu\text{l}$  buforu i 25  $\mu\text{l}$   $c_{\text{Pt4}}$  aby wykluczyć nakładanie się widm kompleksu **Pt4** i DNA. Zmiany widma spektrofotometrycznego DNA mierzono wykonując pomiar co 10 min przez 5 h.

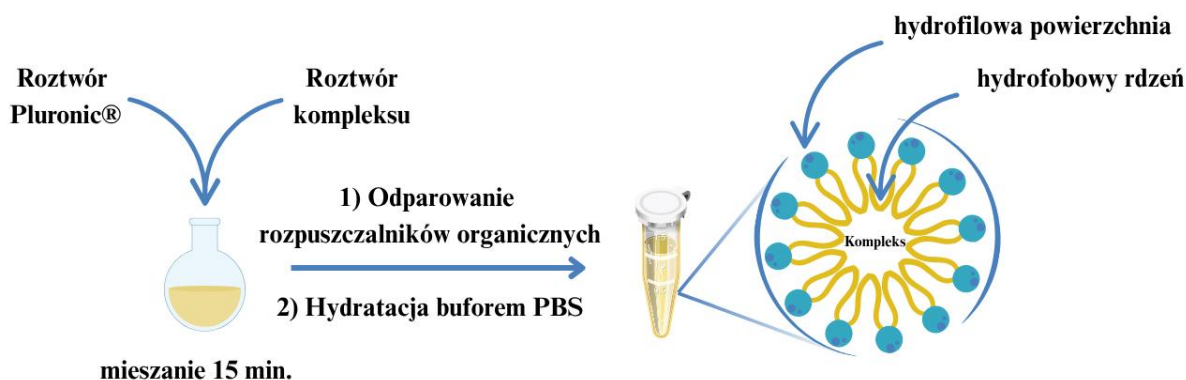
### 10.2.6.4 Miareczkowanie fluorescencyjne

Przeprowadzono miareczkowanie fluorescencyjne roztworu DNA ( $c_{\text{DNA}} = 37 \mu\text{M}$ ) bromkiem etydydy ( $\text{EtBr}$ ) aż do osiągnięcia całkowitego wysycenia DNA. Tak przygotowany układ DNA-EtBr następnie miareczkowano roztworem kompleksu **Pt4** ( $c_{\text{Pt4}} = 500 \mu\text{M}$ ). W celu określenia jaki procent DNA wiąże się z kompleksem wyznaczono krzywą zależności  $\%F/F_0$  w funkcji  $r = c_{\text{Pt4}}/c_{\text{DNA}}$ .

## 10.3 Enkapsulacja

Micele kopolimerów Pluronic®P123 i Pluronic®F127 oraz ich mieszanin otrzymano metodą hydratacji cienkowarstwowej. Technika ta polega na przygotowaniu roztworu kopolimeru w rozpuszczalniku o niskiej temperaturze wrzenia, dodaniu roztworu odpowiedniego związku, a następnie odparowaniu cieczy.

Do 50 mg Pluronic®P123, Pluronic®F127 lub mieszaniny Pluronic®P123/Pluronic®F127 (m/m 3:2) rozpuszczonych w etanolu (5 ml) dodano 100  $\mu\text{l}$  roztworu kompleksu ( $c_{\text{kompleks}} = 500 \mu\text{M}$ ) w chloroformie (**Pt1** i **Ru2**) lub acetonie (**Pt4**). Roztwór mieszało przez 15 min., a następnie odparowano rozpuszczalniki na wyparce obrotowej. Otrzymany film uwodniono za pomocą buforu PBS (0,01 M bufor fosforanowy, 0,0027 M  $\text{KCl}$ , 0,137 M  $\text{NaCl}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ) w celu uzyskania wodnej zawiesiny kompleksów zamkniętych w micelach Pluronic®P123, Pluronic®F127 lub Pluronic®P123/Pluronic®F127 (Rys. 25). Zawiesinę przefiltrowano przez filtry strzykawkowe PES o wielkości porów 0,22  $\mu\text{m}$ . Stężenia badanych kompleksów Pt(II) i Ru(II) w micelach określono za pomocą spektrometrii masowej z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-MS). Do pomiaru rozkładu wielkości cząstek w roztworze zastosowano dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), a do potwierdzenia rozmiarów i morfologii otrzymanych miceli wykorzystano transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).



Rys. 25 Schematyczne przedstawienie metodyki enkapsulacji kompleksów **Pt1**, **Pt4** i **Ru1** w micelach *Pluronic®P123*, *Pluronic®F127* i mieszaniny *Pluronic®P123/Pluronic®F127* (m/m 3:2).

## 11. Dyskusja wyników

### 11.1 Charakterystyka strukturalna

Charakterystykę strukturalną nowo otrzymanych związków koordynacyjnych platyny(II) i rutenu(II) rozpoczęto od ustalenia składu sfery koordynacyjnej w cieple stałym z zastosowaniem spektroskopii w podczerwieni i rentgenowskiej analizy strukturalnej.

Podczas analizy widm oscylacyjnych kompleksów Pt(II) i Ru(II) szczególną uwagę zwrócono na cztery charakterystyczne zakresy występowania pasm wskazujących na koordynację ligandów odchodzących (chlorkowych lub dikarboksylianowych) i nieodchodzących (N-donorowych lub S-donorowych):

- Pasma drgań rozciągających  $\nu(\text{Pt-Cl})$  w zakresie dalekiej podczerwieni, pozwalają na potwierdzenie koordynacji odchodzących ligandów chlorkowych oraz określenie izomerii *cis/trans* kompleksów.
- Pasma drgań rozciągających asymetrycznych  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$  i symetrycznych  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$  w zakresie średniej podczerwieni, dostarczają informacji o sposobie koordynacji odchodzących ligandów karboksylanowych. Zgodnie z parametrem Nakamoto<sup>133</sup>, różnica w położeniu tych pasm ( $\Delta\nu(\text{RCOO}^-) = \nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ ) porównana z analogiczną wartością charakterystyczną dla soli sodowej danego karboksylanu ( $\Delta\nu(\text{RCOONa}) = \nu_{\text{as}}(\text{COONa}) - \nu_{\text{s}}(\text{COONa})$ ) pozwala wskazać sposób koordynacji liganda. Zgodnie z tym kryterium, jeżeli  $\Delta\nu(\text{RCOO}^-) > \Delta\nu(\text{RCOONa})$  wówczas karboksylan pełni rolę liganda monodentatnego. Natomiast gdy  $\Delta\nu(\text{RCOO}^-) = \Delta\nu(\text{RCOONa})$  ligand koordynuje centra metaliczne bidentatnie

mostkująco. Ostatnią możliwością jest  $\Delta\nu(\text{RCOO}^-) < \Delta\nu(\text{RCOONa})$ , wówczas ligand wiąże się w sposób bidentatny chelatujący.

- Pasma drgań rozciągających  $\nu(\text{N}=\text{N})$  i  $\nu(\text{C}=\text{N})$  rejestrowane w zakresie średniej podczerwieni są charakterystyczne dla ugrupowań azolowych. Zestawienie położenia tych sygnałów w widmach IR związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) z ich lokalizacją w odpowiednich nieskoordynowanych ligandach umożliwia obliczenie przesunięć koordynacyjnych ( $\Delta\nu_{\text{koord.}} = \nu_{\text{kompleks}} - \nu_{\text{ligand}}$ ), a tym samym ocenę udziału donorowych atomów azotu pierścienia triazolowego w wiązaniu z atomem metalu.
- Pasma drgań rozciągających S=O charakterystyczne dla cząsteczki DMSO występują w zakresie średniej podczerwieni. Pojawienie się takiego pasma wskazuje na koordynację S-donorowej cząsteczki DMSO z atomem centralnym.

W dalszej kolejności skład sfery koordynacyjnej związków kompleksowych Pt(II) i Ru(II), sugerowany na podstawie spektroskopii w podczerwieni, został uzupełniony o dane krystalograficzne dla wybranych związków koordynacyjnych. Wyznaczenie struktury krystalicznej metodą dyfrakcji rentgenowskiej wymaga wyizolowania monokryształów o odpowiedniej jakości, jednorodności i rozmiarze, zapewniających uzyskanie ostrych refleksów dyfrakcyjnych. Liczne próby krystalizacji w różnych warunkach doprowadziły do otrzymania aż 5 monokryształów związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) odpowiednich do badań.

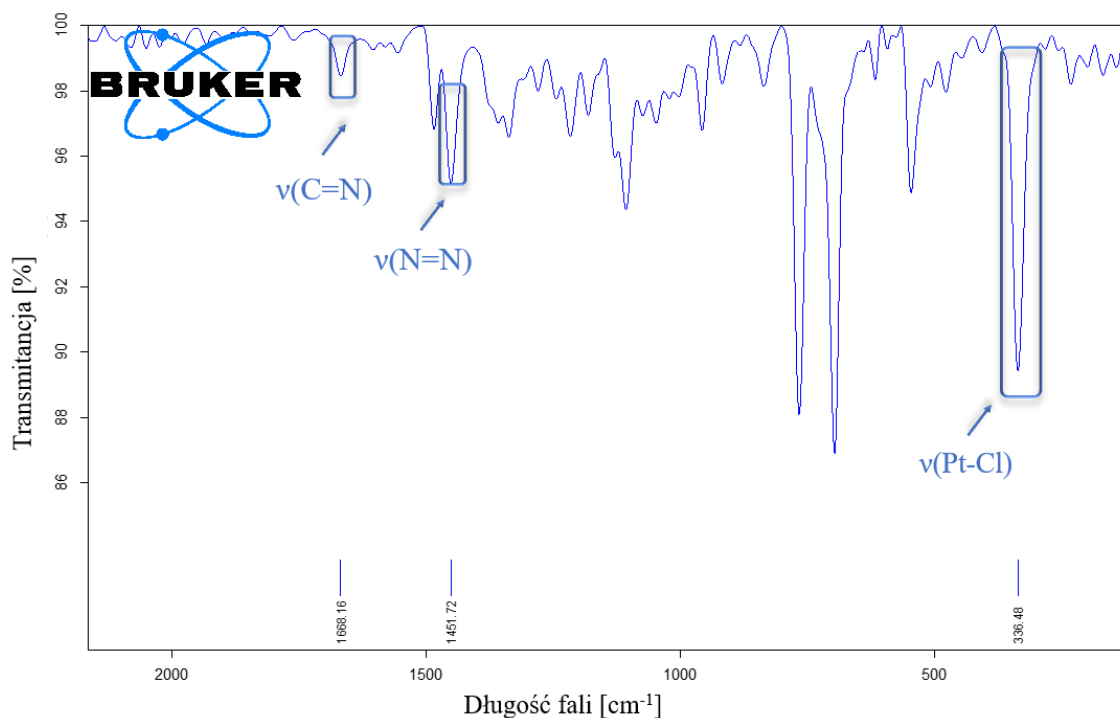
W kontekście potencjalnych zastosowań syntezyowanych związków koordynacyjnych platyny(II) i rutenu(II) istotne jest również poznanie ich struktury w roztworze, co określono przy użyciu spektroskopii NMR jąder  $^{195}\text{Pt}$  (wyłącznie dla związków Pt(II)),  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  oraz  $^{15}\text{N}$ . Analiza widm polegała m.in. na zidentyfikowaniu i porównaniu położenia odpowiednich sygnałów rezonansowych badanych kompleksów ( $\delta_{\text{kompleks}}$ ) i substratów ( $\delta_{\text{substrat}}$ ) lub ligandów ( $\delta_{\text{ligand}}$ ), co umożliwiło obliczenie przesunięć koordynacyjnych  $\Delta_{\text{koor.}} = \delta_{\text{kompleks}} - \delta_{\text{substrat}}$  lub  $\Delta_{\text{koor.}} = \delta_{\text{kompleks}} - \delta_{\text{ligand}}$  i ustalenie składu sfery koordynacyjnej.

### 11.1.1 Charakterystyka strukturalna związków koordynacyjnych Pt(II) z (1S,4R,5R)-4-(4-fenilo-1H-1,2,3-triazol-1-ylo)-2-((S)-1-feniloetylo)-2-azabicyklo[3.2.1]oktanem

W widmie oscylacyjnym kompleksu **Pt1** (Rys. 26) zarejestrowano pasmo o symetrycznym kształcie przy  $337\text{ cm}^{-1}$ , które przypisano drganiom rozciągającym  $\nu(\text{Pt-Cl})$ . Natomiast w przypadku kompleksu **Pt2** w tym samym obszarze częstotliwości występuje pasmo o niesymetrycznym kształcie możliwe do rozdzielenia na dwie składowe o częstościach  $342\text{ cm}^{-1}$  oraz  $317\text{ cm}^{-1}$ . Zaobserwowane różnice w kształtach pasm drgań rozciągających  $\nu(\text{Pt-Cl})$  sugerują odmienne ułożenie ligandów chlorkowych wokół atomu centralnego. Jak wiadomo, dichlorkowe kompleksy platyny(II) o geometrii płasko-kwadratowej mogą tworzyć dwa izomery geometryczne *cis* lub *trans*. Zgodnie z teorią grup izomer *cis* należy do grupy punktowej  $C_{2v}$ , w której drgania rozciągające wiązania Pt-Cl są aktywne w widmie IR i odpowiadają dwóm reprezentacjom  $A_1$  oraz  $B_1$ . Natomiast izomer *trans* charakteryzuje się symetrią  $D_{2h}$ , dla której tylko jedno drganie rozciągające Pt-Cl jest aktywne w widmie IR. Zatem obecność pojedynczego, symetrycznego pasma w widmie kompleksu **Pt1** sugeruje, że jony chlorkowe w związku znajdują się w pozycji *trans*, podczas gdy niesymetryczność pasma obserwowana w widmie kompleksu **Pt2** świadczy o izomerii *cis*.

Z kolei pasma drgań rozciągających  $\nu(\text{N=N})$  pierścienia triazolowego w widmach oscylacyjnych kompleksów **Pt1** i **Pt2** występują odpowiednio przy  $1452\text{ cm}^{-1}$  i  $1461\text{ cm}^{-1}$ . W wyniku kompleksowania obserwuje się przesunięcia koordynacyjne tych pasm o  $+9\text{ cm}^{-1}$  (**Pt1**) i  $+18\text{ cm}^{-1}$  (**Pt2**). W tym samym zakresie odnotowano również pasma drgań rozciągających  $\nu(\text{C=N})$ , które dla kompleksów **Pt1** i **Pt2** pojawiają się odpowiednio przy  $1668\text{ cm}^{-1}$  i  $1664\text{ cm}^{-1}$ , a przesunięcia koordynacyjne wynoszą odpowiednio  $+64\text{ cm}^{-1}$  (**Pt1**) i  $+60\text{ cm}^{-1}$  (**Pt2**). Tak duże wartości przesunięć koordynacyjnych jednoznacznie wskazują na udział pierścienia triazolowego w tworzeniu wiązania koordynacyjnego z atomem centralnym.

Dodatkowo w widmie IR kompleksu **Pt2** zaobserwowano pasmo drgań rozciągających  $\nu(\text{S=O})$  DMSO przy  $1135\text{ cm}^{-1}$ , co potwierdza obecność S-donorowej cząsteczki DMSO w sferze koordynacyjnej badanego związku.



Rys. 26 Widmo IR związku koordynacyjnego **Pt1**.

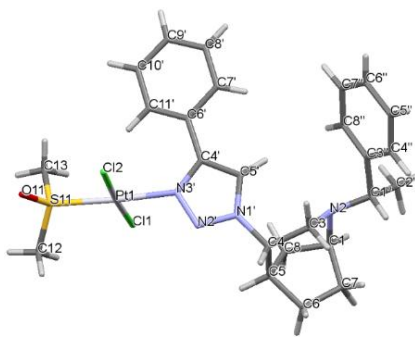
Przeprowadzona analiza widm w podczerwieni pozwoliła określić izomerię badanych kompleksów Pt(II) oraz skład ich sfery koordynacyjnej. Jednakże aby dokładniej poznać budowę molekularną kompleksu, dzięki poczynionym staraniom, z bezpostaciowego osadu kompleksu **Pt2** uzyskano monokryształ odpowiedni do badań krystalograficznych.

Rengenostrukturalna analiza kompleksu wykazała, że krystalizuje on w rombowej grupie przestrzennej  $P2_12_12_1$  przyjmując geometrię płasko-kwadratową z minimalnymi odchyleniami kątowymi (Tab. 23). Atom centralny platyny(II) jest skoordynowany z dwoma jonami chlorkowymi w pozycji *trans*, S-donorową cząsteczką DMSO i monodentatnym ligandem **ffeo** przez atom azotu N3', pochodzący z pierścienia 1,2,3-triazolu. W otoczeniu atomu centralnego platyny(II) atomy siarki i chloru tworzą długie wiązania (2,201(14) - 2,307(5) Å), natomiast najkrótsze wiązanie występuje dla Pt1-N3' (2,019(13) Å). Podobne długości wiązań odnotowano w literaturowych strukturach z fragmentem 1,2,3-triazolu koordynowanym poprzez atom N3' z platyną(II).<sup>134-136</sup>

Warto zauważyć, że izomeria kompleksu **Pt2** wskazywana na podstawie widma IR odpowiadała konfiguracji *cis*, natomiast analiza rentgenowska ujawniła formę *trans*. Dla klarowności dalszych rozważań kompleks uzyskany w postaci monokryształu

o konfiguracji *trans* oznaczono jako **Pt2a**. Zasygnalizowane powyżej zagadnienie różnicy izomerii wyjaśniono w oparciu o obliczenia teoretyczne metodą DFT.

Tab. 23 Struktura krystaliczna *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ftfeao)(DMSO)] (**Pt2a**) ze schematem numeracji numeracji i elipsoidami termicznymi z prawdopodobieństwem 30% oraz wybrane długości [Å] i kąty [°] wiązań dla monokryształu **Pt2a**.

Struktura krystaliczna	Długości wiązań [Å]			
		<b>Pt1-N3'</b>	2,019(13)	<b>Pt2-S11</b>
<b>Pt1-S11</b>		2,201(4)	<b>Pt2-N3'</b>	2,308(14)
<b>Pt1-Cl1</b>		2,302(4)	<b>Pt2-Cl1</b>	2,966(9)
<b>Pt1-Cl2</b>		2,307(5)	<b>Pt2-Cl3</b>	2,32(4)
Kąty walencyjne [°]				
<b>N3'-Pt1-S11</b>		174,1(4)	<b>S11-Pt2-N3'</b>	142,4(5)
<b>N3'-Pt1-Cl1</b>	86,1(3)	<b>S11-Pt2-Cl1</b>	75,7(3)	
<b>S11-Pt1-Cl1</b>	90,60(15)	<b>N3'-Pt2-Cl1</b>	66,9(4)	
<b>N3'-Pt1-Cl2</b>	90,1(3)	<b>S11-Pt2-Cl3</b>	127,5(11)	
<b>S11-Pt1-Cl2</b>	93,01(17)	<b>N3'-Pt2-Cl3</b>	90,1(11)	
<b>Cl1-Pt1-Cl2</b>	175,96(19)	<b>Cl1-Pt2-Cl3</b>	156,8(10)	

Jak wynika z danych przedstawionych w Tab. 24, w związku koordynacyjnym **Pt2** ligand **ftfeao** wykazuje preferencję do koordynacji z atomem platyny(II) poprzez atom azotu N3' zarówno w roztworze jak i stanie stałym. Izolowane cząsteczki **Pt2** wykazują naturalną tendencję do przyjmowania konfiguracji *cis*, która jest termodynamicznie korzystniejsza od konfiguracji *trans* o ponad 2 kcal mol<sup>-1</sup>. Próby optymalizacji geometrii odpowiadającej strukturze krystalicznej **Pt2a** wykazały, że uzyskana konformacja pozostała zasadniczo niezmienną, przy czym konfiguracja *trans* w próżni okazuje się mniej stabilna o 4,6 kcal mol<sup>-1</sup>. Wynika z tego, iż obserwowana w monokryształach konfiguracja *trans* jest najprawdopodobniej konsekwencją oddziaływań wynikających z upakowania w sieci krystalicznej. Podobne analizy dla **Pt1** pozwoliły zidentyfikować możliwe struktury przedstawione w Tab. 25, przy czym wykazano, że układ *trans* anionów chlorkowych jest energetycznie preferowany w stosunku do układu *cis* o ponad 11 kcal mol<sup>-1</sup> dla izolowanej cząsteczki.

Tab. 24 Energie względne i ładunki punktów Mullikena na wybranych atomach dla różnych struktur **Pt2**.

Struktura		Ładunki punktowe Mullikena [e] na atomie									Odległości			
		Energia względna [kcal/mol]		Pt	Cl	Cl	N1'	N2'	N3'	S	Pt-Cl [Å]	Pt-Cl [Å]	Pt-N [Å]	Pt-S [Å]
		w próżni <sup>a</sup>	w roztworze <sup>b</sup>											
<i>cis</i>	N3'	0,0	0,5	-0,0817	-0,2088	-0,2518	-0,1265	0,0898	-0,4580	0,6882	2,372	2,408	2,003	2,386
<i>cis</i>	N3'	0,3	0,0	-0,0591	-0,1996	-0,2578	-0,1336	0,0237	-0,4438	0,6850	2,363	2,407	2,009	2,399
<i>trans</i>	N3'	1,9	1,9	-0,0398	-0,2666	-0,2414	-0,1335	0,0921	-0,4511	0,7061	2,420	2,404	1,992	2,388
<i>cis</i>	N2'	3,0	3,4	-0,0514	-0,2010	-0,2148	-0,0742	-0,3260	-0,0906	0,6813	2,370	2,385	2,018	2,397
<i>trans</i>	N3'	3,0	2,7	-0,0256	-0,2622	-0,2604	-0,1360	0,0240	-0,4381	0,7005	2,412	2,408	1,993	2,394
<i>trans</i>	N2'	3,1	5,4	-0,0308	-0,2561	-0,2432	-0,0838	-0,3325	-0,0464	0,6990	2,412	2,404	1,995	2,391
<i>cis</i>	N3'	3,5	3,0	-0,0551	-0,2004	-0,2451	-0,0998	0,0466	-0,4571	0,6830	2,367	2,406	2,008	2,394
<i>trans</i>	N3'	3,7	2,8	-0,0589	-0,2628	-0,2375	-0,1346	0,0820	-0,4548	0,7046	2,417	2,401	1,993	2,391
<i>trans</i> <sup>c</sup>	N3'	4,6	2,6	-0,0596	-0,3103	-0,2025	-0,1300	0,0257	-0,4310	0,7307	2,439	2,381	1,993	2,402

<sup>a</sup> wartość bazowa energii absolutnej -1424,744188 a.u. w próżni; <sup>b</sup> wartość bazowa energii absolutnej -1424,788814 a.u. w roztworze; <sup>c</sup> zoptymalizowana struktura kryształu;

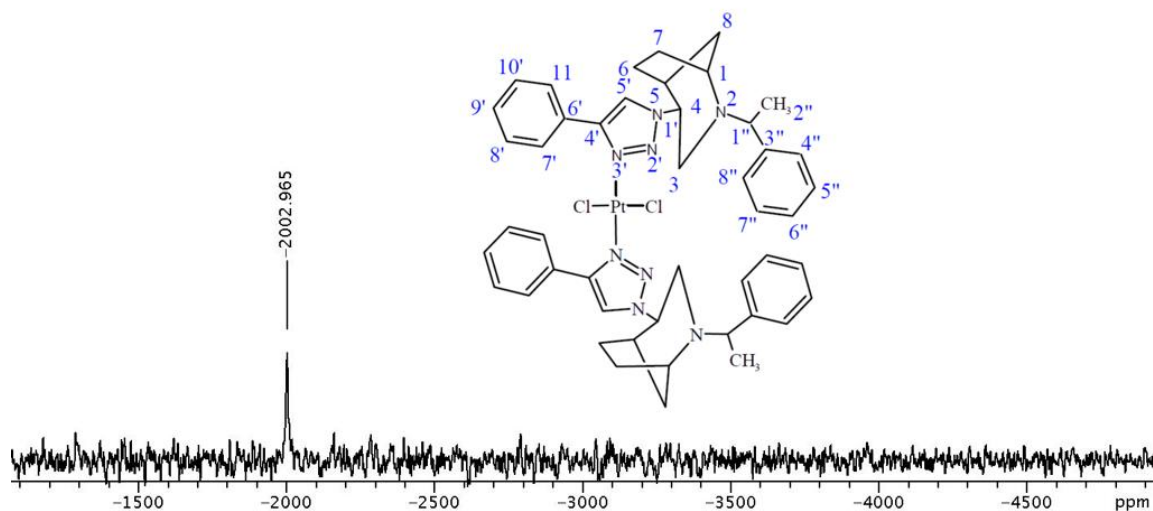
Tab. 25 Energie względne i ładunki punktów Mullikena na wybranych atomach dla różnych struktur **Pt1**.

Struktura		Ładunki punktowe Mullikena [e] na atomie							Odległości			
		Energia względna [kcal/mol]		Pt	Cl	Cl	N3'	N3'	Pt-Cl [Å]	Pt-Cl [Å]	Pt-N [Å]	Pt-S [Å]
		w próżni <sup>a</sup>	w roztworze <sup>b</sup>									
<i>trans</i>	N3', N3'	0,0	0,0	0,2237	-0,2772	-0,2773	-0,4218	-0,4219	2,419	2,419	2,002	2,002
<i>trans</i>	N3', N3'	4,6	3,6	0,2316	-0,2615	-0,2951	-0,4276	-0,4276	2,408	2,429	2,002	2,002
<i>cis</i>	N3', N3'	11,6	2,5	0,1606	-0,2266	-0,2267	-0,4354	-0,4363	2,386	2,388	2,021	2,025

<sup>a</sup> wartość bazowa energii absolutnej -2370,343196 a.u. w próżni. <sup>b</sup> Wartość bazowa energii absolutnej -2370,394477 a.u. w roztworze;

Kolejnym etapem badań było określenie struktury kompleksów platyny(II) w roztworze przy wykorzystaniu spektroskopii NMR.

W widmach  $^{195}\text{Pt}$  NMR badanych kompleksów platyny(II) zarejestrowano sygnały rezonansowe przy -2003 ppm (**Pt1**) (Rys. 27) i -2999 ppm (**Pt2**). Porównanie położenia tych sygnałów z danymi literaturowymi wskazuje na ich zgodność z wartościami przesunięć chemicznych typowych dla kompleksów Pt(II) typu  $[\text{PtCl}_2(\text{N-donor})_2]$  <sup>137–139</sup> i  $[\text{PtCl}_2(\text{S-donor})(\text{N-donor})]$ . <sup>140–142</sup> Warto również odnotować, że w obu przypadkach obserwuje się znaczące przesunięcie koordynacyjne sygnałów rezonansowych względem odpowiednich substratów:  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  dla **Pt1** ( $\delta_{\text{K}_2\text{PtCl}_4} = -1624$  ppm <sup>78</sup>,  $\Delta_{\text{koor. Pt1}} = -379$  ppm,) i *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$  dla **Pt2** ( $\delta_{\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]} = -3476$  ppm <sup>78</sup>,  $\Delta_{\text{koor. Pt2}} = +477$  ppm). Co więcej, uzyskane wartości przesunięć chemicznych pozostają w zgodzie z wynikami wcześniej opublikowanymi przez nasz zespół dla związków koordynacyjnych platyny(II) zawierających inne ligandy triazolowe. <sup>143–145</sup>

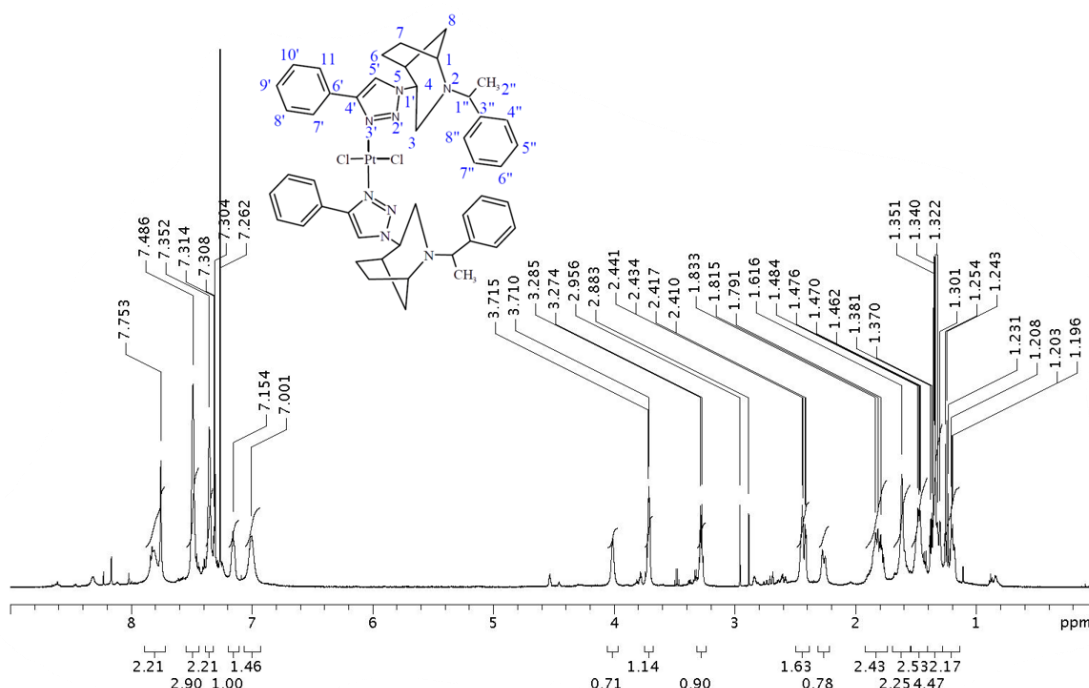


Rys. 27 Widmo  $^{195}\text{Pt}$  NMR związku koordynacyjnego **Pt1**.

Opierając się na przesłankach strukturalnych wynikających z analizy widm IR i badań X-Ray wskazujących na bezpośrednie połączenie atomu centralnego Pt(II) z pierścieniem triazolowym, w analizie widm  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  NMR szczególną uwagę zwrócono na położenie sygnałów rezonansowych pochodzących od jąder atomowych wchodzących w skład ugrupowania azolowego.

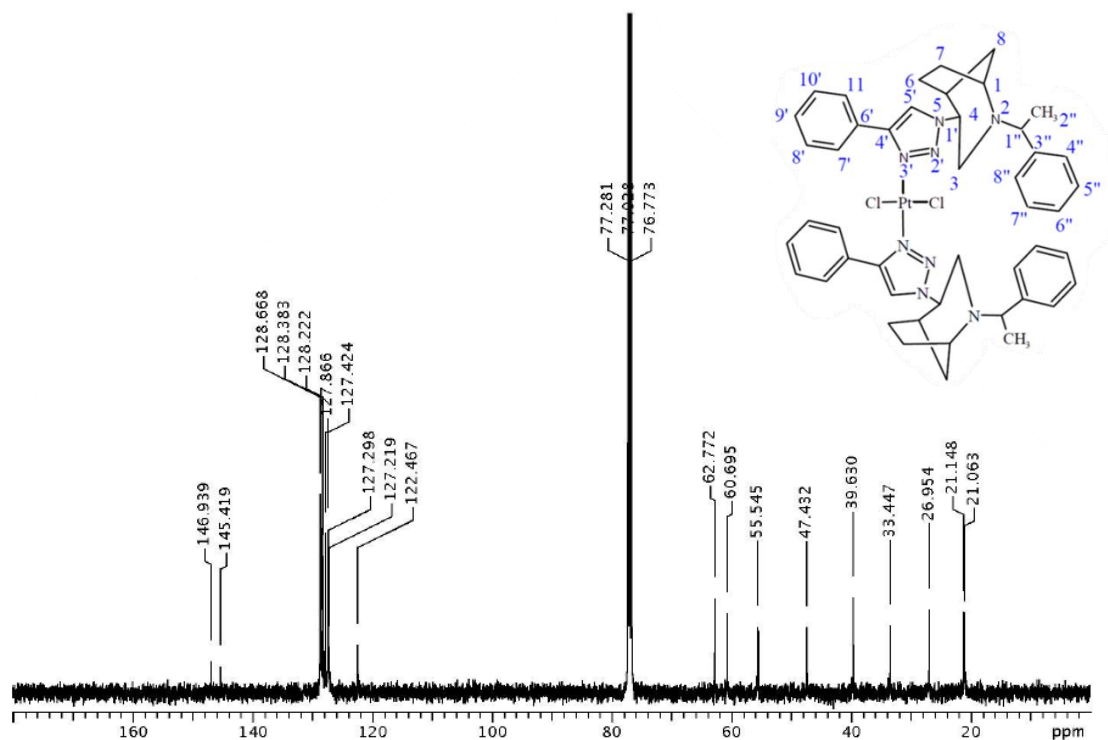
Widma  $^1\text{H}$  NMR kompleksów **Pt1** (Rys. 28) i **Pt2** wykazywały obecność singletowego sygnału rezonansowego protonu H5' pierścienia triazolowego,

występującego odpowiednio przy 7,75 ppm i 8,27 ppm, a obliczone przesunięcia koordynacyjne tego sygnału wynoszą -0,48 ppm (**Pt1**) i +0,04 ppm (**Pt2**). Takie wartości przesunięć koordynacyjnych sugerują, że pierścień triazolowy zaangażowany jest w tworzenie wiązania koordynacyjnego z atomem centralnym Pt(II). Dodatkowo, w widmie  $^1\text{H}$  NMR kompleksu **Pt2** zarejestrowano sygnały rezonansowe przy 3,41 ppm i 3,43 ppm pochodzące od grup metylowych cząsteczki DMSO. Zgodnie z teorią HSAB<sup>146</sup>, atom platyny(II), wykazuje wysokie powinowactwo do atomów siarki, w związku z czym cząsteczki DMSO, analogicznie do innych opisanych w literaturze kompleksów platyny(II)<sup>78,147–150</sup> pełnią rolę ligandów S-donorowych.



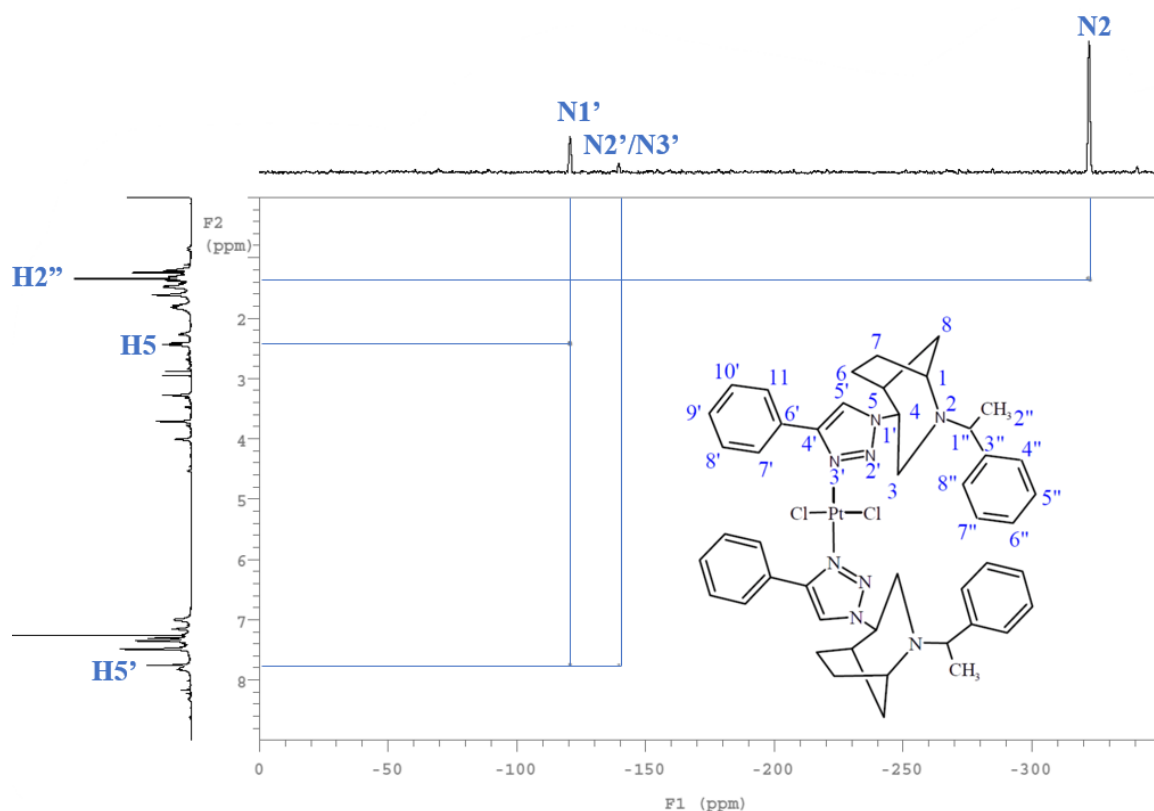
Rys. 28 Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku koordynacyjnego **Pt1**.

Zmiany spektralne obserwowane w widmach  $^1\text{H}$  NMR związków koordynacyjnych **Pt1** i **Pt2** powstałe na skutek koordynacji ligandów znajdują również odzwierciedlenie w widmach  $^{13}\text{C}$  NMR. Sygnał rezonansowy jądra C5' pierścienia triazolowego zarejestrowano przy 122,4 ppm (**Pt1**) (Rys. 29) i 123,7 ppm (**Pt2**). Wartości przesunięć koordynacyjnych tych sygnałów wynoszą +2,4 ppm (**Pt1**) i +3,7 ppm (**Pt2**) i potwierdzają wpływ składu sfery koordynacyjnej na właściwości elektronowe pierścienia triazolowego. Ponadto w widmie  $^{13}\text{C}$  NMR kompleksu **Pt2** zaobserwowano sygnały rezonansowe pochodzące od jąder atomów węgla grup metylowych cząsteczki DMSO zlokalizowane przy 43,8 ppm oraz 44,0 ppm, co stanowi kolejny dowód na obecność tej cząsteczki w sferze koordynacyjnej platyny(II).



Rys. 29 Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR kompleksu **Pt1**.

Warto jednak zaznaczyć, iż parametry spektralne uzyskane z analizy widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR nie pozwoliły jednoznacznie określić atomu donorowego z pierścienia triazolowego, dlatego w kolejnym kroku dokonano analizy widm heterokorelacyjnych  $^1\text{H}$  -  $^{15}\text{N}$  NMR. W przypadku kompleksów **Pt1** (Rys. 30) i **Pt2** w widmach  $^{15}\text{N}$  NMR zarejestrowano jedynie trzy sygnały rezonansowe. Atomom azotu N2' i N3' przypisano jeden sygnał rezonansowy przy -139,5 ppm (**Pt1**) i -126,8 ppm (**Pt2**). Jednocześnie sygnały te wykazują największe przesunięcia koordynacyjne spośród wszystkich jąder azotu. Analiza obliczonych przesunięć koordynacyjnych wykazała, że większe wartości obserwowano dla atomów azotu N2' ( $\Delta_{\text{koor. Pt1}} = -120,4$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Pt2}} = -107,7$  ppm) niż dla N3' ( $\Delta_{\text{koor. Pt1}} = -102,1$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Pt2}} = -89,3$  ppm). Jednak różnica w wartościach przesunięć koordynacyjnych pomiędzy N3' i N2' nie jest wystarczająco duża, aby jednoznacznie wskazać atom donorowy wiązania Pt-N. Jak wcześniej opisano, wyniki uzyskane na podstawie analiz IR i X-Ray sugerują, że koordynacja zachodzi przez atom N3'. Aby potwierdzić, że w roztworze również ten sam atom azotu pełni funkcję donorową, wykonano dodatkowo obliczenia metodą DFT, które wskazały, że energetycznie uprzywilejowanym atomem koordynującym w ligandzie **ffeo** jest atom azotu N3' (Tab. 24).



Rys. 30 Widmo  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC NMR kompleksu **Pt1**.

### 11.1.2 Charakterystyka strukturalna związków koordynacyjnych Pt(II) z (benzofuran-2-ylo)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylo)etenonem i 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-imidazol-1-ylo)etenonem

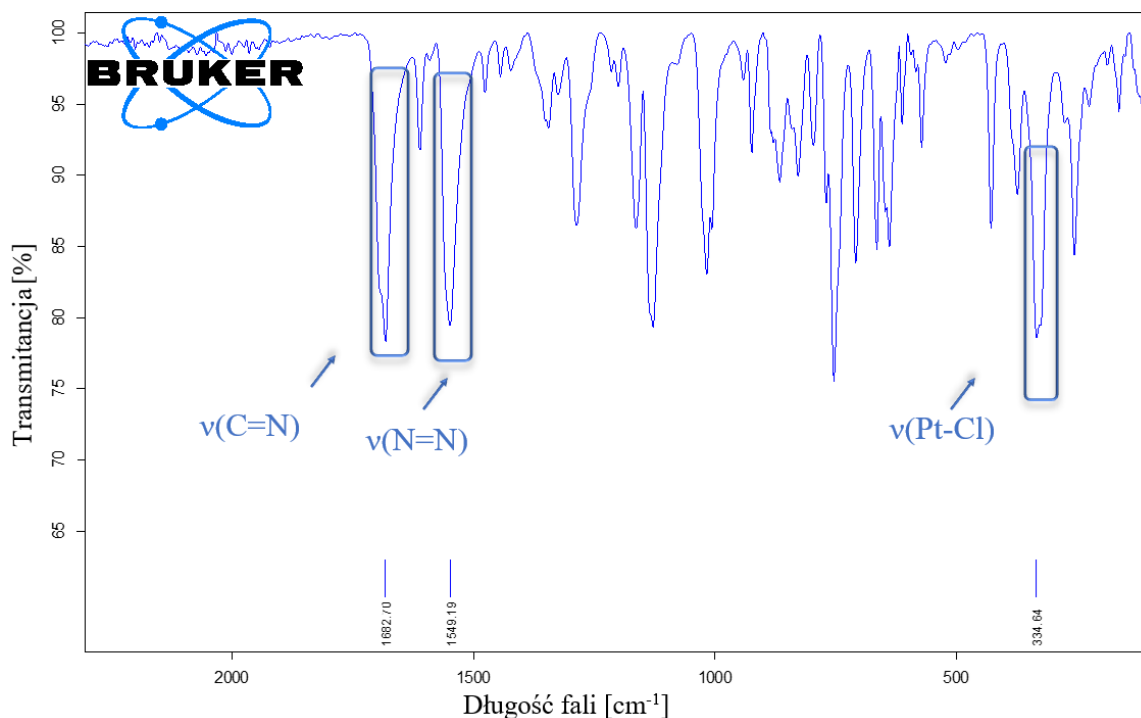
W widmach oscylacyjnych kompleksów **Pt4** - **Pt7** zarejestrowanych w zakresie dalekiej podczerwieni zaobserwowano charakterystyczne pasma drgań rozciągających wiązania  $\nu(\text{Pt}-\text{Cl})$ . W przypadku kompleksów **Pt4** (Rys. 31) i **Pt5** pasma te miały kształt niesymetryczny, jednakże niecałkowite rozdzielenie pasm spowodowało, iż przypisać im można jedynie pojedyncze sygnały o częstotliwościach  $335\text{ cm}^{-1}$  (**Pt4**) i  $323\text{ cm}^{-1}$  (**Pt5**). Natomiast w widmach kompleksów **Pt6** i **Pt7** pasma drgań rozciągających  $\nu(\text{Pt}-\text{Cl})$  miały całkowicie symetryczne kształty i zarejestrowano je odpowiednio przy  $347\text{ cm}^{-1}$  i  $345\text{ cm}^{-1}$ . Niesymetryczny kształt pasma w związkach **Pt4** i **Pt5** wskazuje na konfigurację *cis* jonów chlorkowych, podczas gdy występowanie pasm o symetrycznym wyglądzie w **Pt6** i **Pt7** sugeruje izomerię *trans*.

Z kolei informację o sposobie koordynacji odchodzącego liganda szczawianowego w związku kompleksowym **Pt8** uzyskano na podstawie analizy widma oscylacyjnego

w średniej podczerwieni, gdzie zaobserwowano pasmo asymetrycznych drgań rozciągających  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$  przy  $1668\text{ cm}^{-1}$  i pasmo symetrycznych drgań rozciągających  $\nu_s(\text{COO}^-)$  przy  $1367\text{ cm}^{-1}$ . Różnica między położeniami tych pasm wynosi  $\Delta\nu_{\text{CH}_2(\text{COONa})_2} = 321\text{ cm}^{-1}$ , co jest znacznie większą wartością niż różnica dla szczawianu sodu ( $\Delta\nu_{\text{RCOONa}} = 164\text{ cm}^{-1}$ ). Zgodnie z kryterium parametru Nakamoto wskazuje to na monodentatną koordynację grupy karboksylanowej z atomem centralnym. Ligand szczawianowy zawiera dwie grupy karboksylanowe dlatego w kompleksie **Pt8** pełni on rolę liganda bidentatnego chelatującego.

W kolejnej części badań uwagę poświęcono analizie sposobu koordynacji nieodchodzących ligandów azolowych. W widmach IR kompleksów **Pt4**, **Pt6** i **Pt8** zawierających triazolowy ligand **bft** pasma drgań rozciągających  $\nu(\text{N}=\text{N})$  zaobserwowano przy  $1556\text{ cm}^{-1}$  (**Pt6**) i  $1549\text{ cm}^{-1}$  (**Pt4** i **Pt8**). Kompleksowanie powoduje przesunięcia koordynacyjne tych pasm o  $-8\text{ cm}^{-1}$  (**Pt6**) i  $-12\text{ cm}^{-1}$  (**Pt4** i **Pt8**). Z kolei pasma drgań rozciągających  $\nu(\text{C}=\text{N})$  pierścienia triazolowego występowały przy  $1683\text{ cm}^{-1}$  (**Pt4**) i  $1694\text{ cm}^{-1}$  (**Pt6**) z przesunięciem koordynacyjnym wynoszącym  $-9\text{ cm}^{-1}$  (**Pt4**) i  $+2\text{ cm}^{-1}$  (**Pt6**). W przypadku kompleksu **Pt8** pasmo  $\nu(\text{C}=\text{N})$  zostało przysłonięte asymetrycznym pasmem drgań rozciągających  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ . Natomiast w widmach IR kompleksów **Pt5** i **Pt7** skoordynowanych z imidazolowym ligandem **bfi** obserwowane są wyłącznie pasma drgań rozciągających  $\nu(\text{C}=\text{N})$  odpowiednio przy  $1684\text{ cm}^{-1}$  i  $1693\text{ cm}^{-1}$  z przesunięciem koordynacyjnym wynoszącym  $-10\text{ cm}^{-1}$  (**Pt5**) i  $-1\text{ cm}^{-1}$  (**Pt7**). Takie wartości przesunięć koordynacyjnych świadczą o zaangażowaniu pierścieni azolowych w koordynację z atomem centralnym.

Dodatkowo w widmach **Pt6** i **Pt7** widoczne są pasma drgań rozciągających  $\nu\text{S}=\text{O}$  cząsteczki DMSO, odpowiednio przy  $1130\text{ cm}^{-1}$  i  $1136\text{ cm}^{-1}$ , potwierdzające obecność S-donorowego liganda w sferze koordynacyjnej.



Rys. 31 Widmo IR związku koordynacyjnego **Pt4**.

Strukturę kompleksów **Pt4 - Pt8** ustaloną na podstawie spektroskopii w podczerwieni udokładniono i wzbogacono o rentgenowską analizę strukturalną dzięki wyizolowaniu monokryształów **Pt6** i **Pt7**.

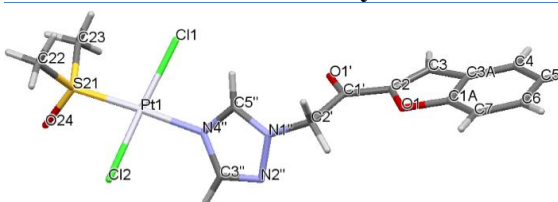
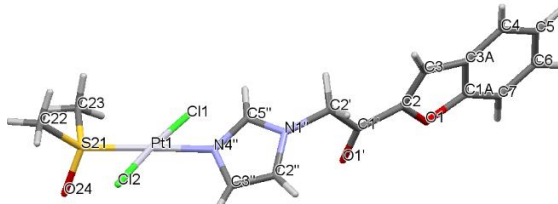
Analiza X-Ray wykazała, że kompleks **Pt6** krystalizuje w jednoskośnej grupie przestrzennej  $P2_1/c$ , natomiast **Pt7** krystalizuje w trójskośnej grupie przestrzennej  $P1$ . Oba kompleksy mają geometrię płasko-kwadratową, w której atom centralny platyny(II) jest koordynowany przez dwa jony chlorkowe w konfiguracji *trans*, cząsteczkę DMSO jako ligand S-donorowy oraz monodentatny ligand N-heterocykliczny związany przez atom azotu N4'', pochodzący z pierścienia 1,2,4-triazolu w kompleksie **Pt6** i pierścienia imidazolu w kompleksie **Pt7** (Tab. 26).

W związku koordynacyjnym **Pt6** długości wiązań między atomem centralnym platyny a atomami donorowymi N4'', Cl2, S21 są stosunkowo podobne (2,051(5) Å - 2,2998(16) Å) w porównaniu do **Pt7** (2,042(4) Å - 2,2971(13) Å). Znaczne wydłużenie wiązania Pt1-S21 zaobserwowano w **Pt7** (2,3109(17) Å) w porównaniu do **Pt6** (2,2994(12) Å). W obu kompleksach najkrótszym wiązaniem jest Pt1-N4'' (2,051(5) Å (**Pt6**) i 2,042(4) Å (**Pt7**)), podczas gdy najdłuższym Pt1-S21 (2,3109(17) Å (**Pt6**) i 2,2994(12) Å (**Pt7**)). Długości wiązań między atomem platyny(II) a wszystkimi atomami donorowymi w kompleksach **Pt6** i **Pt7** korelują z danymi literaturowymi dotyczącymi

kompleksów innych Pt(II) z dwoma jonami chlorkowymi, DMSO i N-donorowym triazolem<sup>151,152</sup> lub imidazolem.<sup>152–154</sup>

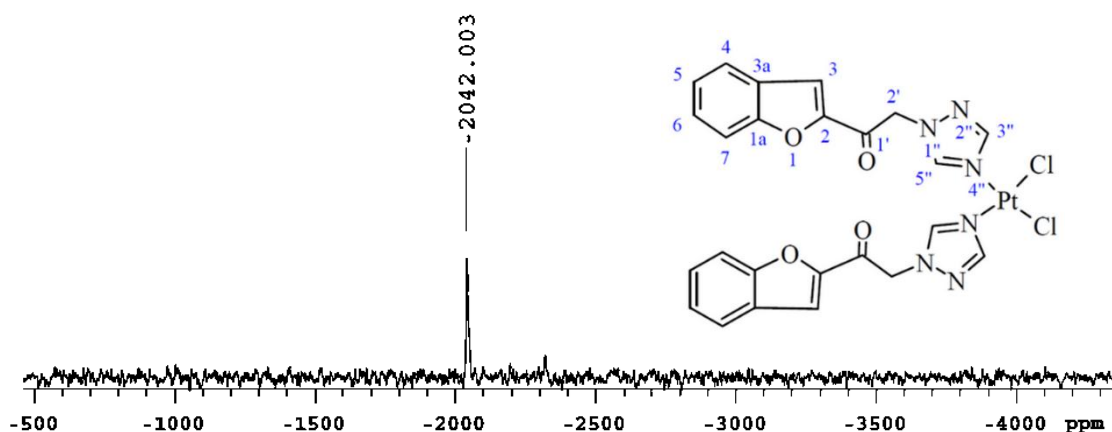
Dodatkowo stwierdzono, że różnica w strukturze ligandów, polegająca na zwiększeniu liczby atomów azotu w pierścieniu triazolowym w **Pt6**, w porównaniu do pierścienia imidazolowego w **Pt7** wpłynęła na konformację ligandów w sieci krystalicznej. W wyniku rotacji wokół wiązania C1'-C2 zmienia się wzajemne położenia atomów O1 i O1'. Konformację poszczególnych fragmentów cząsteczki określają kąty torsyjne - wartości bliskie 180°/-180° wskazują na pozycję *trans*, natomiast wartości bliskie 0° sugerują układ *cis*.

Tab. 26 Struktura krystaliczna kompleksów **Pt6** i **Pt7** ze schematem numeracji i elipsoidami termicznymi z prawdopodobieństwem 30% oraz wybrane długości [Å] i kąty walencyjne oraz torsyjne [°] wiązań dla monokryształów **Pt6** i **Pt7**.

Struktura krystaliczna	Długości wiązań [Å]		
	Pt6	Pt7	
 <p style="text-align: center;"><b>Pt6</b></p>	Pt1-N4''	2,051(5)	2,042(4)
	Pt1-Cl1	2,2137(17)	2,2170(12)
	Pt1-Cl2	2,2998(16)	2,2971(13)
	Pt1-S21	2,3109(17)	2,2994(12)
 <p style="text-align: center;"><b>Pt7</b></p>	<b>Kąty walencyjne [°]</b>		
	Pt6	Pt7	
	N4''-Pt1-Cl2	87,94(16)	89,59(12)
	S21-Pt1-Cl2	90,00(6)	88,32(5)
N4''-Pt1-Cl1	88,86(16)	88,52(12)	
S21-Pt1-Cl1	93,23(6)	93,54(4)	
<b>Kąty torsyjne [°]</b>			
Pt6	Pt7		
O1-C2-C1'-O1'	176,3(6)	1,4(7)	

W celu potwierdzenia struktury związków koordynacyjnych **Pt4** - **Pt8** w roztworze wykonano analizę NMR.

W widmach <sup>195</sup>Pt NMR kompleksów przesunięcia chemiczne zarejestrowano przy -2042 ppm (**Pt4**) (Rys. 32), -1996 ppm (**Pt5**), -3077 ppm (**Pt6**), -3056 ppm (**Pt7**) i -1738 ppm (**Pt8**). Położenia sygnałów są zgodne z danymi literaturowymi na temat kompleksów Pt(II) o analogicznych składach sfer koordynacyjnych.<sup>137–143</sup> Sygnały rezonansowe kompleksów **Pt4**, **Pt5** i **Pt8** są przesunięte względem substratu K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> ( $\Delta_{\text{koor. Pt4}} = -418$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Pt5}} = -372$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Pt8}} = -114$  ppm), natomiast dla kompleksów **Pt6** i **Pt7** sygnały rezonansowe są przesunięte względem substratu *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>2</sub>] ( $\Delta_{\text{koor. Pt6}} = +399$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Pt7}} = +420$  ppm).



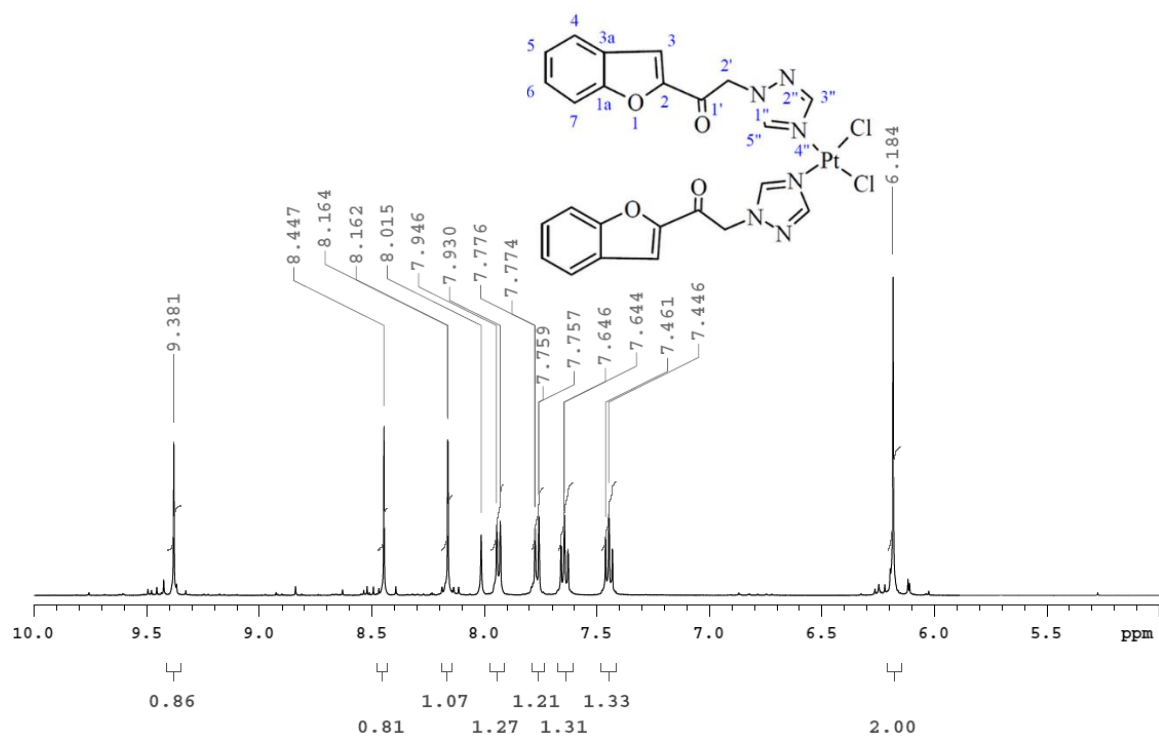
Rys. 32 Widmo  $^{195}\text{Pt}$  NMR związku koordynacyjnego **Pt4**.

Kierując się strukturą kompleksów **Pt4** - **Pt8** w ciele stałym, ustaloną na podstawie analiz IR i X-Ray, spodziewano się, że miejscem koordynacji ligandów N-heterocyklicznych z atomem Pt(II) w tych kompleksach jest pierścień azolowy. Dlatego interpretując widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  NMR szczególną uwagę poświęcono właśnie temu ugrupowaniu.

W widmach  $^1\text{H}$  NMR kompleksów **Pt4** (Rys. 33), **Pt6** i **Pt8**, skoordynowanych z triazolowym ligandem **bfte**, zarejestrowano dwa sygnały rezonansowe przypisane protonom pierścienia N-heterocyklicznego, H3'' i H5''. Wartości przesunięć chemicznych protonu H3'' wynoszą 8,45 ppm (**Pt4**), 8,67 ppm (**Pt6**) i 8,58 ppm (**Pt8**), a obliczone przesunięcia koordynacyjne wynoszą odpowiednio +0,39 ppm (**Pt4**), +0,61 ppm (**Pt6**) i +0,52 ppm (**Pt8**). Natomiast sygnały rezonansowe protonu H5'' zarejestrowano przy 9,38 ppm 9,53 ppm i 9,45 ppm odpowiednio dla **Pt4**, **Pt6** i **Pt8**, a obliczone wartości przesunięć koordynacyjnych tych sygnałów wynoszą +0,71 ppm (**Pt4**), +0,86 ppm (**Pt6**), +0,78 ppm (**Pt8**).

Z kolei w widmach kompleksów **Pt5** i **Pt7** skoordynowanych z imidazolowym ligandem **bfi**, zarejestrowano trzy sygnały rezonansowe przypisane protonom pierścienia azolowego, H2'', H3'' i H5''. Wartości przesunięć chemicznych protonu H2'' wynoszą 7,48 ppm (**Pt5**) i 7,54 ppm (**Pt7**), H3'' 7,06 ppm (**Pt5**) i 7,49 ppm (**Pt7**), natomiast H5'' 8,31 ppm (**Pt5**) i 8,56 ppm (**Pt7**). Sygnały rezonansowe tych protonów wykazują przesunięcia koordynacyjne w zakresie 0,06 - 0,80 ppm, sugerując koordynację ligandów N-heterocyklicznych przez pierścień imidazolowy. Takie wartości przesunięć koordynacyjnych sugerują zaangażowanie pierścienia triazolowego w koordynację z atomem centralnym Pt(II).

Dodatkowo, w widmach kompleksów **Pt6** i **Pt7** zarejestrowano singletowe sygnały rezonansowe odpowiednio przy 3,54 ppm i 3,49 ppm pochodzące od ugrupowań metylowych cząsteczki DMSO i wskazujące na jej koordynację z atomem centralnym Pt(II).

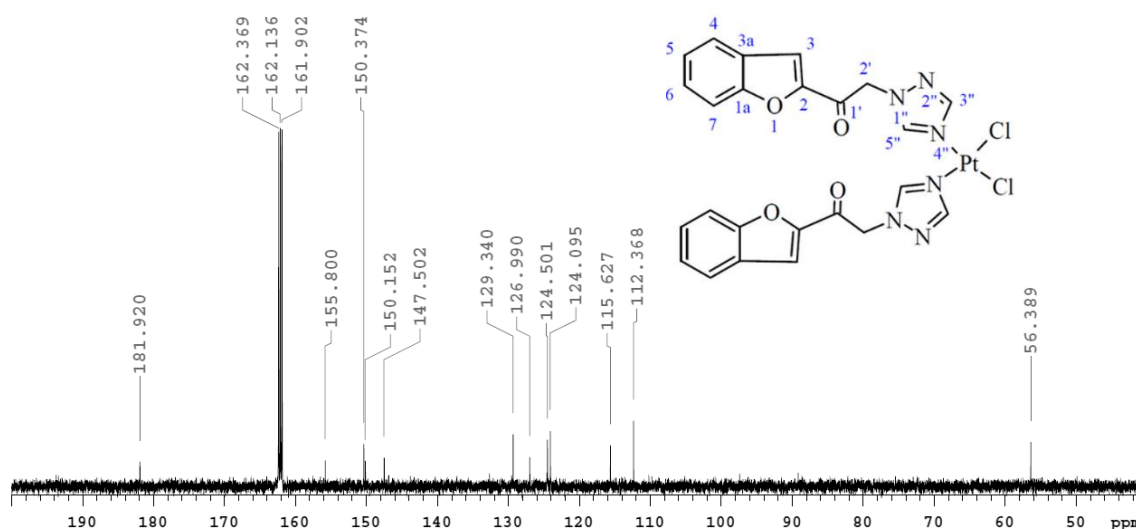


Rys. 33 Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku koordynacyjnego **Pt4**.

Analogicznie do obserwacji poczynionych w widmach  $^1\text{H}$  NMR, również w widmach  $^{13}\text{C}$  NMR zauważalne są istotne zmiany przesunięć chemicznych jąder węgla należących do pierścieni azolowych ligandów **bfte** i **bfie**. W widmach  $^{13}\text{C}$  NMR kompleksów **Pt4** (Rys. 34), **Pt6** i **Pt8** zarejestrowano dwa sygnały rezonansowe przypisane pierścieniowi triazolowemu, odpowiadające jądrom węgla C3'' i C5''. Wartości przesunięć chemicznych jądra C3'' wynoszą 150,4 ppm (**Pt4**), 148,7 ppm (**Pt6**) i 150,6 ppm (**Pt8**), a odpowiadające im przesunięcia koordynacyjne wynoszą odpowiednio -1,3 ppm, -3,0 ppm i -1,1 ppm. Natomiast przesunięcia chemiczne jąder C5'' obserwowano przy 147,5 ppm (**Pt4**), 146,5 ppm (**Pt6**) i 147,6 ppm (**Pt8**) i wykazują przesunięcia koordynacyjne o +1,6 ppm (**Pt4**), +0,6 ppm (**Pt6**) i +1,7 ppm (**Pt8**). Dodatkowo charakterystycznym sygnałem obecnym w widmie  $^{13}\text{C}$  NMR kompleksu **Pt8** jest sygnał pochodzący od grupy karboksylanowej nieodchodzącego liganda szczawianowego, obserwowany przy 166,0 ppm, sugerując koordynację dikarboksylanu z atomem Pt(II).

Z kolei w widmach  $^{13}\text{C}$  NMR kompleksów **Pt5** i **Pt7** zarejestrowano trzy sygnały rezonansowe przypisane pierścieniowi imidazolowemu, odpowiadające jądrom węgla C2'', C3'' i C5''. Sygnały rezonansowe jądra C2'' zarejestrowano przy 122,1 ppm (**Pt5**) i 121,7 ppm (**Pt7**), a wartości przesunięć koordynacyjnych wynoszą odpowiednio +1,2 ppm, i +0,8 ppm. Natomiast przesunięcia chemiczne jąder C3'' obserwowano się przy 128,5 ppm (**Pt5**), 127,0 ppm (**Pt7**), a obliczone przesunięcia koordynacyjne przyjmują wartości odpowiednio +0,2 ppm i -1,3 ppm. Z kolei sygnały rezonansowe jądra C5'' wynoszą 140,7 ppm i 140,1 ppm odpowiednio dla **Pt5** i **Pt7** i również wykazują przesunięcia koordynacyjne o +2,0 ppm (**Pt5**) i +1,4 ppm (**Pt7**).

Dodatkowo w widmach kompleksów **Pt6** i **Pt7** zarejestrowano sygnał rezonansowy przy 42,9 ppm charakterystyczny dla ugrupowań metylowych cząsteczki DMSO.



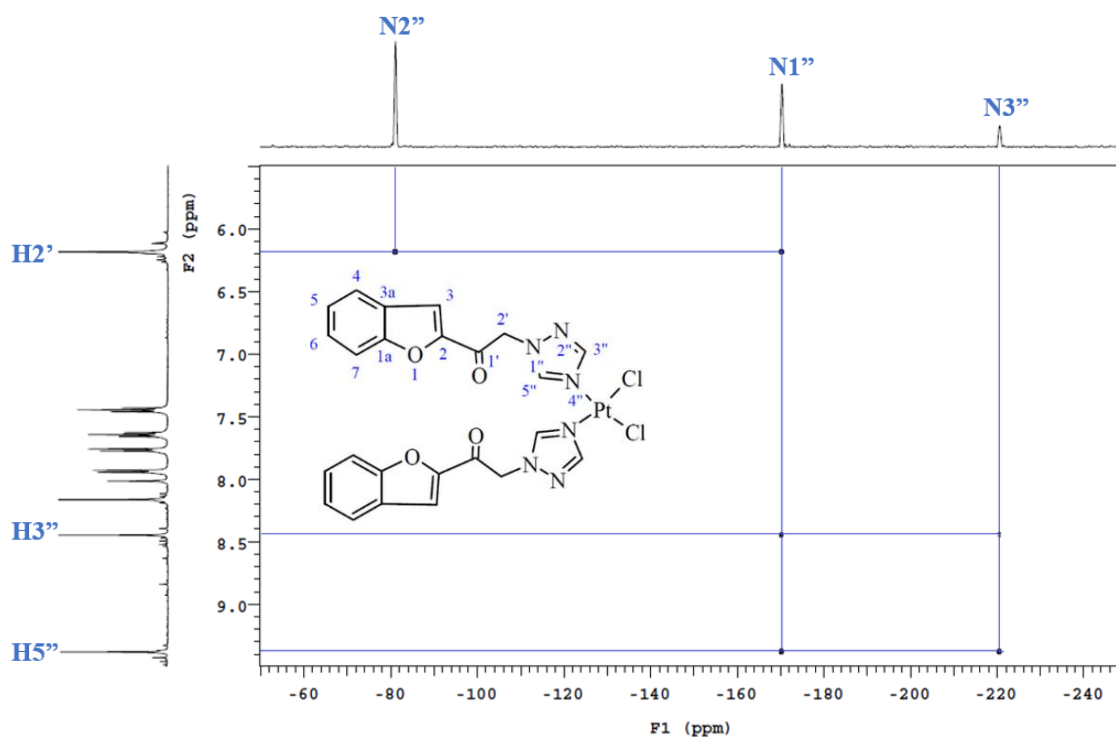
Rys. 34 Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku koordynacyjnego **Pt4**.

Brak możliwości jednoznacznego wskazania atomu donorowego wiązania Pt-N na podstawie analiz  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR stanowił przesłankę do wykonania analiz widm heterokorelacyjnych  $^1\text{H}$  -  $^{15}\text{N}$  NMR. W widmach  $^{15}\text{N}$  NMR **Pt4** (Rys. 35), **Pt6** i **Pt8** obserwowane są trzy sygnały rezonansowe przypisane jądrom azotu pierścienia triazolowego N1'', N2'' i N4''. Sygnały rezonansowe jąder N1'' zarejestrowano przy -170,3 ppm (**Pt4**), -169,7 ppm (**Pt6**) i -169,1 ppm (**Pt8**), warto podkreślić, iż wartości przesunięć koordynacyjnych tych sygnałów są nieznaczne, wynoszą odpowiednio +3,4 ppm, +4,0 ppm i +4,6 ppm. Przesunięcia chemiczne jąder N2'' odnotowano przy -81,1 ppm (**Pt4**), -81,7 ppm (**Pt6**) i -79,9 ppm (**Pt8**). Obliczone wartości przesunięć koordynacyjnych również są niewielkie ( $\Delta_{\text{koor. Pt4}} = +0,6$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Pt8}} = +1,8$  ppm). W przypadku **Pt6** sygnał nie uległ w ogóle przesunięciu w odniesieniu

do nieskoordynowanego liganda. Sygnały przypisane jądrom N4'' zarejestrowano przy -220,6 ppm (**Pt4**), -206,6 ppm (**Pt6**) i -234,8 ppm (**Pt8**) i wykazują największe wartości przesunięć koordynacyjnych ( $\Delta_{\text{koor. Pt4}} = -93,9$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Pt6}} = -79,2$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Pt8}} = -108,1$  ppm).

Z kolei w widmach  $^{15}\text{N}$  NMR kompleksów **Pt5** i **Pt7** obserwowane są dwa sygnały rezonansowe przypisane jądrom azotu pierścienia imidazolowego N1'' i N4''. Sygnały rezonansowe jąder N1'' zarejestrowano przy -215,4 ppm (**Pt5**) i -214,3 ppm (**Pt7**) i są nieznacznie przesunięte względem nieskoordynowanego liganda ( $\Delta_{\text{koor. Pt5}} = +4,6$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Pt7}} = +5,7$  ppm). Natomiast przesunięcia chemiczne jąder N4'' zarejestrowano przy -220,5 ppm (**Pt5**) i -207,6 ppm (**Pt7**) i sygnały te wykazują znacznie większe wartości przesunięć koordynacyjnych ( $\Delta_{\text{koor. Pt5}} = -102,2$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Pt7}} = -89,3$  ppm).

Zarówno w przypadku kompleksów **Pt4**, **Pt6** i **Pt8**, związanych z ligandem **bfte** zawierającym fragment triazolowy, jak i kompleksów **Pt5** i **Pt7**, związanych z ligandem **bfi**, zawierającym fragment imidazolowy, największe przesunięcia koordynacyjne obserwuje się dla jądra N4''. Potwierdza to koordynację ligandów **bfte** i **bfi** poprzez pierścień azolowy i wskazuje atom azotu N4'' jako donor pary elektronowej wiązania koordynacyjnego z atomem centralnym platyny(II).

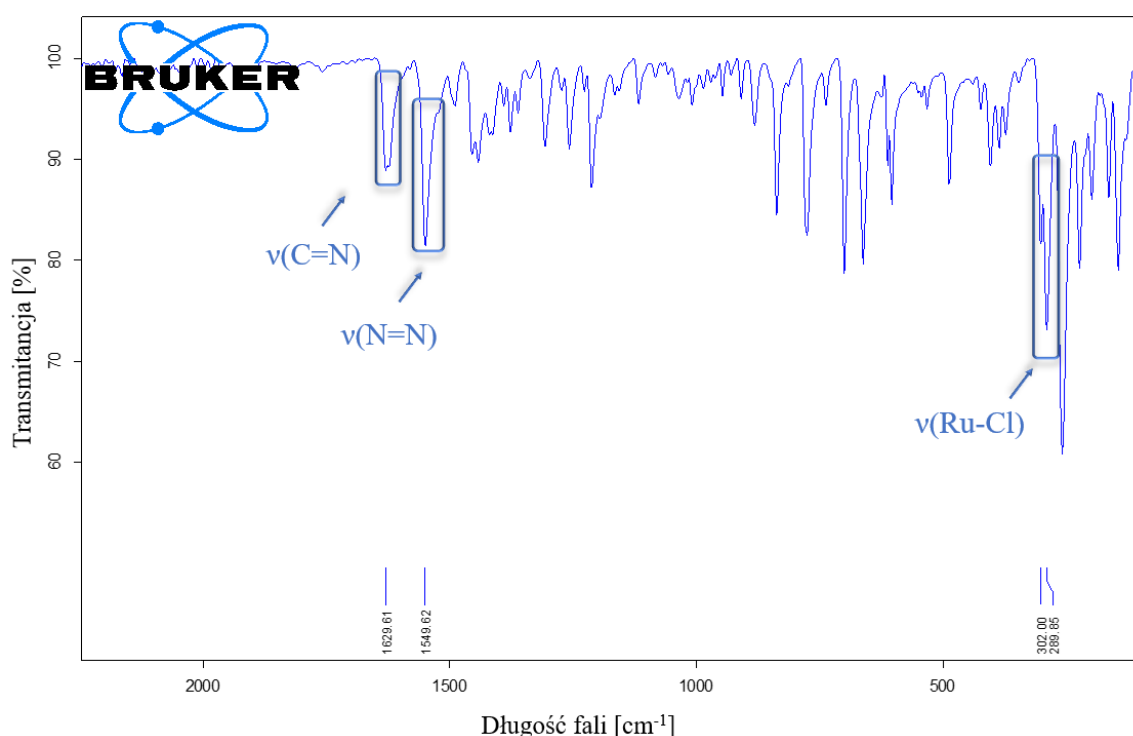


Rys. 35 Widmo  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NMR HMBC związku koordynacyjnego **Pt4**.

### 11.1.3 Charakterystyka strukturalna związków koordynacyjnych Ru(II)

W widmach oscylacyjnych kompleksów **Ru1** (Rys. 36), **Ru2** i **Ru3** w zakresie dalekiej podczerwieni zarejestrowano pasma o niesymetrycznych kształtach, możliwe do rozdzielania na dwie składowe o częstotliwościach  $290\text{ cm}^{-1}$  i  $302\text{ cm}^{-1}$  (**Ru1**);  $295\text{ cm}^{-1}$  i  $280\text{ cm}^{-1}$  (**Ru2**) oraz  $296\text{ cm}^{-1}$  i  $280\text{ cm}^{-1}$  (**Ru3**), które przypisano drganiom rozciągającym wiązania  $\nu(\text{Ru-Cl})$ . Asymetryczny charakter obserwowanych pasm wskazuje, że jony chlorkowe skoordynowane są po tej samej stronie względem płaszczyzny symetrii przechodzącej wzdłuż atomu centralnego.

Natomiast w zakresie średniej podczerwieni zarejestrowano pasma drgań rozciągających pierścienia triazolowego  $\nu(\text{N=N})$  przy  $1550\text{ cm}^{-1}$  (**Ru1**),  $1547\text{ cm}^{-1}$  (**Ru2**) i  $1546\text{ cm}^{-1}$  (**Ru3**), a obliczone przesunięcia koordynacyjne tych sygnałów wynoszą odpowiednio  $+4\text{ cm}^{-1}$ ,  $+6\text{ cm}^{-1}$  i  $+4\text{ cm}^{-1}$ . W podobnym obszarze odnotowano również pasma drgań rozciągających  $\nu(\text{C=N})$ , które występują przy  $1630\text{ cm}^{-1}$  (**Ru1**) oraz  $1609\text{ cm}^{-1}$  (**Ru2** i **Ru3**), z przesunięciem koordynacyjnym wynoszącymi  $+5\text{ cm}^{-1}$  (**Ru1**),  $+1\text{ cm}^{-1}$  (**Ru2**) i  $+10\text{ cm}^{-1}$  (**Ru3**). Takie wartości przesunięć koordynacyjnych świadczą o związaniu pierścienia N-heterocyklicznego z atomem centralnym rutenu(II).



Rys. 36 Widmo IR związku koordynacyjnego **Ru1**.

Badania spektroskopowe w podczerwieni kompleksów **Ru1-Ru3** dostarczyły informacji na temat koordynacji ligandów N-heterocyklicznych i jonów chlorkowych z centrum metalicznym. Natomiast bardziej szczegółowe dane o strukturze kompleksów uzyskano wykonując analizę X-Ray dla wyizolowanych monokryształów **Ru1** i **Ru3**.

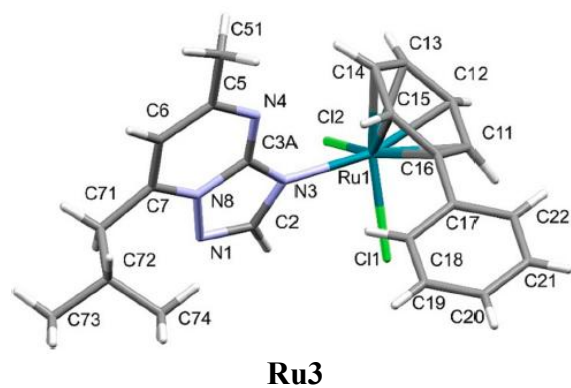
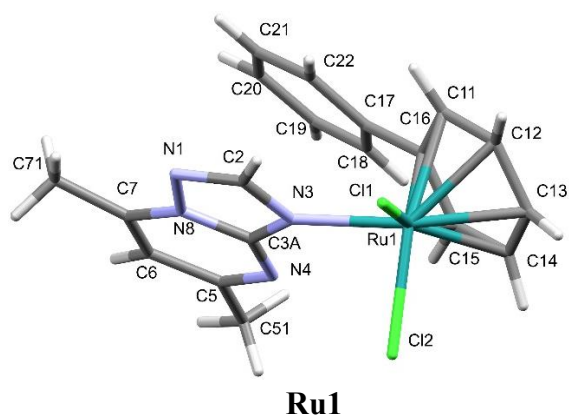
Rentgenowska analiza strukturalna wykazała, że zarówno kompleks **Ru1** jak i **Ru3** krystalizują w trójskośnej grupie przestrzennej P1, przyjmując geometrię pseudooktaedryczną (Tab. 27). W obu kompleksach atom centralny Ru(II) skoordynowany jest z dwoma jonami chlorkowymi, monodentatnym ligandem triazolopirymidynowym, związanym poprzez atom azotu N3 pierścienia triazolowego oraz pierścieniem fenyłowym pochodzącym od bifenyłu.

W obu opisanych strukturach długości wiązań Ru-N3 są bardzo zbliżone i wynoszą 2,130(2) Å (**Ru1**) i 2,138(2) Å (**Ru2**). Odległości między atomem centralnym Ru(II) a atomami węgla skoordynowanego pierścienia fenyłowego są również podobne i wahają się w zakresie 2,151(3) - 2,215(2) Å (**Ru1**) i 2,154(3) - 2,203(3) Å (**Ru3**).

Geometria ligandów triazolopirymidynowych i bifenyłowych jest typowa dla takich układów. Istnieje jednak istotny wpływ koordynacji Ru... $\pi$ , powodujący różnice w odległościach wiązań C-C między pierścieniami skoordynowanymi i nieskoordynowanymi. W przypadku **Ru1** odpowiednie odległości wahają się od 1,402(4) Å do 1,423(4) Å i od 1,374(5) Å do 1,386(4) Å, z kolei w przypadku **Ru3** odpowiednie odległości wahają się od 1,394(4) Å do 1,428(4) Å i od 1,361(7) Å do 1,386(5) Å.

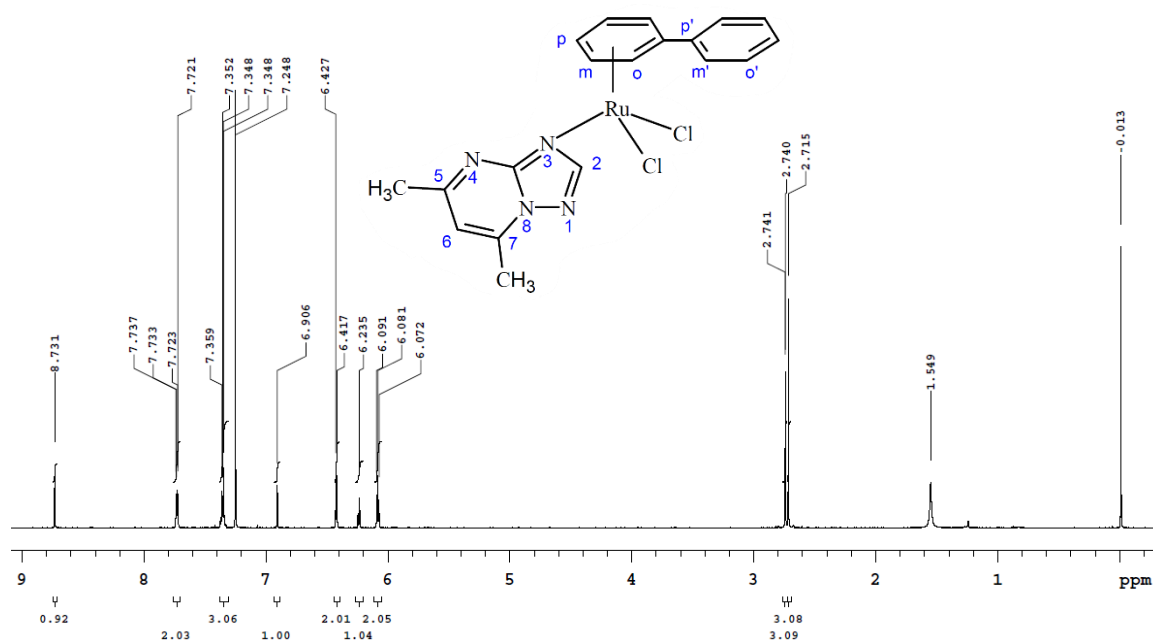
Tab. 27 Struktura krystaliczna kompleksów **Ru1** i **Ru3** ze schematem numeracji i elipsoidami termicznymi z prawdopodobieństwem 30% oraz wybrane długości [Å] i kąty [°] wiązań dla monokryształów **Ru1** i **Ru3**.

Struktury krystaliczne	Ru1	Ru3
	<b>Długości wiązań [Å]</b>	
	<b>Ru1-N3</b>	2,130(2)
	<b>Ru1-C12</b>	2,151(3)
	<b>Ru1-C13</b>	2,166(3)
	<b>Ru1-C14</b>	2,172(3)
	<b>Ru1-C15</b>	2,189(2)
	<b>Ru1-C11</b>	2,192(3)
	<b>Ru1-C16</b>	2,215(2)
	<b>Ru1-Cl2</b>	2,3998(7)
	<b>Ru1-Cl1</b>	2,4253(7)
	<b>Kąty walencyjne [°]</b>	
	<b>N3-Ru1-C12</b>	134,97(10)
	<b>N3-Ru1-C13</b>	169,58(9)
	<b>C13-Ru1-C12</b>	37,96(10)
	<b>N3-Ru1-C14</b>	139,28(9)
	<b>C12-Ru1-C14</b>	68,02(11)
	<b>C13-Ru1-C14</b>	37,73(10)
	<b>N3-Ru1-C15</b>	104,77(9)
	<b>C15-Ru1-C12</b>	80,51(10)
	<b>C13-Ru1-C15</b>	68,44(10)
	<b>C15-Ru1-C14</b>	37,89(9)
	<b>N3-Ru1-C11</b>	102,01(9)
	<b>C11-Ru1-C12</b>	37,64(9)
	<b>C13-Ru1-C11</b>	68,36(10)
	<b>C11-Ru1-C14</b>	80,39(10)
	<b>C15-Ru1-C11</b>	67,90(10)
	<b>N3-Ru1-C16</b>	88,90(8)
	<b>C12-Ru1-C16</b>	68,01(10)
	<b>C13-Ru1-C16</b>	80,97(10)
	<b>C14-Ru1-C16</b>	68,19(9)
	<b>C15-Ru1-C16</b>	37,70(9)
	<b>C11-Ru1-C16</b>	37,57(9)
	<b>N3-Ru1-Cl2</b>	86,24(6)
	<b>C12-Ru1-Cl2</b>	137,63(8)
	<b>C13-Ru1-Cl2</b>	102,58(8)
	<b>C14-Ru1-Cl2</b>	86,89(8)
	<b>C15-Ru1-Cl2</b>	100,58(7)
	<b>C11-Ru1-Cl2</b>	167,10(7)
	<b>C16-Ru1-Cl2</b>	134,29(7)
	<b>N3-Ru1-Cl1</b>	85,90(6)
	<b>C12-Ru1-Cl1</b>	86,05(8)
	<b>C13-Ru1-Cl1</b>	99,76(8)
	<b>C14-Ru1-Cl1</b>	133,91(7)
	<b>C15-Ru1-Cl1</b>	166,47(7)
	<b>C11-Ru1-Cl1</b>	102,13(7)
	<b>C16-Ru1-Cl1</b>	136,72(7)
	<b>Cl2-Ru1-Cl1</b>	88,22(2)



Kontynuując charakterystykę strukturalną związków koordynacyjnych rutenu(II) przeprowadzono analizę budowy kompleksów **Ru1** - **Ru3** w roztworze, z zastosowaniem spektroskopii NMR. Badanie struktur kompleksów Ru(II) w cieple stałym, przeprowadzone na podstawie analiz IR i X-Ray, wskazało pierścień triazolowy jako miejsce koordynacji ligandów **dmtp**, **dptp** i **ibmtp** z atomem centralnym Ru(II). W związku z tym podczas analiz widm  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  NMR skupiono się na interpretacji sygnałów rezonansowych ugrupowania azolowego.

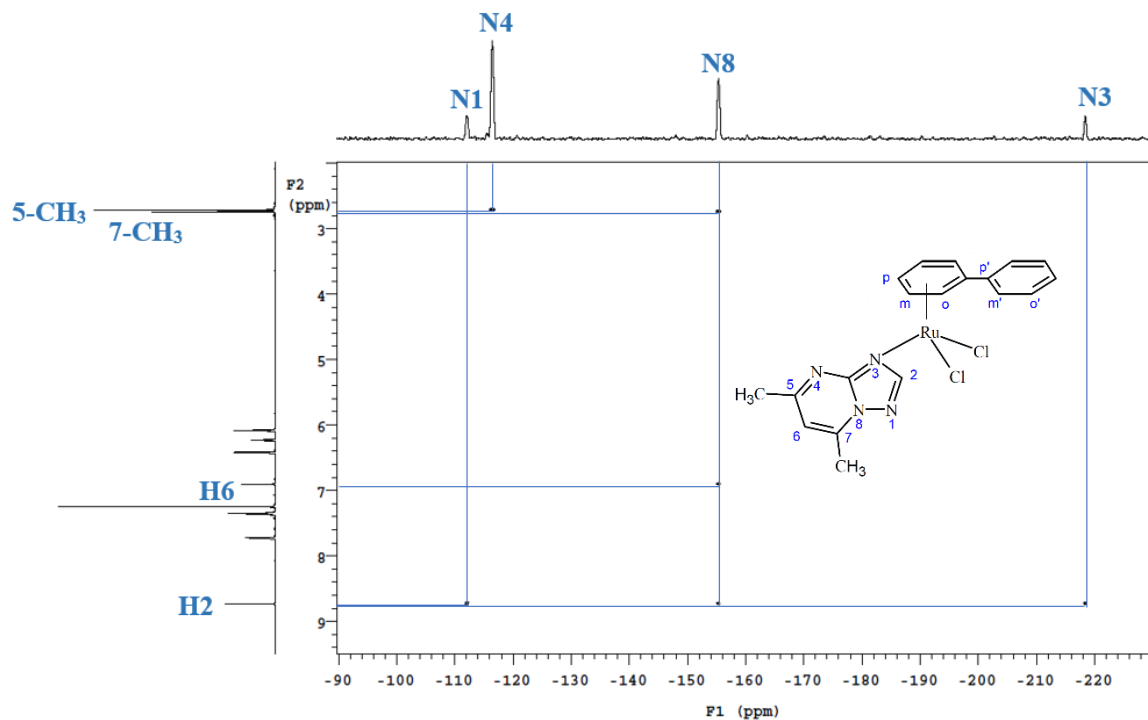
W widmach  $^1\text{H}$  NMR kompleksów **Ru1** (Rys. 37), **Ru2** i **Ru3**, skoordynowanych z 5,7-dipodstawionymi triazolopirymidynami (**dmtp**, **dptp**, **ibmtp**), zarejestrowano singletowe sygnały rezonansowe protonu H2 pierścienia triazolowego przy 8,73 ppm (**Ru1**), 8,84 ppm (**Ru2**) i 8,68 ppm (**Ru3**). Obliczone przesunięcia koordynacyjne tych sygnałów wynoszą odpowiednio +0,33 ppm, +0,25 ppm, i +0,32 ppm. Dodatkowo, w widmach  $^1\text{H}$  NMR wszystkich badanych kompleksów rutenu(II), obserwowane są dwie grupy sygnałów rezonansowych przypisanych pierścieniowi bifenyłowemu: i) sygnały rezonansowe w zakresie 6,08 - 6,42 ppm protonów H(o), H(p) i H(m) pierścienia skoordynowanego z atomem Ru(II), ii) sygnały rezonansowe w zakresie 7,35 - 7,74 ppm pochodzące od protonów H(o'), H(p') i H(m') drugiego pierścienia fenyłowego.



Rys. 37 Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku koordynacyjnego **Ru1**.

Analogiczne zmiany spektralne, będące konsekwencją koordynacji ligandów z atomem Ru(II), obserwowane są także w widmach  $^{13}\text{C}$  NMR. Zarejestrowano przesunięcia chemiczne jądra węgla C2 pierścienia triazolowego przy 156,0 ppm (**Ru1**), 156,7 ppm (**Ru2**) i 155,9 ppm (**Ru3**), a wartości obliczonych przesunięć koordynacyjnych wynoszą odpowiednio +2,8 ppm, +5,1 ppm i +0,7 ppm. Zaobserwowano również dwie grupy sygnałów rezonansowych przypisanych ugrupowaniu bifenyłowemu: i) sygnały rezonansowe w zakresie 80,8 - 85,5 ppm charakterystyczne dla C(o), C(p) i C(m) pierścienia skoordynowanego z atomem Ru(II), ii) sygnały rezonansowe w zakresie 128,6 - 129,3 ppm drugiego pierścienia fenyłowego C(o'), C(p') i C(m').

Analiza widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR nie dostarczyła jednoznacznych informacji o atomie donorowym wiązania koordynacyjnego Pt-N. Dlatego w kolejnym etapie dokonano interpretacji widm heterokorelacyjnych  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NMR. Potencjalnymi atomami donorowymi wiązania koordynacyjnego w 5,7-dipodstawionych triazolopirymidynach mogą być atomy azotu N1 i N3. W widmach  $^{15}\text{N}$  NMR zarejestrowano sygnały rezonansowe jąder azotu N1 przy -112,1 ppm, -111,1 ppm i -112,0 ppm odpowiednio dla **Ru1** (Rys. 38), **Ru2** i **Ru3**. Sygnały w widmach **Ru1** i **Ru2** wykazują niewielkie przesunięcia koordynacyjne ( $\Delta_{\text{koor. Ru1}} = +0,1$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Ru2}} = +0,2$  ppm), z kolei sygnał w widmie **Ru3** nie przesunął się w ogóle w stosunku do nieskoordynowanego liganda. Natomiast przesunięcia chemiczne jąder azotu N3 zarejestrowano przy -218,0 ppm, -217,0 ppm i -219,0 ppm odpowiednio dla **Ru1**, **Ru2** i **Ru3**. Sygnały te wykazują największe przesunięcia koordynacyjne spośród zarejestrowanych jąder azotu ( $\Delta_{\text{koor. Ru1}} = -64,5$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Ru2}} = -56,1$  ppm,  $\Delta_{\text{koor. Ru3}} = -65,0$  ppm). Potwierdza to koordynację ligandów poprzez pierścień azolowy i wskazuje atom azotu N3 jako donor pary elektronowej wiązania koordynacyjnego z atomem rutenu(II).



Rys. 38 Widmo  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NMR związku koordynacyjnego **Ru1**.

## 11.2 Właściwości biologiczne

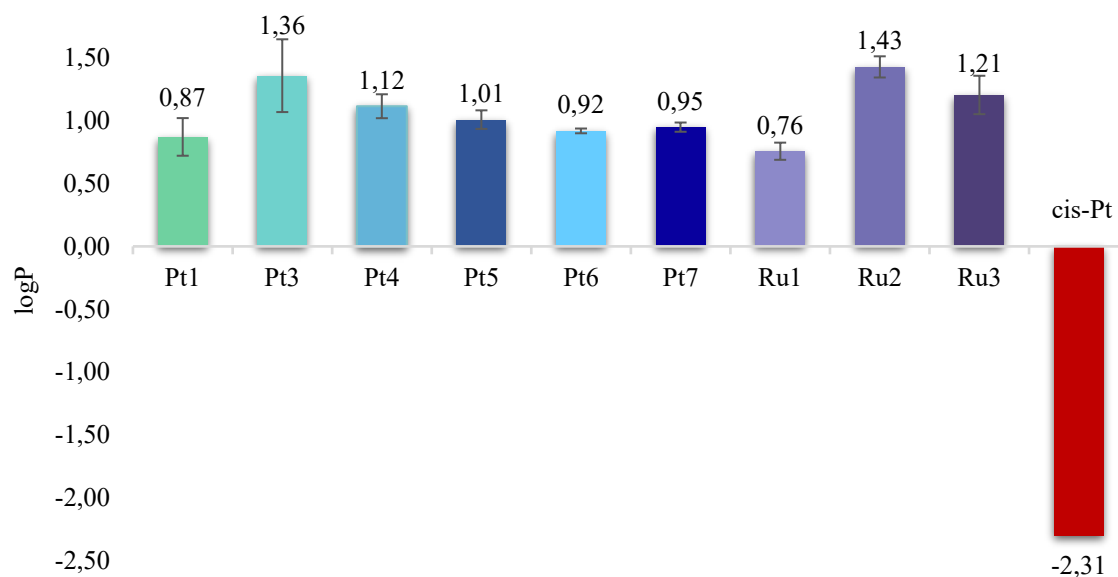
Celem badań biologicznych nowo otrzymanych związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) była ocena ich potencjału przeciwnowotworowego oraz identyfikacja najbardziej obiecujących kandydatów na nowe środki chemioterapeutyczne. W tym celu przeprowadzono serię analiz umożliwiających porównanie ich właściwości terapeutycznych z referencyjnym lekiem jakim jest cisplatyna. Zakres badań obejmował:

- analizę zdolności do akumulacji wewnątrzkomórkowej zależnej pośrednio od **lipofilowości** kompleksów Pt(II) i Ru(II) i ich **reaktywność wobec GSH**;
- ocenę aktywności przeciwnowotworowej, określoną na podstawie badań **cytotoksyczności** i zdolności **hamowania proliferacji** komórek *in vitro*, przy czym aktywność tę dodatkowo modulowano poprzez **enkapsulację w micelach kopolimerów Pluronic®**;
- zbadanie mechanizmu działania, poprzez analizę wpływu na **przebieg cyklu komórkowego** i **reaktywność względem DNA**.

### 11.2.1 Lipofilowość

Lipofilowość to parametr fizykochemiczny opisujący powinowactwo związku chemicznego do fazy organicznej, wyrażany współczynnikiem podziału ( $\log P$ ) w układzie dwufazowym: ciecz - ciecz lub ciecz - ciało stałe. Właściwość ta określa rozpuszczalność związków chemicznych w płynach ustrojowych, a także bierny transport leków przez błony komórkowe zbudowane z dwuwarstwy lipidowej, determinując tym samym biodostępność w miejscu docelowego działania.<sup>155–157</sup> Ponadto związki wykazujące powinowactwo do układów lipidowych łatwo wiążą się odwracalnie z białkami osocza, co umożliwia ich dystrybucję w organizmie.<sup>155,156,158</sup> W konsekwencji lipofilowość odgrywa kluczową rolę w określaniu profilu ADMET (wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalanie i toksyczność, ang. Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity) oraz ogólnej przydatności związków na leki.<sup>159</sup>

Przeprowadzona analiza lipofilowości wykazała, że wartości współczynnika podziału  $\log P$  dla przebadanych związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) znajdują się w podobnym zakresie ( $\log P = 0,87 - 1,43$ ) (Rys. 39).



Rys. 39 Lipofilowość kompleksów Pt(II) i Ru(II) oraz cisplatyny<sup>160</sup> wyrażona jako wartości parametru  $\log P$ .

Analiza porównawcza lipofilowości kompleksów **Pt1** i **Pt3** wskazuje, że wymiana odchodzącego liganda chlorkowego na dikarboksylian prowadzi do wzrostu charakteru lipofilowego związków koordynacyjnych. Natomiast w przypadku serii kompleksów

**Pt4 - Pt7** zaobserwowano zróżnicowanie wartości współczynnika podziału logP zależne od rodzaju ligandów nieodchodzących skoordynowanych z atomem centralnym. Kompleksy **Pt4** i **Pt5**, zawierające dwa ligandy N-heterocykliczne, charakteryzują się wyższymi wartościami logP niż ich analogiczne związki **Pt6** i **Pt7**, w których występuje skoordynowana cząsteczka DMSO. Zaobserwowaną tendencję można powiązać z hydrofilowym charakterem DMSO ( $\log P \approx -1,35$ <sup>161</sup>), którego obecność w sferze koordynacyjnej powoduje obniżenie całkowitej lipofilowości kompleksu.

Wyznaczenie współczynnika podziału logP dla kompleksów **Pt2** i **Pt8** było niemożliwe z uwagi na ich niewystarczającą rozpuszczalność w rozpuszczalnikach stosowanych w procedurze pomiarowej.

Z kolei w odniesieniu do kompleksów **Ru1 - Ru3** stwierdzono korelację pomiędzy wartościami logP kompleksów Ru(II) a wielkością podstawników w 5,7-podstawionych triazolopirymidynach. Stwierdzono, że zwiększenie zawady przestrzennej liganda (**dmtp** > **ibmtp** > **dptp**) powoduje wzrost wartości współczynnika podziału logP.

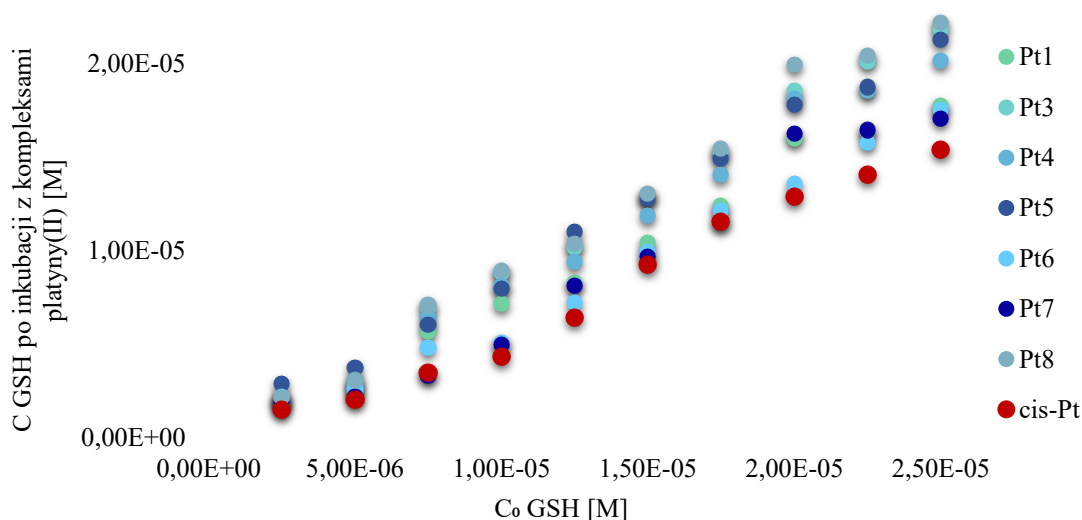
Z analizy danych literaturowych wynika, że optymalny zakres lipofilowości związków chemicznych o potencjale terapeutycznym mieści się w przedziale  $\log P = 0 - 3$ , co zapewnia kompromis pomiędzy rozpuszczalnością a przenikalnością przez błony komórkowe.<sup>162,163</sup> Związki chemiczne charakteryzujące się wartościami  $\log P > 5$  wykazują słabą rozpuszczalnością w wodzie, duże powinowactwo do białek osocza i znaczną akumulacją w tkankach, co może przekładać się na zwiększoną toksyczność i wiązanie z receptorami w warunkach *in vivo*.<sup>164</sup> Na tej podstawie, można stwierdzić, iż lipofilowość wszystkich przebadanych związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) znajduje się w zakresie uznawanym za korzystny z farmakologicznego punktu widzenia. W konsekwencji związki te mają większe szanse na wydajne przenikanie przez błony komórkowe, co może przyczyniać się do zwiększonej akumulacji wewnątrzkomórkowej, a w rezultacie do wyższej aktywności cytotoksycznej w porównaniu z lekami hydrofilowymi, takimi jak cisplatyna dla której wartość współczynnika podziału logP wynosi -2,31.<sup>160</sup> Spełnienie kryterium optymalnej lipofilowości stanowiło podstawę do zakwalifikowania badanych kompleksów Pt(II) i Ru(II) do dalszych badań biologicznych.

### 11.2.2 Reaktywność względem glutationu

Glutation jest tripeptydem zbudowanym z reszt aminokwasowych kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny, który pełni kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy komórkowej, przede wszystkim poprzez udział w procesach detoksykacji oraz działania antyoksydacyjnego.<sup>161</sup> Pomimo istotnej funkcji ochronnej obecność GSH może stanowić główną przeszkodę w chemioterapii opartej na związkach platyny(II).<sup>165,166</sup> Wynika to z powinowactwa nukleofilowych grup tiolowych reszty cysteinowej do atomów Pt(II), będących miękkimi kwasami Lewisa, co prowadzi do powstawania stabilnych adduktów Pt-GSH. W konsekwencji średnio 67% podanego leku platyny(II) wiąże się z glutationem.<sup>167</sup> Powstawanie adduktów Pt-GSH prowadzi do dezaktywacji kompleksów platyny oraz ich przyspieszonego usuwania z organizmu, zanim dotrą do docelowego miejsca wiązania, jakim jest DNA komórek nowotworowych.<sup>168</sup> Zjawisko to uznawane jest za jeden z głównych mechanizmów oporności na cisplatynę. W odpowiedzi na ten problem opracowano wiele strategii mających na celu zmniejszenie oporności leków platyny(II) na glutation, obejmujących m.in.: i) projektowanie proleków platyny(IV),<sup>169</sup> ii) zastosowanie ligandów chelatujących, iii) wprowadzenie ligandów tworzących zawadę przestrzenną,<sup>170</sup> iv) włączenie ligandów S-donorowych.<sup>10</sup>

Projektując kompleksy **Pt1-Pt8** wykorzystano przede wszystkim strategię wprowadzania do sfery koordynacyjnej ligandów generujących zawadę przestrzenną. Dodatkowo, w kompleksach **Pt2**, **Pt6** i **Pt7** zastosowano S-donorową cząsteczkę DMSO.

Wszystkie nowo otrzymane kompleksy platyny(II) wykazują mniejsze powinowactwo do wiązania glutationu niż cisplatyna (Rys. 40). Najniższą reaktywność względem GSH zaobserwowano dla kompleksu **Pt8**, zawierającego w sferze koordynacyjnej dwa ligandy N-heterocykliczne i szczawian. Niską reaktywnością względem glutationu charakteryzuje się również drugi dikarboksyłanowy kompleks - **Pt3**. Natomiast analiza serii dichlorkowych kompleksów platyny(II) wskazuje, iż związki zawierające w sferze koordynacyjnej dwa ligandy N-heterocykliczne (**Pt1**, **Pt4**, **Pt5**) reagują z glutationem wolniej, niż kompleksy typu [Pt(N-donor)(S-donor)] (**Pt6**, **Pt7**). Wyniki te sugerują, że efekt zawady sterycznej generowany przez ligandy N-heterocykliczne ma większy wpływ na stabilność kompleksów niż włączenie do sfery koordynacyjnej liganda S-donorowego.



Rys. 40 Stężenie GSH po inkubacji z kompleksami **Pt1**, **Pt2**, **Pt4** - **Pt8** i cisplatyną.

Obniżona reaktywność związków koordynacyjnych **Pt1**, **Pt3** i **Pt4** - **Pt8** wobec GSH wskazuje na ich zwiększoną stabilność w środowisku wewnątrzkomórkowym, co może ograniczać procesy przedwczesnej dezaktywacji i eliminacji tych związków z komórek. W połączeniu z wykazanim wcześniej lipofilowym charakterem kompleksów Pt(II) może to sprzyjać osiągnięciu większych stężeń wewnątrzkomórkowych. W konsekwencji możliwe jest uzyskanie porównywalnego efektu cytotoksycznego przy zastosowaniu niższych dawek terapeutycznych w porównaniu z cisplatyną. Ponadto odmienny profil oddziaływania z GSH sugeruje, że analizowane kompleksy Pt(II) mogą w pewnym stopniu omijać mechanizmy oporności charakterystyczne dla cisplatyny.

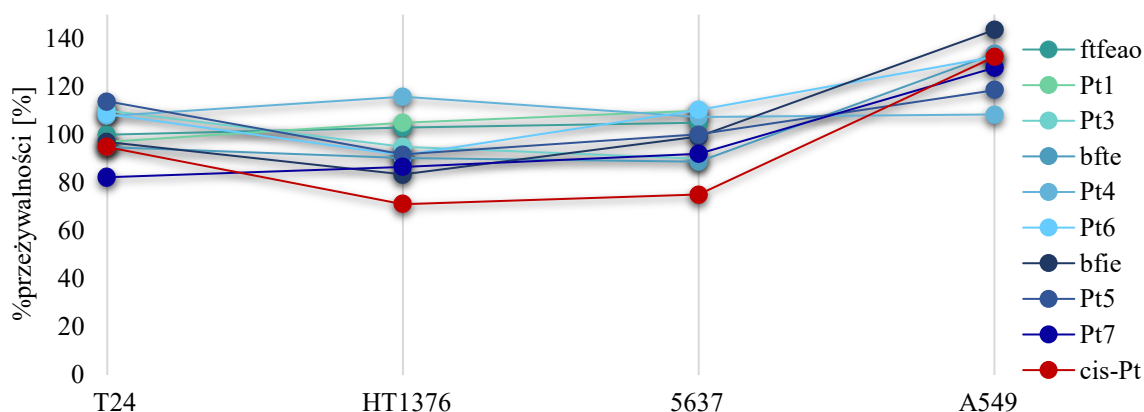
Uzyskane wyniki dotyczące ograniczonej reaktywności kompleksów Pt(II) z GSH stanowiły podstawę do zakwalifikowania wszystkich przebadanych związków kompleksowych Pt(II) do oceny ich aktywności cytotoksycznej w warunkach *in vitro*.

Warto również zaznaczyć, iż kompleksy **Ru1** - **Ru3** nie zostały poddane analizie oddziaływania z GSH ze względu na niskie powinowactwo Ru(II) do grup tiolowych. Natomiast niska rozpuszczalność kompleksu **Pt2** uniemożliwiła zarówno ocenę jego reaktywności względem GSH jak i przeprowadzenie dalszych badań biologicznych, co w konsekwencji wykluczyło ten związek jako potencjalnego kandydata na lek.

### 11.2.3 Aktywność cytotoksyczna *in vitro* związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II)

Kompleksy platyny(II) **Pt1**, **Pt3**, **Pt4 - Pt7** oraz odpowiadające im nieskoordynowane ligandy **ftfeao**, **bfte** i **bfi**e poddano wstępnej analizie potencjału cytotoksycznego *in vitro* poprzez ocenę ich wpływu na żywotność komórek raka pęcherza moczowego (linie: T24, HT1376, 5637) oraz komórek raka płuca (linia A549) z zastosowaniem testu MTT.

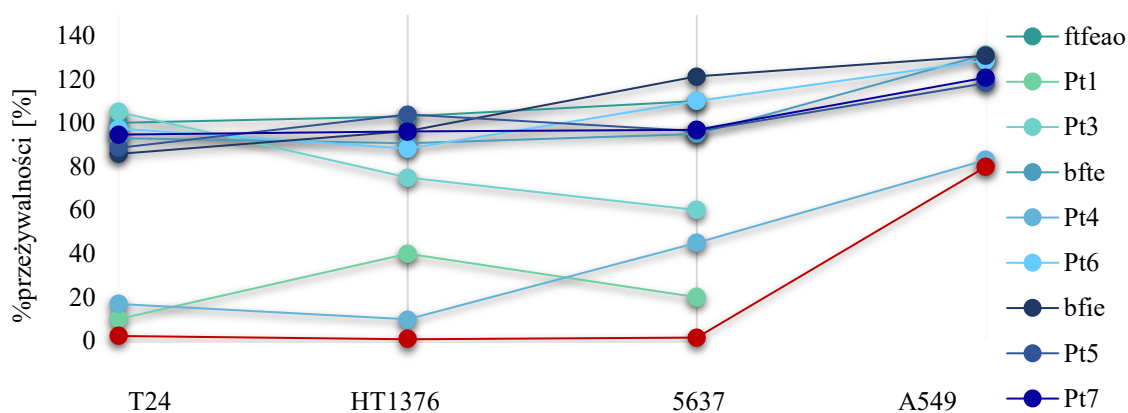
Analiza wpływu badanych związków na żywotność komórek wykazała, że przy stężeniu 1  $\mu\text{M}$  zarówno nowo zsyntetyzowane kompleksy Pt(II), jak i odpowiadające im nieskoordynowane ligandy, nie powodowały istotnych zmian w przeżywalności badanych linii komórkowych (Rys. 41). Odmienną odpowiedź komórkową zaobserwowano jedynie w przypadku cisplatyny, której obecność prowadziła do istotnego obniżenia żywotności komórek linii HT137 oraz 5637, odpowiednio do poziomu 71,08% i 24,88%.



Rys. 41 Przeżywalność komórek po inkubacji z kompleksami **Pt1**, **Pt3**, **Pt4 - Pt7**, ligandami **ftfeao**, **bfte** i **bfi**e oraz cisplatyną w stężeniu 1  $\mu\text{M}$ .

Z kolei po zwiększeniu stężenia do 10  $\mu\text{M}$  (Rys. 42) zaobserwowano istotne obniżenie żywotności komórek inkubowanych z kompleksami **Pt1** i **Pt4**. Żywotność komórek z linii T24, HT137 i 5637 spadła odpowiednio do 10,28%, 40,12% i 20,01% po inkubacji z kompleksem **Pt1**, natomiast w obecności kompleksu **Pt4** wartości te wynosiły odpowiednio 16,89 %, 9,94 %, 45,00 %. Dla porównania, cisplatyna wykazywała znacznie silniejsze działanie cytotoksyczne prowadząc do spadku żywotność tych linii komórkowych odpowiednio do 2,32 % 0,76 % i 1,57 %. Pozostałe badane związki koordynacyjne platyny(II) (**Pt3**, **Pt5 - Pt7**) charakteryzowały się tylko minimalnym wpływem na przeżywalność komórek, która utrzymywała się na poziomie zbliżonym do kontroli lub uległa jedynie nieznacznemu obniżeniu. Co istotne,

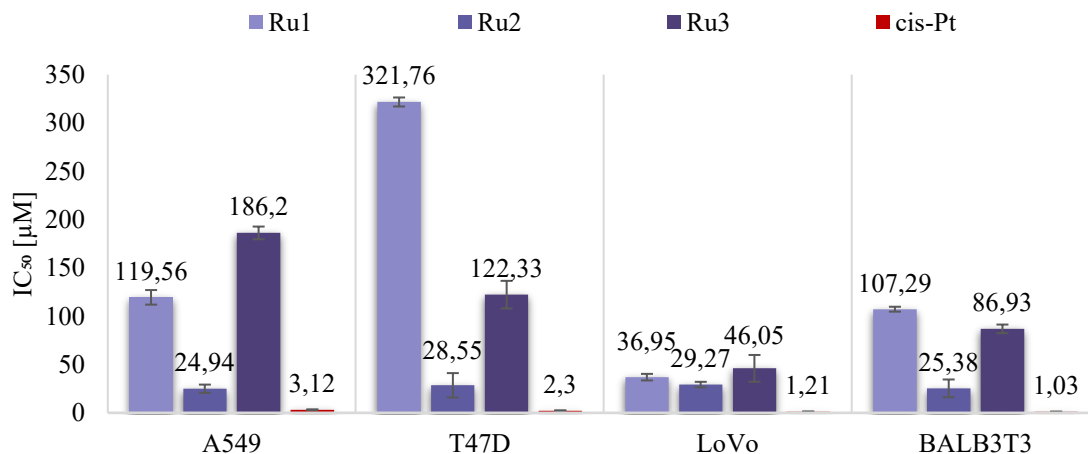
nieskoordynowane ligandy **ftfeao**, **bftfe** i **bftfe** nie wpłynęły na żywotność komórek nowotworowych. Dopiero koordynacja **ftfeao** i **bftfe** do platyny(II) w kompleksach **Pt1** i **Pt4** powodowała pojawienie się aktywności cytotoksycznej.



Rys. 42 Przeżywalność komórek po inkubacji z kompleksami **Pt1**, **Pt3**, **Pt4** - **Pt7**, ligandami **ftfeao**, **bftfe** i **bftfe** oraz cisplatyną w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ .

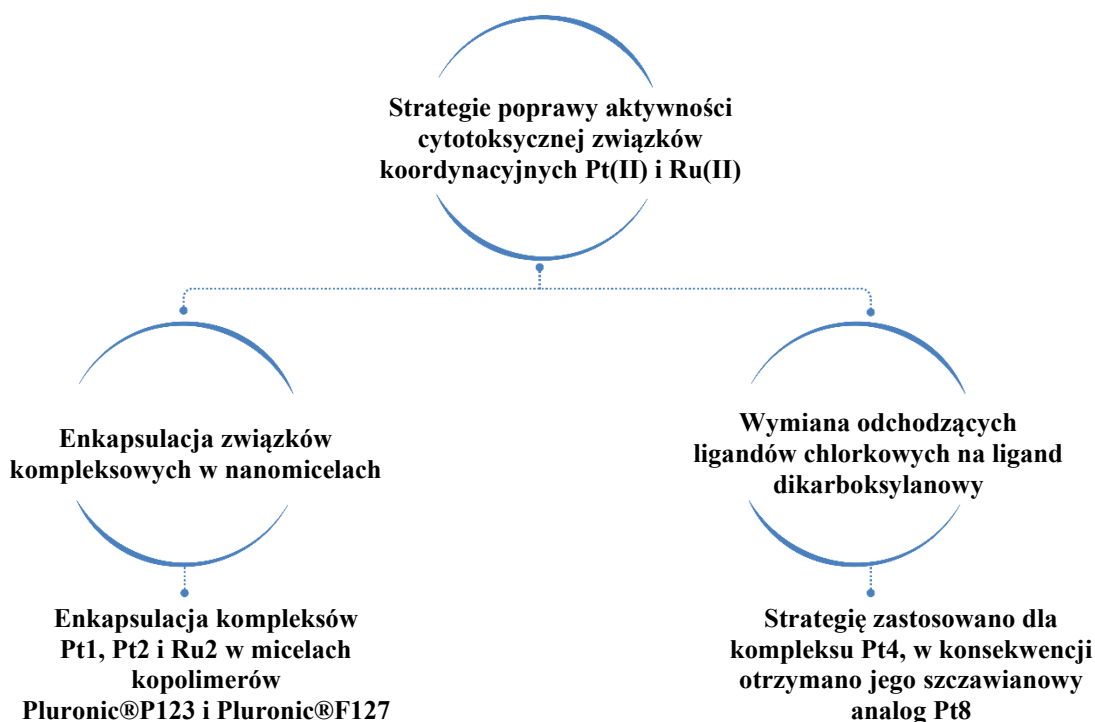
Następnie przeprowadzono ocenę potencjału cytotoksycznego *in vitro* kompleksów **Ru1** - **Ru3**, wyznaczając wartość  $\text{IC}_{50}$  z zastosowaniem testu SRB. Uzyskane wyniki (Rys. 43) wskazują, że spośród badanych kompleksów Ru(II) największą aktywność cytotoksyczną wykazuje **Ru2** ( $\text{IC}_{50} = 24,94 - 29,27 \mu\text{M}$ ). Mimo to jego potencjał cytotoksyczny jest niższy niż cisplatyny ( $\text{IC}_{50} = 1,21 - 3,12 \mu\text{M}$ ). Z kolei związki **Ru1** i **Ru3** wykazują niewielką aktywność cytotoksyczną wobec linii komórek nowotworowych A549 i T47D ( $\text{IC}_{50} = 119,56 - 321,76 \mu\text{M}$ ), natomiast oba te kompleksy są aktywne wobec linii komórkowej LoVo ( $\text{IC}_{50\text{Ru1}} = 36,95 \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50\text{Ru3}} = 46,05 \mu\text{M}$ ).

Warto zwrócić uwagę, iż uzyskane wyniki są analogiczne z obserwacjami naszego zespołu badawczego dotyczącymi p-cymenowych analogów kompleksów rutenu(II) z 5,7-dipodstawionymi triazolopirymidynami,<sup>115</sup> gdzie kompleks  $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{Ru}(\text{dptp})\text{Cl}_2]$  wykazał najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec linii komórek nowotworowych A549 i T47D.<sup>115</sup> Zauważono również, że substytucja liganda arenowego z p-cymenu na bifenyl znacząco zwiększyła cytotoksyczność kompleksów wobec komórek nowotworowych - wartość  $\text{IC}_{50}$  w przypadku linii komórkowej A549 obniżyła się z 83,1  $\mu\text{M}$ <sup>115</sup> do 24,94  $\mu\text{M}$ , a dla linii komórkowej T47D z 34,9  $\mu\text{M}$ <sup>115</sup> do 28,55  $\mu\text{M}$ . Podobne zależności były również obserwowane przez innych badaczy, którzy wykazali większą cytotoksyczność bifenylowych kompleksów rutenu(II) w porównaniu z ich p-cymenowymi analogami.<sup>105,171,172</sup>



Rys. 43 Cytotoksyczność *in vitro* kompleksów **Ru1** - **Ru3** i cisplatyny wyrażona jako parametr  $IC_{50}$  [ $\mu M$ ].

Analiza wyników wykazała, że związki koordynacyjne **Pt1**, **Pt4** oraz **Ru2** należą do najbardziej cytotoksycznych *in vitro* spośród nowo zsyntetyzowanych związków Pt(II) i Ru(II). Kompleksy te wytypowano do dalszych, pogłębionych analiz nad ich potencjałem cytotoksycznym. Wstępne wyniki badań ujawniły jednak, że ich aktywność cytotoksyczna pozostaje nadal niższa niż cisplatyny, co najprawdopodobniej wynika z ograniczonej rozpuszczalności kompleksów. W celu jej poprawy zaproponowano dwa rozwiązania (Rys. 43).



Rys. 44 Strategie poprawy aktywności cytotoksycznej *in vitro* wybranych związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II).

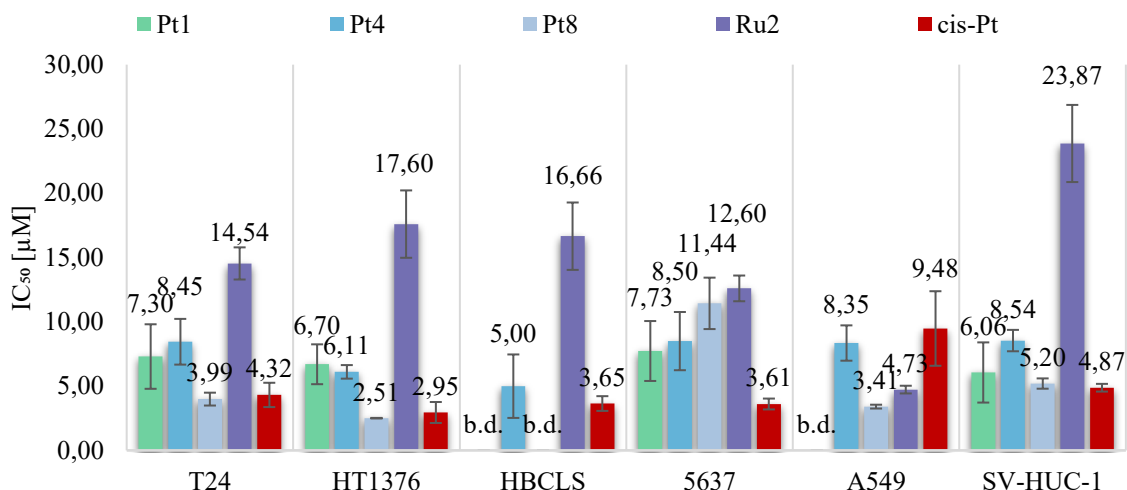
Pogłębione badania nad potencjałem cytotoksycznym związków koordynacyjnych **Pt1**, **Pt4** i **Ru2** rozpoczęto od wyznaczenia parametru  $IC_{50}$  wobec wybranych linii komórek nowotworowych pęcherza moczowego i płuca (T24, HT1376, HB-CLS-1, 5637, A549) oraz komórek prawidłowych izolowanych z moczowodu (SV-HUC-1) z wykorzystaniem testu MTT. Do badań dodatkowo włączono kompleks **Pt8** otrzymany w ramach realizacji strategii mającej na celu zwiększenie aktywności cytotoksycznej kompleksu **Pt4**.

Przeprowadzone analizy dowiodły, że kompleksy **Pt1**, **Pt4**, **Pt8** i **Ru2** wykazały działanie cytotoksyczne wobec badanych linii komórek nowotworowych ( $IC_{50} = 2,51 - 17,60 \mu M$ ) (Rys. 45). Jednocześnie warto podkreślić, iż wszystkie te kompleksy charakteryzowały się obniżoną toksycznością względem komórek prawidłowych SV-HUC-1 ( $IC_{50} = 5,20 - 23,87 \mu M$ ), w porównaniu z cisplatyną ( $IC_{50} = 4,87 \mu M$ ).

Analiza wpływu rodzaju atomu centralnego na aktywność cytotoksyczną badanych związków wskazuje, że kompleksy platyny(II) charakteryzują się wyższą aktywnością wobec analizowanych linii komórek nowotworowych ( $IC_{50} = 2,51 - 8,50 \mu M$ ) niż kompleksy rutenu(II) ( $IC_{50} = 14,54 - 17,60 \mu M$ ).

Dalsze rozważania objęły zależność aktywności cytotoksycznej od składu sfery koordynacyjnej związków kompleksowych platyny(II). Wykazano, że dichlorkowe kompleksy Pt(II) charakteryzują się zbliżoną cytotoksycznością względem badanych linii komórek nowotworowych. Wyznaczone wartości  $IC_{50}$  dla **Pt1** i **Pt4** mieszczą się w przedziale  $5,00 - 8,50 \mu M$  i pozostają niższe niż cisplatyny ( $IC_{50} = 2,95 - 9,48 \mu M$ ). Wyjątek stanowiła linia A549, wobec której kompleks **Pt4** wykazywał nieznacznie wyższą aktywność ( $IC_{50} = 8,35 \mu M$ ) w porównaniu z cisplatyną ( $IC_{50} = 9,48 \mu M$ ).

Z kolei zastąpienie ligandów chlorkowych ligandem szczawianowym w kompleksie **Pt8** wywołało wyraźną poprawę aktywności cytotoksycznej ( $IC_{50} = 2,51 - 7,15 \mu M$ ) względem jego dichlorkowego analogu **Pt4**. Kompleks **Pt8** wykazywał wyższą cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych linii T24, HT1376 oraz A549 ( $IC_{50} = 2,51 - 3,99 \mu M$ ) niż cisplatyna ( $IC_{50} = 2,95 - 9,48 \mu M$ ).



Rys. 45 Cytotoksyczność kompleksów platyny(II) i rutenu(II) oraz cisplatyny wyrażona jako parametr  $IC_{50}$  [ $\mu M$ ].

Podsumowując, wyznaczone wartości parametrów  $IC_{50}$  dla kompleksów **Pt1**, **Pt4**, **Pt8** i **Ru2** jednoznacznie potwierdziły ich cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych. Istotnym aspektem jest również obniżona toksyczność tych kompleksów względem komórek prawidłowych, w porównaniu do cisplatyny, co może częściowo rekompensować konieczność zastosowania w niektórych przypadkach wyższych dawek terapeutycznych i wskazuje na potencjalnie korzystny indeks terapeutyczny.

W kolejnym etapie badań zrealizowano drugą strategię mającą na celu zwiększenie aktywności cytotoksycznej wybranych związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II). W tym celu kompleksy **Pt1**, **Pt4** i **Ru2** poddano enkapsulacji w kopolimerach Pluronic®, a następnie oceniono wpływ ich zamknięcia w strukturach micelarnych na potencjał cytotoksyczny.

#### 11.2.4 Enkapsulacja w micelach Pluronic®

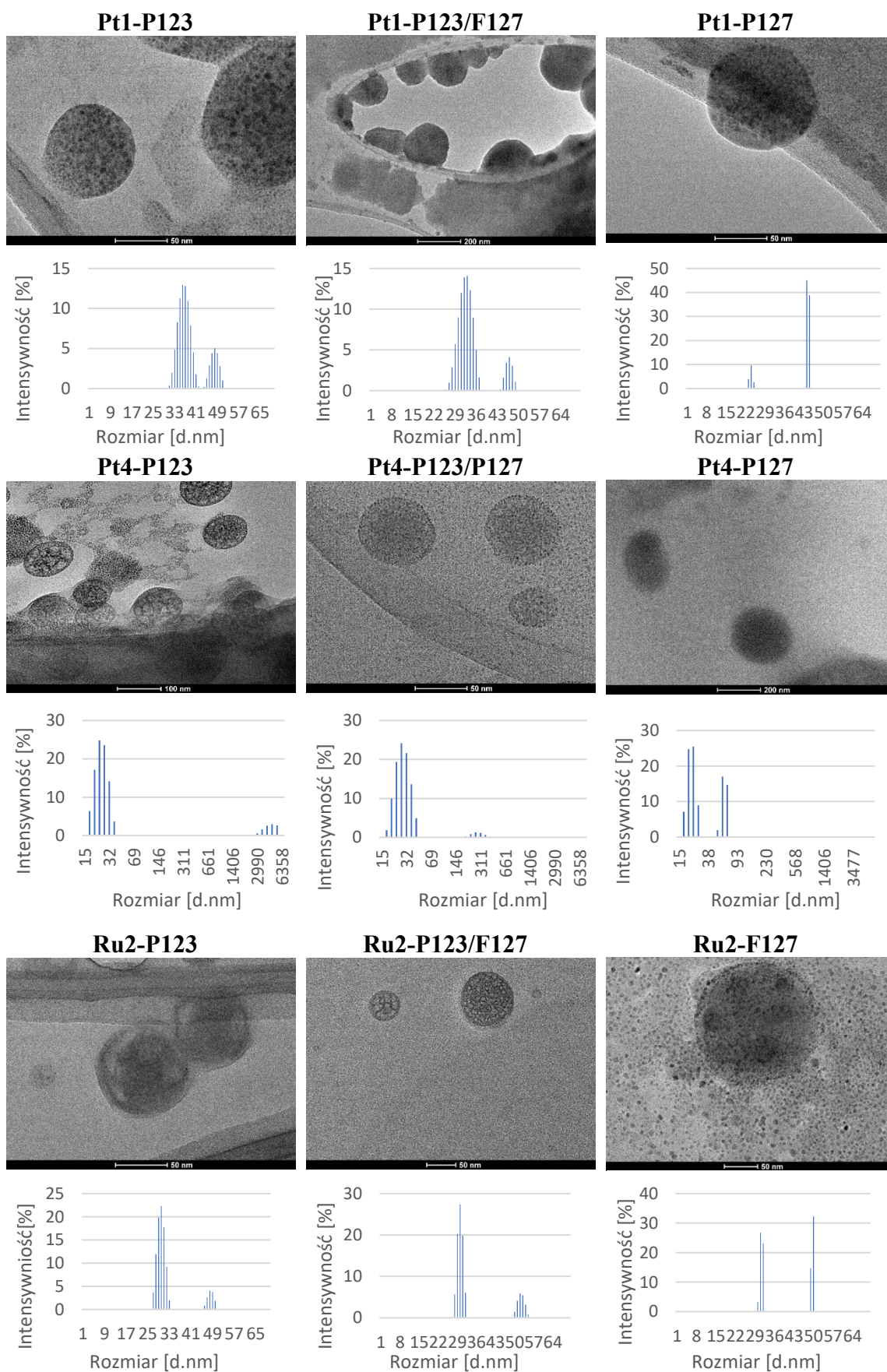
Enkapsulacja w micelach polimerycznych Pluronic® stanowi efektywną strategię zwiększenia rozpuszczalności związków lipofilowych w płynach ustrojowych, wydłużenia czasu ich krążenia oraz poprawę wychwytu związków przez komórki. Dodatkowo wykazano, że kopolimery Pluronic®F127, P123 i L121 mogą bezpośrednio oddziaływać na komórki nowotworowe poprzez modyfikację mikrolepkości błon plazmatycznych i skuteczne hamowanie funkcji glikoproteiny P, co prowadzi do zwiększenia wewnątrzkomórkowej akumulacji substancji czynnej.<sup>173</sup>

W związku z powyższym kompleksy **Pt1**, **Pt4** i **Ru2** poddano enkapsulacji w micelach dwóch kopolimerów amfifilowych (Pluronic®P123, Pluronic®F127),

różniących się równowagą hydrofilowo-lipofilową, a także w formulacji mieszanej uzyskanej przez połączenie obu kopolimerów w stosunku masowym 3:2 (Pluronic®P123/F127). Zarówno Pluronic®P123, jak i Pluronic®F127 należą do trójblokowych kopolimerów składających się z poli(tlenku etylenu) (PEO) i poli(tlenku propylenu) (PPO), które w środowisku samoczynnie organizują się, tworząc nanometryczne micelle. Hydrofilowa powłoka miceli jest zbudowana z PEO, natomiast hydrofobowy rdzeń, w którym enkapsulowany jest związek tworzony jest z PPO. Morfologia powstających miceli zależy od stosunku jednostek PPO:PEO. Pomimo identycznego składu blokowego, Pluronic®P123 i Pluronic®F127 różnią się strukturą molekularną, odpowiednio EO<sub>20</sub>PO<sub>70</sub>EO<sub>20</sub> i EO<sub>106</sub>PO<sub>70</sub>EO<sub>106</sub>. Pluronic®P123 zawiera 30% PEO na unimer (stosunek PPO : PEO 1,75), podczas gdy Pluronic®F127 zawiera 70% PEO na unimer (stosunek PPO : PEO 0,33).<sup>174</sup> Zwiększony udział PEO sprzyja tworzeniu miceli o mniejszym rdzeniu hydrofobowym, wyższym stopniu uwodnienia oraz mniejszej tendencji do agregacji. Z kolei układy z wyższym udziałem segmentów PPO zazwyczaj tworzą bardziej zwarte i mniej uwodnione struktury micelarne.<sup>175</sup>

Po zakończeniu procedury enkapsulacji otrzymane próbki poddano analizie rozkładu wielkości cząstek przeprowadzonej metodą DLS (Rys. 46). Wykonane badania pokazują, że enkapsulacja kompleksów **Pt1**, **Pt4** i **Ru2** w micelach Pluronic®P123 i Pluronic®P123/F127 prowadziła do powstania stosunkowo jednorodnych cząstek o wielkościach 25 - 37 nm (**Pt1**), 18 - 38 nm (**Pt4**) i 26 - 34 nm (**Ru2**). We wszystkich analizowanych układach obserwowano również rozpraszanie światła przez większe struktury 44 - 51 nm (**Pt1**) i 50 - 56 nm (**Ru2**). W przypadku miceli zawierających kompleks **Pt4** stwierdzono obecność szczególnie dużych frakcji o rozmiarach około 200 nm - 5,50 µm, co wskazuje na sporadyczne zjawiska aglomeracji. Z kolei micelle utworzone z kopolimeru Pluronic®F127 wykazywały dwa odmienne rozkłady wielkości: 22 - 24 nm i 44 - 46 nm (**Pt1**) 18 - 28 nm i 50 - 70 nm (**Pt4**) oraz 29 - 32 nm i 48-50 nm, bez sygnałów odpowiadających dużym agregatom, co sugeruje wyższą stabilność koloidalną tych układów.

Wyniki obrazowania TEM (Rys. 46) dostarczyły dodatkowych informacji na temat rozmiarów i morfologii miceli. Analiza wykazała, że otrzymane struktury mają przeważnie kształt kulisty o rozmiarach w zakresie 40 - 165 nm, przy czym dominującą frakcję stanowią micelle o średnicach < 70 nm. Dane te są zgodne z wynikami uzyskanymi metodą DLS.



Rys. 46 Zestawienie obrazów TEM i analiz DLS dla kompleksów **Pt1**, **Pt4** i **Ru2** zamkniętych w micelach Pluronic®.

W celu potwierdzenia skutecznej enkapsulacji kompleksów **Pt1**, **Pt4** i **Ru2** w micelach Pluronic® wykonano analizę ICP-MS. Przeprowadzone oznaczenia potwierdziły obecność odpowiedniego metalu (platyny lub rutenu) we wszystkich próbkach (Tab. 28). Największa wydajność enkapsulacji obserwowana jest dla kompleksu **Pt4**, natomiast najmniejsza dla **Pt1**. Analiza wpływu rodzaju kopolimeru na efektywność enkapsulacji wykazała ponadto, że niezależnie od rodzaju kompleksu największą wydajność uzyskiwano w przypadku miceli Pluronic®P123.

Tab. 28 Stężenia [ $\mu\text{g/l}$ ] platyny w zawiesinach miceli kompleksów **Pt1** i **Pt4** oraz rutenu w zawieszynie miceli kompleksu **Ru2** oznaczone metodą ICP-MS.

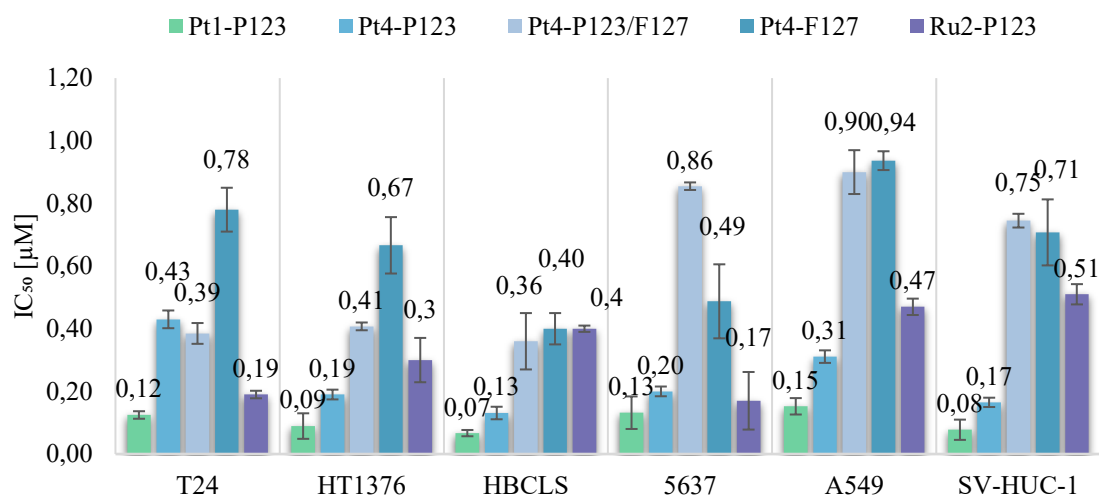
	<b>P123</b>	<b>P123/F127</b>	<b>F127</b>
<b>Pt1</b>	495 ± 16	419 ± 3	450 ± 1
<b>Pt4</b>	5746 ± 44	3052 ± 275	5335 ± 227
<b>Ru2</b>	2206 ± 230	2046 ± 563	2009 ± 448

### 11.2.5 Aktywność cytotoksyczna *in vitro* związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) po enkapsulacji w micelach Pluronic®

W kolejnym etapie badań oceniono wpływ enkapsulacji kompleksów **Pt1**, **Pt4** i **Ru2** w micelach Pluronic® na ich cytotoksyczność *in vitro*. Jako pierwszy badaniom poddano związek **Pt4**. Największy efekt cytotoksyczny (Rys. 47) zaobserwowano po inkubacji komórek nowotworowych z micelami **Pt4-P123** ( $IC_{50} = 0,13 - 0,43 \mu\text{M}$ ). Uwzględniając zarówno uzyskany efekt cytotoksyczny jak i największą wydajność enkapsulacji pozostałych dwóch kompleksów polimerze Pluronic®P123 (Tab. 28), do dalszych badań aktywności cytotoksycznej wytypowano micelle **Pt1-P123** oraz **Ru2-P123**. Enkapsulacja w micelach Pluronic®P123 skutkowała wyraźnym wzrostem cytotoksyczności - wszystkie otrzymane formułacje micelarne wykazywały submikromolarne wartości  $IC_{50}$  ( $IC_{50} = 0,07 - 0,94 \mu\text{M}$ ), istotnie przewyższając cisplatynę ( $IC_{50} = 2,95 - 9,48 \mu\text{M}$ ), w niektórych przypadkach nawet o ponad jeden rząd wielkości. Najsilniejszy efekt cytotoksyczny odnotowano dla formułacji **Pt1-P123** ( $IC_{50} = 0,07 - 0,15 \mu\text{M}$ ).

Obserwowana wyraźna poprawa aktywności cytotoksycznej po enkapsulacji jest zbyt duża, aby można ją było tłumaczyć jedynie zwiększoną rozpuszczalnością kompleksów. Sugeruje, to że kluczową rolę odgrywa ograniczenie przedwczesnej

dezaktywacji związków oraz bardziej efektywne dostarczenie do wnętrza komórek, które łącznie przyczyniają się do podwyższonego o działania cytotoksycznego.

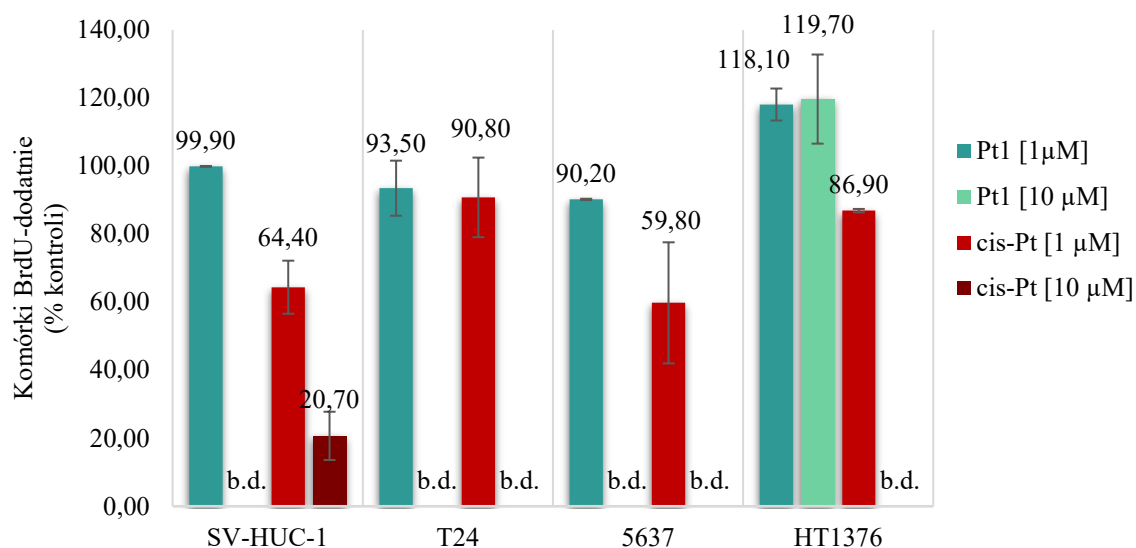


Rys. 47 Cytotoksyczność kompleksów **Pt1**, **Pt4** i **Ru2** zamkniętych w micelach *Pluronic®P123* i *Pluronic®F127* wyrażona jako parametr  $IC_{50}$  [ $\mu M$ ].

### 11.2.6 Aktywność antyproliferacyjna *in vitro*

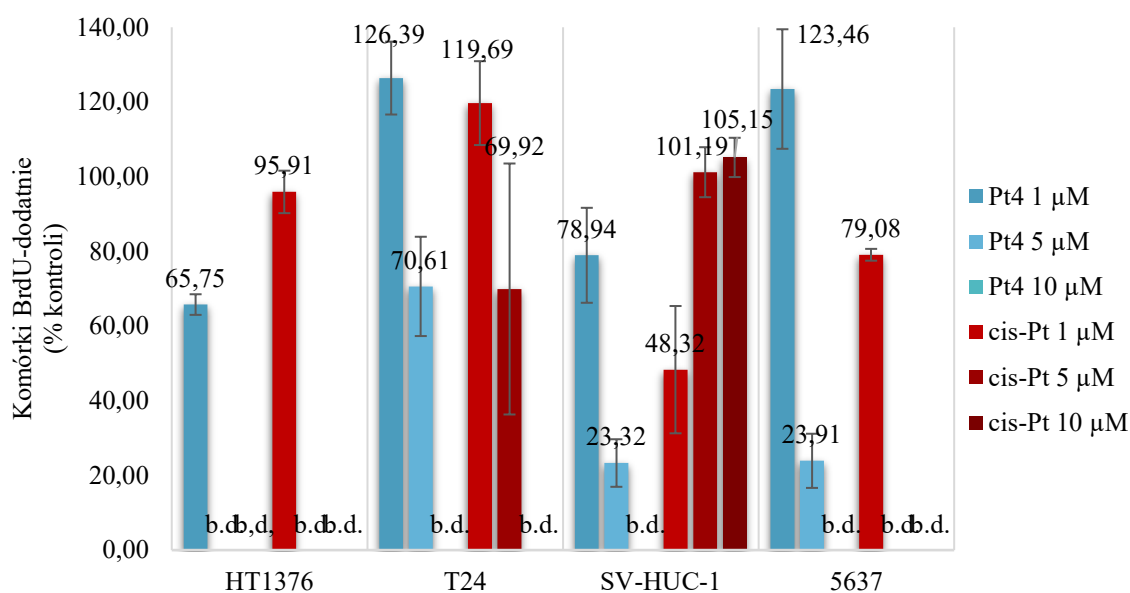
Kolejnym etapem badań biologicznych było określenie, czy najbardziej cytotoksyczne kompleksy **Pt1**, **Pt4**, **Pt8** i **Ru2** wykazują właściwości antyproliferacyjne.

Analiza przeprowadzona dla kompleksu **Pt1** (Rys. 48) wykazała, że w stężeniu  $1 \mu M$  związek ten nie wywoływał istotnych zmian w proliferacji badanych linii komórkowych, co potwierdzał odsetek komórek BrdU-dodatnich mieszczących się w zakresie 90,20% - 118,10%. W tym samym stężeniu cisplatyna znacząco hamowała proliferację komórek (%komórek BrdU-dodatnich = 59,80% - 86,90%). Z kolei przy stężeniu  $10 \mu M$  kompleks **Pt1** tak silnie hamował proliferację, że nie było możliwe ilościowe określenie liczby komórek BrdU-dodatnich. Wyjątek stanowiła linia HT1376, w której w tym stężeniu nie stwierdzono istotnych zmian w proliferacji (%komórek BrdU-dodatnich = 119,7%).



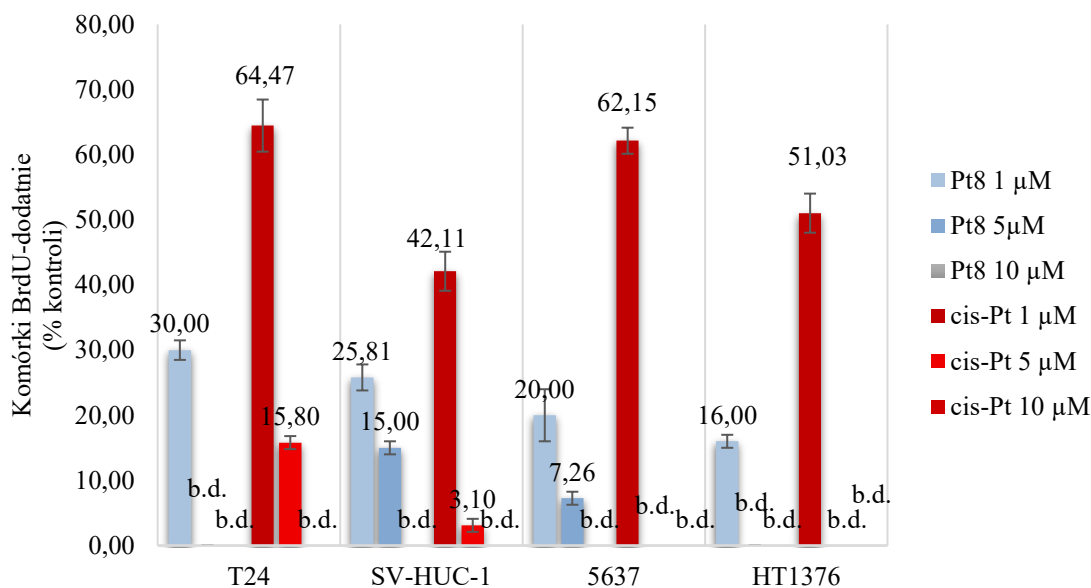
Rys. 48 Komórki BrdU-dodatnie po inkubacji z kompleksem **Pt1** i cisplatyną w stężeniach 1 μM i 10 μM wyrażone jako %kontroli (b.d. - brak danych; zbyt mała liczba komórek do wiarygodnej oceny).

Analiza antyproliferacyjnego działania kompleksu **Pt4** (Rys. 49) wykazała, że w stężeniu 1 μM efekt ten był zróżnicowany i zależny od rodzaju linii komórkowej. Odsetek komórek BrdU-dodatnich mieścił się w zakresie 65,75% - 126,39%. Dla porównania, po zastosowaniu cisplatyny w tym samym stężeniu wartości te wynosiły 48,32% - 119,69%. Zwiększenie stężenia kompleksu **Pt4** do 5 μM prowadziło do wyraźnego zahamowania proliferacji w liniach SV-HUC-1 oraz 5637, gdzie odsetek komórek proliferujących wynosił odpowiednio 23,32% i 23,91%. W przypadku linii HT1376 i T24 liczba żywych komórek była na tyle niska, że nie było możliwe wiarygodne ilościowe oznaczenie komórek BrdU-dodatnich. Podobny efekt obserwowano dla cisplatyny w stężeniach 5 - 10 μM, która w większości badanych linii znacznie ograniczała liczbę żywych komórek, uniemożliwiając rzetelną analizę proliferacji. Natomiast w przypadku tej analizy zaobserwowano wyższe tempo proliferacji SV-HUC-1 w wyższych stężeniach cisplatyny (5 i 10 μM) w porównaniu z niższymi dawkami, co najprawdopodobniej wynikało z ograniczonej liczby analizowanych komórek i stanowiło efekt statystyczny.



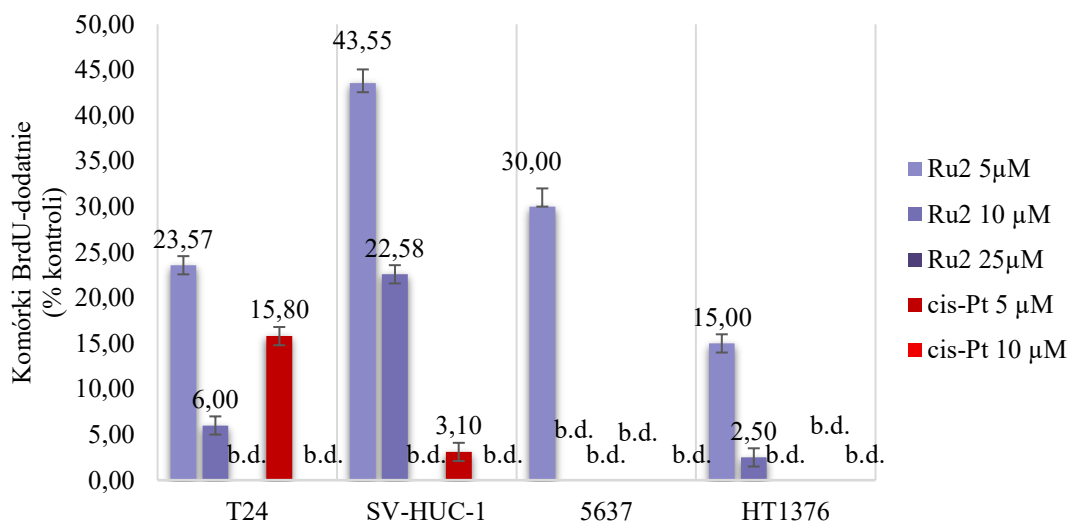
Rys. 49 Komórki BrdU-dodatnie po inkubacji z kompleksem **Pt4** i cisplatyną w stężeniach 1 μM, 5 μM i 10 μM wyrażone jako %kontrola (b.d. - brak danych; zbyt mała liczba komórek do wiarygodnej oceny).

Z kolei analiza działania kompleksu **Pt8** (Rys. 50) wykazała wyraźny wpływ na proliferację wszystkich badanych linii komórkowych. Już przy zastosowaniu stężenia 1 μM obserwowano znaczne zahamowanie proliferacji, o czym świadczy odsetek komórek BrdU-dodatnich mieszczący się w zakresie 16,00 % - 30,00 %. Dla porównania, po inkubacji komórek z cisplatyną w tym samym stężeniu wartości te były wyższe i wynosiły 42,11 % - 64,47 %. Zwiększenie stężenia **Pt8** do 5 μM prowadziło do dalszego obniżenia proliferacji komórek z linii 5637 i SV-HUC-1, odpowiednio do 7,26 % i 15,00 %. Natomiast w liniach T24 i HT1376 liczba żywych komórek była na tyle ograniczona, że nie było możliwe wiarygodne ilościowe oznaczenie komórek BrdU-dodatnich, analogiczny efekt obserwowano po zastosowaniu stężenia 10 μM.



Rys. 50 Komórki BrdU-dodatnie po inkubacji z kompleksem **Pt8** i cisplatyną w stężeniach 1 µM, 5 µM i 10 µM wyrażone jako %kontroli (b.d. - brak danych; zbyt mała liczba komórek do wiarygodnej oceny).

Analiza działania kompleksu **Ru2** (Rys. 51) również wykazywała jego istotny wpływ na proliferację wszystkich badanych linii komórkowych. W stężeniu 5 µM obserwowano wyraźne zahamowanie proliferacji badanych linii komórek nowotworowych od 15,00 % - 43,55 %. Dla porównania, po inkubacji komórek z cisplatyną w tym samym stężeniu proliferacja komórek wynosiła odpowiednio 3,10 % i 15,80 % dla linii komórkowej SV-HUC-1 i T24, natomiast w pozostałych badanych liniach komórkowych liczba żywych komórek była na tyle niska, że nie można było wiarygodnie ocenić komórek BrdU-dodatnich. Z kolei zastosowanie **Ru2** w stężeniu 10 µM prowadziło do dalszego obniżenia proliferacji dla linii T24, SV-HUC-1 i HT1376, gdzie odsetek komórek BrdU-dodatnich mieścił się w zakresie 2,50 % - 22,58 %. Natomiast przy stężeniu 25 µM obserwowano zbyt dużą śmiertelność komórek, aby wiarygodnie ocenić ich proliferację. Analogicznego stężenia cisplatyny (25 µM) nie testowano, gdyż już przy 10 µM związek ten powodował zbyt duże uszkodzenie komórek, uniemożliwiające rzetelne oznaczenie odsetka komórek BrdU-dodatnich.



Rys. 51 Komórki BrdU-dodatnie po inkubacji z kompleksem **Ru2** w stężeniach 5 μM, 10 μM i 25 μM i cisplatyną w stężeniach 1 μM, 5 μM, 10 μM wyrażone jako %kontroli (b.d. - brak danych; zbyt mała liczba komórek do wiarygodnej oceny).

Uzyskane wyniki analizy BrdU jednoznacznie wskazują na antyproliferacyjny charakter kompleksów koordynacyjnych **Pt1**, **Pt4**, **Pt8** i **Ru2** oraz potwierdzają zgodność tych obserwacji z wynikami testu MTT.

### 11.2.7 Analiza cyklu komórkowego

Analiza wpływu badanych związków koordynacyjnych na przebieg cyklu komórkowego pozwala na wstępne określenie mechanizmu ich działania.

Wykazano, że cisplatyna wpływa na cykl komórkowy wszystkich badanych linii komórek nowotworowych, indukując zatrzymanie cyklu w fazie G2/M (Tab. 29). Efekt ten jest w pełni zgodny z jej znanym cytotoksycznym mechanizmem działania, w którym tworzenie adduktów z DNA aktywuje sygnalizację punktów kontrolnych i zapobiega wejściu komórki w fazę mitozy.<sup>176</sup> W przeciwieństwie do tego, kompleksy **Pt1**, **Pt4**, **Pt8** i **Ru1** (Tab. 29) i nie wykazywały tak wyraźnego wpływu na przebieg cyklu komórkowego. Kompleksy **Pt4** i **Pt8** powodowały jedynie łagodne zatrzymanie w fazach G2/M i S, przy czym efekt ten był najbardziej zauważalny w komórkach SV-HUC-1, gdzie odsetek komórek w fazie G2/M wzrósł z 28,21%/25,11% w grupie kontrolnej do 31,62%/28,14% po inkubacji odpowiednio z **Pt4** i **Pt8**. W liniach komórek nowotworowych wpływ ten był mniej wyraźny, a odsetek komórek w fazie G0/G1 po zastosowaniu kompleksów Pt(II) i Ru(II) pozostał porównywalny z grupą kontrolną. Wyniki te sugerują, że komórki kontynuują postęp cyklu komórkowego bez większych zakłóceń, co wskazuje, że mechanizm cytotoksycznego działania badanych kompleksów Pt(II) i Ru(II) różni się

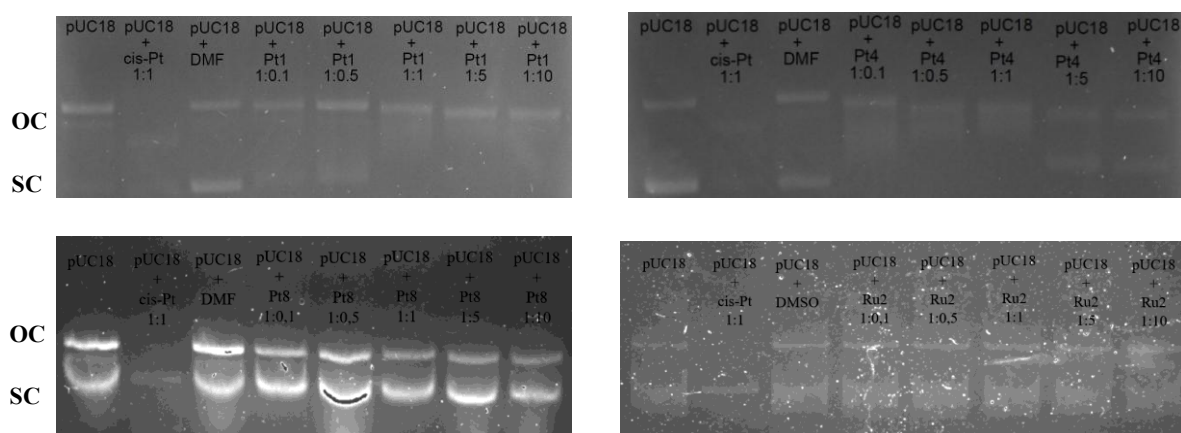
od mechanizmu cisplatyny i prawdopodobnie nie opiera się na bezpośredniej interakcji z DNA. W celu weryfikacji tego przypuszczenia dalsze badania skupiły się na określeniu oddziaływania kompleksów z DNA.

Tab. 29 Procentowy udział komórek [%] w fazach G0/G1 i G2/M cyklu komórkowego w próbie kontrolnej oraz po inkubacji z Cisplatiną i Pt1, Pt4, Pt8 i Ru2.

	Kontrola		cis-Pt		Pt1	
	G0/G1	G2/M	G0/G1	G2/M	G0/G1	G2/M
SV-HUC-1	43,68 ± 4,31	39,25 ± 4,01	26,52 ± 13,61	49,87 ± 3,44	44,70 ± 6,30	38,30 ± 3,39
T24	65,78 ± 15,96	18,95 ± 5,48	8,7 ± 1,2	75,9 ± 4,71	80,68 ± 0,97	13,85 ± 1,77
HT1376	19,23 ± 5,68	76,55 ± 10,44	14,40 ± 1,55	77,35 ± 2,75	19,70 ± 6,68	75,93 ± 10,57
5637	67,03 ± 3,19	21,43 ± 0,64	44,62 ± 3,52	44,5 ± 2,39	61,85 ± 4,73	22,95 ± 1,44
	Kontrola		cis-Pt		Pt4	
	G0/G1	G2/M	G0/G1	G2/M	G0/G1	G2/M
SV-HUC-1	55,40 ± 2,01	28,21 ± 0,25	15,23 ± 0,18	51,95 ± 0,06	47,73 ± 2,01	31,62 ± 0,81
T24	76,96 ± 0,77	14,75 ± 0,83	59,96 ± 1,62	22,41 ± 1,18	71,08 ± 0,76	16,11 ± 1,19
HT1376	76,39 ± 7,71	12,59 ± 7,21	32,54 ± 2,34	42,38 ± 3,28	65,92 ± 3,29	14,46 ± 3,46
5637	76,35 ± 1,52	16,98 ± 2,30	38,46 ± 2,32	43,00 ± 3,78	66,08 ± 2,25	17,43 ± 3,36
	Kontrola		cis-Pt		Pt8	
	G0/G1	G2/M	G0/G1	G2/M	G0/G1	G2/M
SV-HUC-1	52,87 ± 2,24	25,11 ± 1,28	17,55 ± 1,35	46,24 ± 2,27	42,48 ± 0,97	28,14 ± 1,59
T24	71,75 ± 1,78	13,72 ± 2,87	55,76 ± 1,74	20,84 ± 1,92	66,10 ± 2,54	16,11 ± 1,12
HT-1376	67,22 ± 2,17	11,08 ± 3,14	28,64 ± 2,55	37,29 ± 0,95	58,01 ± 3,01	12,72 ± 2,35
5637	71,39 ± 2,56	15,88 ± 2,41	35,96 ± 2,47	40,21 ± 3,19	61,78 ± 3,61	16,30 ± 3,89
	Kontrola		cis-Pt		Ru2	
	G0/G1	G2/M	G0/G1	G2/M	G0/G1	G2/M
SV-HUC-1	46,82 ± 0,89	31,21 ± 1,68	19,44 ± 1,12	46,61 ± 2,49	42,28 ± 1,03	32,22 ± 3,15
T24	66,62 ± 1,23	15,84 ± 1,92	31,26 ± 1,77	46,92 ± 1,99	71,19 ± 2,54	13,98 ± 1,81
HT1376	41,93 ± 5,21	42,50 ± 3,13	20,87 ± 0,87	55,60 ± 2,27	37,69 ± 2,65	43,00 ± 4,74
5637	67,13 ± 0,93	18,09 ± 1,93	39,08 ± 4,31	40,09 ± 3,53	59,96 ± 2,79	19,03 ± 3,70

## 11.2.8 Badanie reaktywności względem DNA

Analizę reaktywności badanych związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) rozpoczęto od przeprowadzenia elektroforezy w żelu agarozowym, która pozwala na określenie interakcji między superskręconym plazmidowym DNA (pUC18), a badanymi związkami koordynacyjnymi (**Pt1**, **Pt4**, **Pt8** i **Ru2**) (Rys. 52). Zarówno dla próby kontrolnej pUC18, jak i po inkubacji z kompleksami obserwowano dwa charakterystyczne pasma plazmidu: jeden w formie otwartego koła (OC), a drugi w formie superskręconej (SC). Po inkubacji DNA plazmidowego z cisplatyną w stosunku stężeń  $c_{pUC18} : c_{cis-Pt}$  1:1 widoczny był znaczny spadek ruchliwości elektroforetycznej pUC18, co wskazuje na kowalencyjne wiązanie cisplatyny z DNA. W przypadku związków koordynacyjnych **Pt1**, **Pt4**, **Pt8** i **Ru2** nie stwierdzono istotnych zmian w ruchliwości pasm plazmidowych. Dopiero zwiększenie stosunku stężeń  $c_{pUC18} : c_{kompleks}$  do 1:5 i 1:10 dla kompleksów **Pt1**, **Pt4** i **Pt8** spowodowało niewielkie obniżenie ruchliwości elektroforetycznej DNA, sugerując niewielki wpływ wiązania kowalencyjnego. Na tej podstawie można wnioskować, że DNA nie stanowi głównego miejsca działania cytotoksycznego omawianych związków kompleksowych.

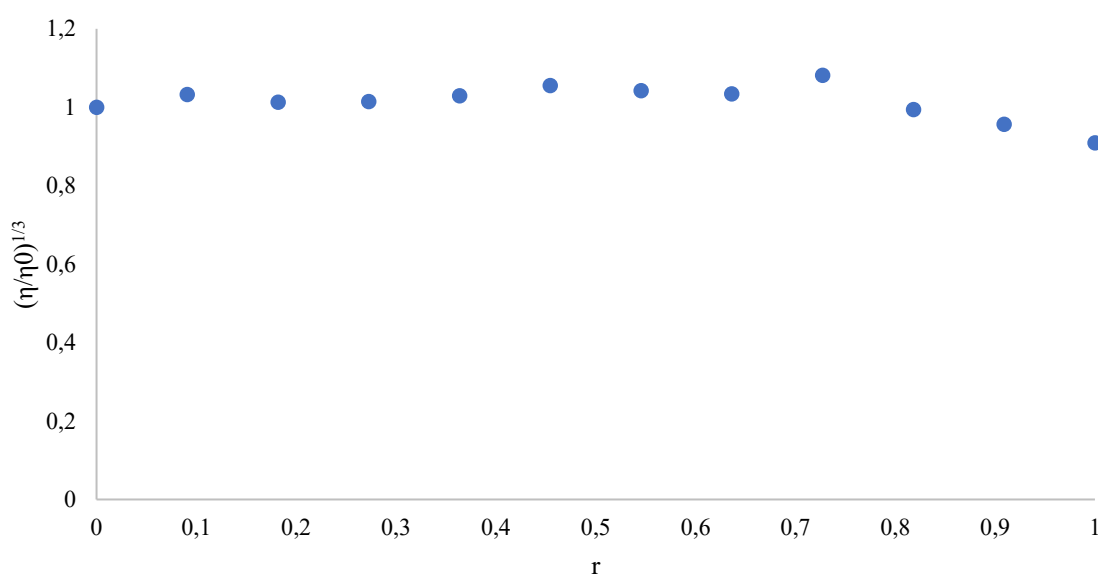


Rys. 52 Badanie ruchliwości elektroforetycznej pUC18 po 24 h inkubacji w temp. 37,0 °C z kompleksami **Pt1**, **Pt4**, **Pt8** i **Ru2**, cisplatyną oraz maksymalnym użytym stężeniem DMF, w stosunkach  $c_{pUC18} : c_{kompleks} = 1:0,1; 1:0,5; 1:1; 1:5; 1:10;$   $c_{pUC18} : c_{cis-Pt} = 1:1$ .

W celu potwierdzenia, sugerowanego na podstawie analiz cyklu komórkowego i badań ruchliwości elektroforetycznej pUC18, braku reaktywności kompleksów względem DNA przeprowadzono pogłębione badania nad reaktywnością kompleksu **Pt4** z tym biopolimerem. W niniejszym rozdziale przedstawiono jedynie wybrane eksperymenty.

Pogłębione analizy rozpoczęto od badania lepkości DNA. Podobnie jak w przypadku elektroforezy, metoda ta stanowi narzędzie do wstępnej oceny sposobu wiązania kompleksów z tym biopolimerem. Pomiar lepkości opiera się na zmianach konformacji i efektywnej długości podwójnej helisy DNA po związaniu z kompleksem. Wiązanie interkalacje prowadzi do wydłużenia helisy i wzrostu względnej lepkości DNA, z kolei wiązanie kowalencyjne, powoduje skręcenie podwójnej helisy i zmniejsza efektywną długość łańcucha, a tym samym powoduje spadek lepkości. Zmiany te przedstawia się poprzez zależności  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  od  $r = c_{\text{kompleks}}/c_{\text{DNA}}$ .

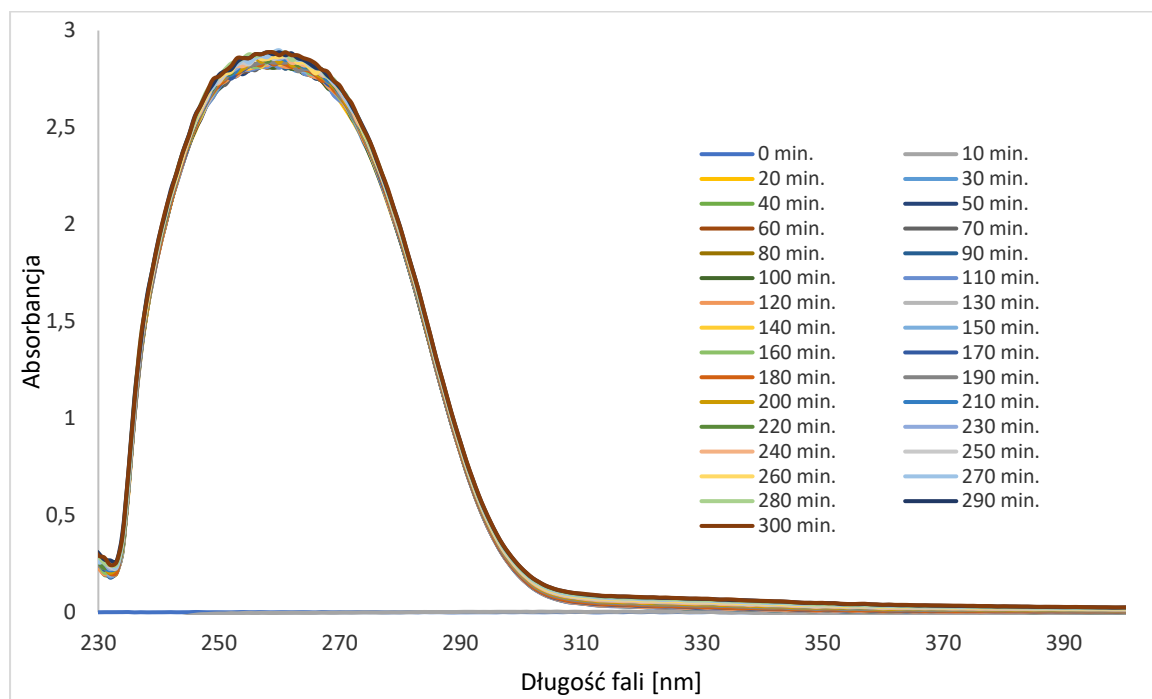
Przeprowadzone pomiary wykazały, że inkubacja DNA z kompleksem **Pt4** w analizowanym zakresie stężeń nie powoduje zmian w lepkości tego biopolimeru (Rys. 53). Wartości  $(\eta/\eta_0)^{1/3} \approx 1$ , wskazują, że analizowany związek nie wpływa na zmianę długości podwójnej helisy DNA, co potwierdza brak oddziaływań interkalacyjnych i wiązania kowalencyjnego z DNA. Jednakże, aby całkowicie wykluczyć oba te mechanizmy wykonano analizy spektrometryczne.



Rys. 53 Wykres zmian lepkości DNA wraz ze wzrostem ilości kompleksu **Pt4**;  $c_{\text{DNA}} = 120 \mu\text{M}$ ,  $r = c_{\text{kompleks}}/c_{\text{DNA}}$ ,  $(\eta/\eta^0) = (t_{\text{próbka}} - t_{\text{rozp.}})/(t_{\text{DNA}} - t_{\text{rozp.}})$ .

W kolejnym etapie oceniono możliwość tworzenia wiązania kowalencyjnego między **Pt4** a DNA z zastosowaniem analizy spektrofotometrycznej. Zmiany w widmach UV-Vis DNA są wskaźnikiem zmian strukturalnych podwójnej helisy, co obserwowane jest w postaci wpływu na kształt widma i/lub jego intensywności. Uwzględniając fakt, że wiązania kowalencyjne z DNA zachodzą stosunkowo powoli, stałe stężenie DNA

inkubowano ze stałym stężeniem kompleksu **Pt4**, a widma wykonywano w czasie 0 min. - 5h, w odstępach co 10 min. W trakcie tego eksperymentu nie zaobserwowano istotnych zmian w widmach spektrofotometrycznych DNA przed i po inkubacji z kompleksem (Rys. 54), co sugeruje brak znaczącej interakcji kowalencyjnej w badanym czasie.

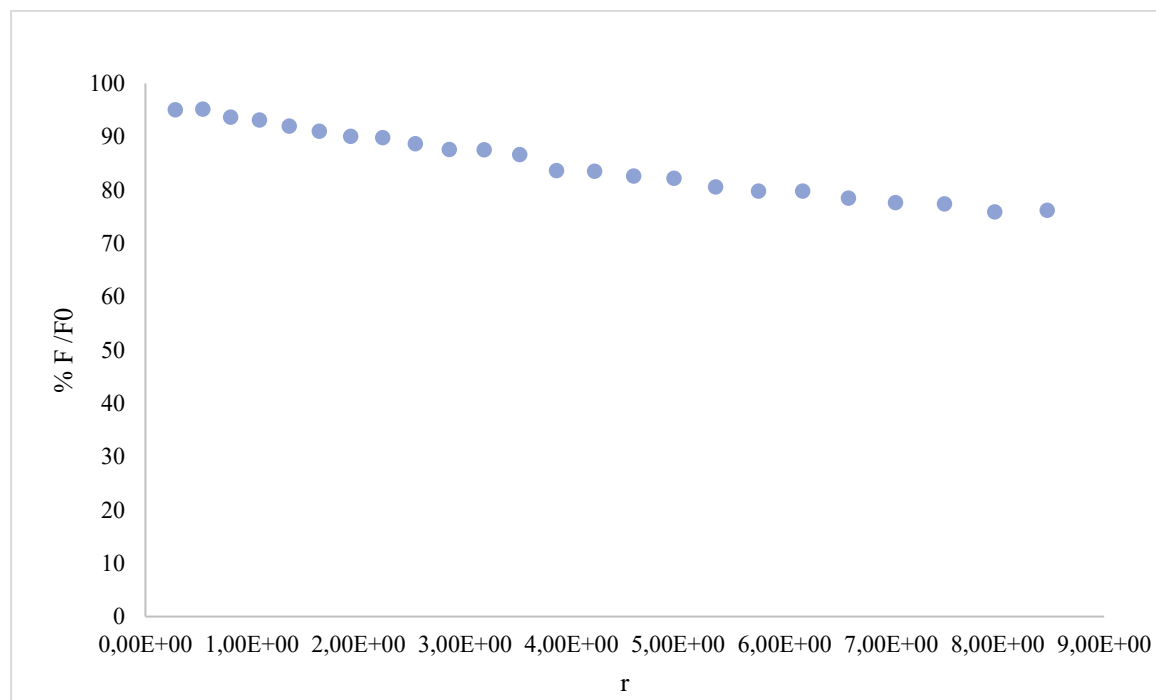


Rys. 54 Widma spektrofotometryczne DNA rejestrowane podczas inkubacji DNA z kompleksem **Pt4**.

W kolejnym etapie zbadano oddziaływanie interkalacyjne **Pt4** z DNA. Jedną z najpowszechniej stosowanych metod badania interkalacyjnego oddziaływania związków z DNA jest miareczkowanie fluorescencyjne z zastosowaniem bromku etydyny jako znacznika interkalatorowego. EtBr to fluorescencyjny barwnik, który po interkalacyjnym związaniu z DNA wykazuje emisję fluorescencji przy długości fali  $\lambda = 595$  nm. Analiza polega na wysyceniu DNA bromkiem etydyny, a następnie miareczkowaniu układu DNA-EtBr roztworem kompleksu. Konkurencyjne wypieranie bromku etydyny przez analizowany związek obserwowane jest jako obniżenie intensywności emisji fluorescencji.

Analiza wyników przeprowadzonego miareczkowania fluorescencyjnego (Rys. 55) wskazuje, że związek **Pt4** w bardzo niewielkim stopniu interkaluje DNA. Dla  $r = 1$  intensywność emisji fluorescencji pochodzącej od DNA-EtBr została obniżona jedynie o 9%. Nawet przy wyższym  $r = 8,5$  wciąż ponad połowa intensywności emisji

fluorescencji (54%) pochodzącej od DNA-EtBr pozostała niezmienną. Świadczy to o bardzo niewielkim udziale kompleksu **Pt4** w interkalacyjnym wiązaniu z DNA.



Rys. 55 Zmiany fluorescencji DNA-EtBr podczas miareczkowania kompleksem **Pt4**, gdzie  $F_0$  - początkowa intensywność emisji fluorescencji EtBr-DNA,  $F$  - intensywność emisji fluorescencji w trakcie miareczkowania,  $r = c_{Pt4}/c_{DNA}$ .

Eksperymenty reaktywności względem DNA są spójne z danymi uzyskanymi na podstawie analizy cyklu komórkowego i świadczą o tym, iż DNA nie jest głównym miejscem oddziaływania kompleksu **Pt4**. Poprzez analogie dla kompleksów **Pt1**, **Pt8** i **Ru2** można wyciągnąć tożsamy wniosek.

Uzyskane dane na temat reaktywności badanych związków kompleksowych względem DNA są spójne z faktami, iż: i) izomeria *trans* kompleksu **Pt1**, uniemożliwia tworzenie wewnątrzniowych wiązań z dwoma sąsiadującymi zasadami purynowymi DNA, ii) obecność pierścienia triazolowego w kompleksie **Pt4** determinuje jego cytotoksyczność, co uzasadnia odmienny mechanizm cytotoksycznego działania tych związków koordynacyjnych Pt(II) niż cisplatyny.

# Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej badania nowych cytotoksycznych związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) z ligandami azolowymi pozwalają na przedstawienie następujących uogólnień i wniosków dotyczących cech strukturalnych i aktywności przeciwnowotworowej *in vitro*:

## I. Wyizolowano trzy typy płasko-kwadratowych związków koordynacyjnych platyny(II), dla których określono następujący skład sfery koordynacyjnej:

### 1. [PtCl<sub>2</sub>(N-donor)<sub>2</sub>]:

**Pt1:** dwa monodentatne ligandy (1S,4R,5R)-4-(4-fenilo-1H-1,2,3-triazol-1-ylo)-2-((S)-1-feniloetylo)-2-azabicyklo[3.2.1]oktanowe skoordynowane przez atom azotu N3' i dwa jony chlorkowe w konfiguracji *trans*;

**Pt4 i Pt5:** dwa monodentatne ligandy 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylo)etenonowe lub 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-imidazol-1-ylo)etenonowe skoordynowane przez atom azotu N4'' i dwa jony chlorkowe w konfiguracji *cis*;

### 2. [PtCl<sub>2</sub>(DMSO)(N-donor)]:

**Pt2:** monodentatny (1S,4R,5R)-4-(4-fenilo-1H-1,2,3-triazol-1-ylo)-2-((S)-1-feniloetylo)-2-azabicyklo[3.2.1]oktan skoordynowany przez atom azotu N3', S-donorową cząsteczkę DMSO i dwa jony chlorkowe w konfiguracji *cis*;

**Pt6 i Pt7:** monodentatny 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylo)etenon lub (benzofuran-2-ylo)-2-(1H-imidazol-1-ylo)etenon skoordynowany przez atom azotu N4'' i dwa jony chlorkowe w konfiguracji *trans*;

### 3. [Pt(N-donor)<sub>2</sub>(ox)]:

**Pt8:** dwa monodentatne ligandy 1-(benzofuran-2-ylo)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylo)etenonowe skoordynowane przez atom azotu N4'' i O,O-chelatujący szczawian.

## II. Otrzymano pseudooktaedryczne związki koordynacyjne rutenu(II) (Ru1 - Ru3) typu [(η<sup>6</sup>-bip)RuCl<sub>2</sub>(N-donor)], w których sferę koordynacyjną Ru(II) tworzą:

monodentatny ligand triazolopirymidynowy (5,7-dimetylo-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirymidyna, 7-izobutylo-5-metylo-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirymidyna, lub 5,7-difenilo-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirymidyna) skoordynowany przez atom azotu N3, bifenyl i dwa jony chlorkowe.

### III. Określono umiarkowanie lipofilowy charakter nowo otrzymanych kompleksów Pt(II) i Ru(II).

---

Analiza korelacji struktura-lipofilowość pozwala na zaproponowanie trzech zależności:

- włączenie do sfery koordynacyjnej **liganda dikarboksyłanowego** powoduje **wzrost lipofilowości** kompleksów Pt(II);
- obecność **cząsteczki DMSO** w sferze koordynacyjnej Pt(II) **zmniejsza lipofilowość** kompleksów;
- lipofilowość w obrębie jednej grupy **ligandów N-heterocyklicznych** **rośnie** ze **wzrostem rozbudowania sterycznego** podstawników.

### IV. Wykazano, że nowo otrzymane związki kompleksowe Pt(II) charakteryzują się mniejszą reaktywnością względem glutationu niż cisplatylna.

---

Reaktywność kompleksów Pt(II) z GSH modulowana jest zarówno poprzez ligandy odchodzące jak i nieodchodzące:

- **mniejszym powinowactwem do GSH** charakteryzują się kompleksy **dikarboksyłanowe** niż **dichlorkowe**;
- **obecność dwóch ligandów N-heterocyklicznych** w sferze koordynacyjnej sprzyja **mniejszej dezaktywacji przez GSH** niż w przypadku kompleksów z mieszaną sferą koordynacyjną typu N-donor i S-donor (DMSO).

### V. Wyselekcjonowano 4 bardzo obiecujące połączenia Pt(II) Ru(II): Pt1 (*trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ftfe)<sub>2</sub>]), Pt4 (*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(bft)<sub>2</sub>]), Pt8 ([Pt(bft)<sub>2</sub>(ox)]), i Ru2 ([( $\eta^6$ -bip)RuCl<sub>2</sub>(dtp)]), których potencjał przeciwnowotworowy potwierdzono w badaniach nad działaniem cytotoksycznym i antyproliferacyjnym.

---

Określono, że **wszystkie** te **kompleksy** wykazywały **mniejszą toksyczność** względem komórek prawidłowych niż cisplatylna.

Ponadto kompleks **Pt4** charakteryzował się **większą aktywnością cytotoksyczną** względem linii nowotworowej A549 niż cisplatylna, natomiast kompleks **Pt8** wykazywał **większą aktywność** względem komórek linii nowotworowych A549, T24 i HT1376.

**Na podstawie analizy struktury kompleksów Pt(II) i Ru(II) obserwowana jest tendencja, iż:**

- kompleks **Pt4** charakteryzował się **większą aktywnością cytotoksyczną** niż jego odpowiednik z cząsteczką DMSO w sferze koordynacyjnej (**Pt6**);

- aktywność cytotoksyczna kompleksów **Pt4** i **Pt5**, różniących się jedynie liczbą atomów azotu w pierścieniu azolowym, może sugerować, że **pierścień triazolowy jest kluczowym elementem dla aktywności przeciwnowotworowej** kompleksu **Pt4**;
- **zastąpienie ligandów chlorkowych** w kompleksie **Pt4** **szczawianem** w kompleksie **Pt8** wpłynęło na znaczną **poprawę aktywności cytotoksycznej**;
- analizując kompleksy Ru(II), największą aktywność cytotoksyczną wykazał związek **Ru2** z **najbardziej rozbudowanym sterycznie ligandem N-heterocyklicznym**. Ponadto zastąpienie liganda p-cymenowego bardziej rozbudowanym bifenylem wpłynęło na znaczą poprawę aktywności cytotoksycznej **Ru2** w odniesieniu do jego analogu  $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{RuCl}_2(\text{dptp})]$ .

#### **VI. Znaczną poprawę cytotoksyczności kompleksów Pt1, Pt4 i Ru2 otrzymano po ich zamknięciu w micelach Pluronic®P123.**

---

Enkapsulacja kompleksów Pt(II) i Ru(II) spowodowała obniżenie parametru **IC<sub>50</sub> do wartości submikromolowych** co sugeruje, iż zastosowanie miceli nie tylko pozwala ominąć problem rozpuszczalności związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II), ale również wpływa na zmniejszenie ich dezaktywacji i/lub skuteczny transport do wnętrza komórek.

#### **VII. Nieznaczna reaktywność nowo otrzymanych związków koordynacyjnych Pt1, Pt4, Pt8 i Ru2 względem DNA oraz znikomy wpływ na zmianę przebiegu cyklu komórkowego sugeruje, iż związki te wykazują odmienny mechanizm działania niż komercyjnie dostępne leki platyny(II).**

---

## Dalsze perspektywy badawcze

---

### Badanie potencjału przeciwnowotworowego w warunkach *in vivo*

Wysoka aktywność cytotoksyczna *in vitro* nowo zsyntetyzowanych związków koordynacyjnych **Pt1**, **Pt4**, **Pt8** oraz **Ru2**, w połączeniu z opracowaniem efektywnej metody ich enkapsulacji w micelach Pluronic®, otwiera interesujące możliwości dalszej weryfikacji ich potencjału przeciwnowotworowego w badaniach *in vivo*.

### Badanie mechanizmu działania

Wykazany odmienny mechanizm działania nowo otrzymanych kompleksów Pt(II) i Ru(II) w porównaniu z cisplatyną wskazuje na konieczność identyfikacji molekularnych podstaw ich aktywności cytotoksycznej. Przeprowadzony przegląd literatury dotyczący leków stosowanych klinicznie, zawierających w swojej strukturze ugrupowanie triazolowe, jednoznacznie wskazuje na istotną rolę tego fragmentu w oddziaływaniach z enzymami nadmiernie ekspresjonowanymi w komórkach nowotworowych. Stanowi to istotną przesłankę do poszukiwania mechanizmu działania badanych związków koordynacyjnych z ugrupowaniem triazolowym w pierwszej kolejności w obszarze oddziaływań enzymatycznych. Z aplikacyjnego punktu widzenia poznanie tego mechanizmu jest kluczowe

### Dalsze modyfikacje sfery koordynacyjnej

Zaobserwowana tendencja do poprawy aktywności biologicznych związków koordynacyjnych Pt(II) i Ru(II) wraz ze wzrostem zawady sterycznej ligandów skłania do dalszej modyfikacji kompleksów w tym kierunku. Szczególnie wyraźna jest zależność zwiększania cytotoksyczności arenowych kompleksów Ru(II) wraz ze wzrostem rozbudowania ligandów arenowych, co sugeruje modyfikację sfery koordynacyjnej **Ru2** poprzez włączenie ligandów bardziej rozbudowanych przestrzennie niż bifenyl.

# Bibliografia

- 1 C. Rehnitz, T. Do, B. Klaan, I. Burkholder, A. Barić, F. Wuennemann, H. U. Kauczor, M. A. Weber, *J. Magn. Reson. Imaging*, 2020, 51, 144–154.
- 2 H. Hashemi, G. Amjad, H. Ghanaati, S. Behzadi, M. Shakiba, N. Ghavami, H. Naghibi, M. H. Harirchian, K. Firouznia, *Iran. Red Crescent Med. J.*, 2021, 23(2), 192.
- 3 T. B. Brismar, D. Geisel, N. Kartalis, B. L. Madrazo, H. P. Hedman, A. Norlin, *Invest. Radiol.*, 2024, 59, 197–205.
- 4 A. M. P. Romani, *Biochem. Pharmacol.*, 2022, 206, 115323.
- 5 T. Chinen, Y. Sasabuchi, H. Matsui, H. Yamaguchi, H. Yasunaga, *BMC Cancer*, 2022, 22, 460.
- 6 S. Jiang, L. Huang, H. Zhen, P. Jin, J. Wang, Z. Hu, *BMC Cancer*, 2021, 21, 1308.
- 7 P. Biegański, Ł. Szczupak, M. Arruebo, K. Kowalski, *RSC Chem. Biol.*, 2021, 2, 368.
- 8 A. Frei, *Antibiotics*, 2020, 9, 90.
- 9 M. S. Altowyan, A. El-Faham, M. A. Hassan, A. Barakat, M. Haukka, M. A. M. Abu-Youssef, S. M. Soliman, A. Yousri, *Inorganics*, 2024, 12, 268.
- 10 Y. Li, Z. Sun, Y. Cui, H. Zhang, S. Zhang, X. Wang, S. Liu, Q. Gao, *Bioorg. Chem.*, 2021, 107, 104636.
- 11 I. Kacsir, A. Sipos, G. Ujlaki, P. Buglyó, L. Somsák, P. Bai, É. Bokor, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 10454.
- 12 C. A. Riedl, L. S. Flocke, M. Hejl, A. Roller, M. H. M. Klose, M. A. Jakupec, W. Kandioller, B. K. Keppler, *Inorg. Chem.*, 2017, 56, 528–541.
- 13 L. B. Josefsen, R. W. Boyle, *Metal-Based Drugs*, 2008, 1–23.
- 14 D. L. Ma, C. Wu, G. Li, T. L. Yung, C. H. Leung, *J. Mater. Chem. B*, 2020, 8, 4715–4725.
- 15 M. Sohrabi, M. R. Binaeizadeh, A. Iraj, B. Larijani, M. Saedi, M. Mahdavi, *RSC Adv.*, 2022, 12, 12011.
- 16 J. P. Dales, S. Desplat-Jégo, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21, 9105.
- 17 W. Zafar, S. H. Sumrra, Z. H. Chohan, *Eur. J. Med. Chem.*, 2021, 222, 113602.

- 18 T. Gianferrara, I. Bratsos, E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2009, 7588–7598.
- 19 E. F. Celine J. Marmion, *Targeted metallo-drugs: design, development, and mode of action*, CRC Press 2023.
- 20 A. Fundytus, M. Sengar, D. Lombe, W. Hopman, M. Jalink, B. Gyawali, D. Trapani, F. Roitberg, E. G. E. De Vries, L. Moja, A. Ilbawi, R. Sullivan, C. M. Booth, *Lancet Oncol.*, 2021, 22, 1367–1377.
- 21 S. Dilruba, G. V. Kalayda, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2016, 77, 1103–1124.
- 22 T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, *Chem. Rev.*, 2016, 116, 3436–3486.
- 23 R. Oun, Y. E. Moussa, N. J. Wheate, *Dalton Trans.*, 2018, 47, 6645.
- 24 D. J. Stewart, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2007, 63, 12–31.
- 25 L. Galluzzi, L. Senovilla, I. Vitale, J. Michels, I. Martins, O. Kepp, M. Castedo, G. Kroemer, *Oncogene*, 2012, 31, 1869–1883.
- 26 M. T. Kuo, H. H. W. Chen, *Metal-Based Drugs*, 2010, 430939, 1-7.
- 27 N. Stojanovic, D. Urankar, A. Brozovic, A. Ambriovic-Ristov, M. Osmak, J. Kocmrlj, *Acta Chim. Slov.*, 2013, 60(2), 368–374.
- 28 G. C. Jayson, E. C. Kohn, H. C. Kitchener, J. A. Ledermann, *Lancet*, 2014, 384, 1376–88.
- 29 S. Adhikari, P. Nath, A. Das, A. Datta, N. Baildya, A. K. Duttaroy, S. Pathak, *Biomed. Pharmacother.*, 2024, 171, 116211.
- 30 G. Facchetti, I. Rimoldi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2019, 29, 1257–1263.
- 31 C. M. Marshall, J. G. Federice, C. N. Bell, P. B. Cox, J. T. Njardarson, *J. Med. Chem.* 2024, 67, 11622–11655.
- 32 A. Kumar, A. K. Singh, H. Singh, V. Vijayan, D. Kumar, J. Naik, S. Thareja, J. P. Yadav, P. Pathak, M. Grishina, A. Verma, H. Khalilullah, M. Jaremko, A. H. Emwas, P. Kumar, *Pharmaceuticals*, 2023, 16, 299.
- 33 C. T. Walsh, *Tetrahedron Lett.*, 2015, 56, 3075–3081.
- 34 P. Arora, V. Arora, H. S. Lamba, D. Wadhwa, *IJPSR*, 2012, 3, 2947–2954.
- 35 T. N. Tran, M. Henary, *Molecules*, 2022, 27, 2700.
- 36 D. Topalis, S. Gillemot, R. Snoeck, G. Andrei, *Drug Resist. Updat.*, 2018, 37, 1–16.
- 37 N. Das Adhikary, P. Chattopadhyay, *J. Org. Chem.*, 2012, 77, 5399–5405.
- 38 R. K. Chambers, J. D. Weaver, J. Kim, J. L. Hoar, S. W. Krska, M. Christina White, *PNAS*, 2023, 120(29), e2300315120.

- 39 M. Sudhakar, Spp. Priyadharshni, Td. paripuramam, S. Kumar, S. Lanjhiyana, S. Kumar Lanjhiyana, D. SVGK Kaladhar, D. Acharya, A. Patel, V. Geetha, *Front. Health Inform.*, 2024, 13(6), 1173.
- 40 A. Amin, T. Qadir, P. K. Sharma, I. Jeelani, H. Abe, *Open Med. Chem. J.*, 2022, 16, 1-21.
- 41 N. Kerru, L. Gummidi, S. Maddila, K. K. Gangu, S. B. Jonnalagadda, *Molecules*, 2020, 25, 1909.
- 42 K. U. Sadek, R. A. Mekheimer, M. Abd-Elmonem, F. A. Abo-Elsoud, A. M. Hayallah, S. M. Mostafa, M. H. Abdellattif, M. A. S. Abourehab, T. A. Farghaly, A. Elkamhawy, *J. Mol. Struct.* 2023, 1286, 135616.
- 43 G. Ahmad, M. Sohail, M. Bilal, N. Rasool, M. U. Qamar, C. Ciurea, L. G. Marceanu, C. Misarca, *Molecules*, 2024, 29, 2232.
- 44 K. Pluta, B. Morak-Młodawska, M. Jeleń, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, 46, 3179e3189.
- 45 I. B. Dzvinchuk, A. V Vypirailenko, M. O. Lozinskii, *Russ. Chem. Bull.*, 2005, 54, 748–751.
- 46 A. M. Malebari, D. Fayne, S. M. Nathwani, F. O’Connell, S. Noorani, B. Twamley, N. M. O’Boyle, J. O’Sullivan, D. M. Zisterer, M. J. Meegan, *Eur. J. Med. Chem.*, 2020, 189, 112050.
- 47 M. Gholampour, S. Ranjbar, N. Edraki, M. Mohabbati, O. Firuzi, M. Khoshneviszadeh, *Bioorg. Chem.*, 2019, 88, 102967.
- 48 Q. Guan, Z. Gao, Y. Chen, C. Guo, Y. Chen, H. Sun, *Eur. J. Med. Chem.*, 2024, 275, 116578.
- 49 B. Rathod, K. Kumar, *Chem. Biodiversity*, 2022, 19, e202200679.
- 50 J. Khan, A. Rani, M. Aslam, R. S. Maharia, G. Pandey B. Nand, *Tetrahedron* 2024, 162, 134122.
- 51 C. M. Kelly, A. U. Buzdar, *Expert Opin. Drug Saf.*, 2010, 9(6), 995–1003.
- 52 A. S. Bhatnagar, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2007, 105, 7–17.
- 53 B. P. Haynes, M. Dowsett, W. R. Miller, J. M. Dixon, A. S. Bhatnagar, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2003, 87, 35–45.
- 54 S. M. Hoy, *Drugs*, 2018, 78, 1939–1946.
- 55 K. Podar, J. Shah, A. Chari, P. G. Richardson, S. Jagannath, *Expert Opin. Pharmacother.*, 2020, 21, 399–408.
- 56 A. Lee, *Drugs*, 2020, 80, 1033–1038.

- 57 <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-talazoparib-enzalutamide-hrr-gene-mutated-metastatic-castration-resistant-prostate?utm> odczyt z dnia 18.04.2025r.
- 58 A. Thakur, M. Rana, Ritika, J. Mathew, S. Nepali, C. H. Pan, J. P. Liou, K. Nepali, *Bioorg. Chem.*, 2023, 141, 106893.
- 59 U. H. Gandhi, W. Senapedis, E. Baloglu, T. J. Unger, A. Chari, D. Vogl, R. F. Cornell, *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, 2018, 18(5), 335-345.
- 60 D. Huang, P. Zhao, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.*, 2014, 272, 145–165.
- 61 G. Aromí, L. A. Barrios, O. Roubeau, P. Gamez, *Coord. Chem. Rev.*, 2011, 255, 485–546.
- 62 J. G. Haasnoot, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, 200–2002, 131–185.
- 63 K. Liu, W. Shi, P. Cheng, *Dalton Trans.*, 2011, 40, 8475.
- 64 M. C. Joseph, A. J. Swarts, S. F. Mapolie, *Coord. Chem. Rev.*, 2023, 493, 215317.
- 65 R. F. Hu, J. Zhang, Y. Kang, Y. G. Yao, *Inorg. Chem. Commun.*, 2005, 8, 828–830.
- 66 Y. C. Shen, Z. J. Li, J. K. Cheng, Y. Y. Qin, Y. G. Yao, *Inorg. Chem. Commun.*, 2007, 10, 888–890.
- 67 J. Chuang, W. Ouellette, J. Zubieta, *Inorganica Chim. Acta*, 2008, 361, 2357–2364.
- 68 Y. M. Ohorodnik, D. M. Khomenko, R. O. Doroshchuk, I. V. Raspertova, S. Shova, M. V. Babak, M. N. M. Milunovic, R. D. Lampeka, *Inorganica Chim. Acta*, 2023, 556, 121646.
- 69 B. Bertrand, C. Botuha, J. Forté, H. Dossmann, M. Salmain, *Chem. Eur. J.*, 2020, 26, 12846–12861.
- 70 F. Saleem, G. K. Rao, A. Kumar, G. Mukherjee, A. K. Singh, *Organometallics*, 2013, 32, 3595–3603.
- 71 H. Zhao, S. Y. Zhou, C. Feng, N. X. Wei, G. G. Wang, *Inorganica Chim. Acta*, 2014, 421, 169–175.
- 72 L. Radhakrishna, H. S. Kunchur, P. K. Namdeo, R. J. Butcher, M. S. Balakrishna, *Dalton Trans.*, 2020, 49, 3434–3449.
- 73 Y. Yang, P. Du, Y. Y. Liu, J. F. Ma, *Cryst. Growth Des.*, 2013, 13, 4781–4795.
- 74 B. Ding, L. Yi, Y. Wang, P. Cheng, D. Z. Liao, S. P. Yan, Z. H. Jiang, H. Bin Song, H. G. Wang, *Dalton Trans.*, 2006, 665–675.
- 75 J. M. Salas, M. Quirós, M. A. Haj, R. Magán, C. Marín, M. Sánchez-Moreno, R. Faure, *Met. Based. Drugs*, 2001, 8, 119–124.

- 76 S. Komeda, M. Lutz, A. L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 4738–4746.
- 77 J. Košmrlj, M. Kočevár, S. Polanc, *Synlett*, 2009, 14, 2217–2235.
- 78 M. Jakubowski, I. Łakomska, J. Sitkowski, J. Wiśniewska, *New J. Chem.*, 2018, 42, 8113–8122.
- 79 M. T. Włodarczyk, S. A. Dragulska, O. Camacho-Vanegas, P. R. Dottino, A. A. Jarzęcki, J. A. Martignetti, A. J. Mieszawska, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2018, 4, 463–467.
- 80 S. Yano, H. Ohi, M. Ashizaki, M. Obata, Y. Mikata, R. Tanaka, T. Nishioka, I. Kinoshita, Y. Sugai, I. Okura, S. I. Ogura, J. A. Czaplewska, M. Gottschaldt, U. S. Schubert, T. Funabiki, K. Morimoto, M. Nakai, *Chem. Biodivers.*, 2012, 9, 1903–1915.
- 81 A. Annunziata, D. Liberti, E. Bedini, M. E. Cucciolo, D. Loreto, D. M. Monti, A. Merlino, F. Ruffo, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 8704.
- 82 X. Gao, S. Liu, Y. Shi, Z. Huang, Y. Mi, Q. Mi, J. Yang, Q. Gao, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, 125, 372–384.
- 83 J. C. Vera, A. M. Reyes, F. V. Velásquez, C. I. Rivas, R. H. Zhang, P. Strobel, J. C. Slebe, J. Núñez-Alarcón, D. W. Golde, *Biochemistry*, 2001, 40, 777–790.
- 84 V. Ouellette, M. F. Côté, R. C. Gaudreault, H. A. Tajmir-Riahi, G. Bérubé, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, 179, 660–666.
- 85 E. Kitteringham, E. Andriollo, V. Gandin, D. Montagner, D. M. Griffith, *Inorganica Chim. Acta*, 2019, 451, 118944.
- 86 C. Yuan, W. Wang, J. Wang, X. Li, Y. B. Wu, S. Li, L. Lu, M. Zhu, S. Xing, X. Fu, *Chem. Commun.*, 2019, 56, 102–105.
- 87 J. Wang, X. Li, C. Yuan, F. Su, Y. B. Wu, L. Lu, M. Zhu, S. Xing, X. Fu, *Dalton Trans.*, 2021, 50, 4527–4538.
- 88 A. I. Matesanz, C. Joie, P. Souza, *Dalton Trans.*, 2010, 39, 7059–7065.
- 89 C. Riccardi, D. Capasso, G. M. Rozza, C. Platella, D. Montesarchio, S. Di Gaetano, T. Marzo, A. Pratesi, L. Messori, G. N. Roviello, D. Musumeci, *J. Inorg. Biochem.*, 2019, 203, 110868.
- 90 S. Rubino, I. Pibiri, C. Costantino, S. Buscemi, M. A. Girasolo, A. Attanzio, L. Tesoriere, *J. Inorg. Biochem.*, 2016, 155, 92–100.
- 91 K. Singh, A. Gangrade, A. Jana, B. B. Mandal, N. Das, *ACS Omega*, 2019, 4, 835–841.
- 92 C. Sonkar, S. Sarkar, S. Mukhopadhyay, *RSC Med. Chem.*, 2022, 13, 22.

- 93 L. Li, Y. S. Wong, T. Chen, C. Fan, W. Zheng, *Dalton Trans.*, 2012, 41, 1138–1141.
- 94 C. M. Clavel, E. Păunescu, P. Nowak-Sliwinska, A. W. Griffioen, R. Scopelliti, P. J. Dyson, *J. Med. Chem.*, 2015, 58, 3356–3365.
- 95 Q. Sun, Y. Li, H. Shi, Y. Wang, J. Zhang, Q. Zhang, *Molecules*, 2021, 26, 4389.
- 96 E. Baulieu, D. T. Forman, M. Ingelman-Sundberg, L. Jaenicke, J. A. Kellen, Y. Nagai, G. F. Springer, L. Träger, L. Will-Shahab, J. L. Wittliff, *Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1989.
- 97 G. Sava, A. Bergamo, S. Zorzet, B. Gava, C. Casarsa, M. Cocchietto, A. Furlani, V. Scarcia, B. Serli, E. Iengo, E. Alessio, G. Mestroni, *Eur. J. Cancer.*, 2002, 38, 427–435.
- 98 J. M. Rademaker-Lakhai, D. Van Den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens, *Clin Cancer Res.*, 2004, 10, 3717–3727.
- 99 S. Leijen, S. A. Burgers, P. Baas, D. Pluim, M. Tibben, E. Van Werkhoven, E. Alessio, G. Sava, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens, *Invest. New Drugs*, 2015, 33, 201–214.
- 100 A. Bijelic, S. Theiner, B. K. Keppler, A. Rompel, *J. Med. Chem.*, 2016, 59, 5894–5903.
- 101 F. Lentz, A. Drescher, A. Lindauer, M. Henke, R. A. Hilger, C. G. Hartinger, M. E. Scheulen, C. Dittrich, B. K. Keppler, U. Jaehde, *Anticancer Drugs*, 2009, 20, 97–103.
- 102 H. A. Burris, S. Bakewell, J. C. Bendell, J. Infante, S. F. Jones, D. R. Spiegel, G. J. Weiss, R. K. Ramanathan, A. Ogden, D. Von Hoff, *ESMO Open*, 2016, 1, e000154.
- 103 G. S. Kulkarni, L. Lilge, M. Nesbitt, R. J. Dumoulin-White, A. Mandel, M. A. S. Jewett, *EUOS*, 2022, 41, 105–111.
- 104 S. Swaminathan, J. Haribabu, N. Balakrishnan, P. Vasanthakumar, R. Karvembu, *Coord. Chem. Rev.*, 2022, 459, 214403.
- 105 O. Novakova, H. Chen, O. Vrana, A. Rodger, P. J. Sadler, V. Brabec, *Biochemistry*, 2003, 42, 11544–11554.
- 106 H. K. Liu, P. J. Sadler, *Acc. Chem. Res.*, 2011, 44, 349–359.
- 107 H. K. Liu, J. A. Parkinson, J. Bella, F. Wang, P. J. Sadler, *Chem. Sci.*, 2010, 1, 258–270.
- 108 Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, 2005, 4764–4776.
- 109 G. S. Smith, B. Therrien, *Dalton Trans.*, 2011, 40, 10793

- 110 Pragti, B. K. Kundu, C. Sonkar, R. Ganguly, S. Mukhopadhyay, *Polyhedron*, 2021, 207, 115379.
- 111 G. Süß-Fink, *Dalton Trans.*, 2010, 39, 1673–1688.
- 112 N. Mohan, S. Muthumari, R. Ramesh, *J. Organomet. Chem.*, 2016, 807, 45–51.
- 113 S. Kumari, C. Sharma, A. K. Srivastava, N. Satrawala, K. N. Sharma, R. K. Joshi, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2021, 3648–3653.
- 114 N. Mohan, M. K. Mohamed Subarkhan, R. Ramesh, *J. Organomet. Chem.*, 2018, 859, 124–131.
- 115 I. Łakomska, K. Stefańczak, M. Fandzloch, J. Sitkowski, B. Filip-Psurska, A. Wojtczak, *Polyhedron*, 2016, **109**, 33–39.
- 116 A. Muley, K. S. Karumban, P. Gupta, S. Kumbhakar, B. Giri, R. Raut, A. Misra, S. Maji, *J. Organomet. Chem.*, 2021, 954–955, 122074.
- 117 F. Caruso, G. V. Subbaraju, M. V. Ramani, M. Gariboldi, E. Marras, C. Kloer, A. Sulovari, S. Kaur, M. Rossi, *Inorganica Chim. Acta*, 2022, 542, 121099.
- 118 V. V. Matveevskaya, D. I. Pavlov, D. G. Samsonenko, L. Bonfili, M. Cuccioloni, E. Benassi, R. Pettinari, A. S. Potapov, *Inorganica Chim. Acta*, 2022, 535, 120879.
- 119 F. Wang, H. Chen, S. Parsons, I. D. H. Oswald, J. E. Davidson, P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.*, 2003, 9, 5810–5820.
- 120 F. Wang, J. Xu, A. Habtemariam, J. Bella, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 17734–17743.
- 121 H. Chen, J. A. Parkinson, S. Parsons, R. A. Coxall, R. O. Gould, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 3064–3082.
- 122 A. F. A. Peacock, P. J. Sadler, *Coord. Chem. Rev.*, 2022, 459, 214403.
- 123 A. Arunachalam, R. Rengan, D. Umopathy, A. J. V. Arockiam, *Organometallics*, 2022, 41, 2474–2486.
- 124 L. Colina-Vegas, K. M. Oliveira, B. N. Cunha, M. R. Cominetti, M. Navarro, A. A. Batista, *Inorganics*, 2018, 6, 132.
- 125 O. A. Lenis-Rojas, R. Cabral, B. Carvalho, S. Friães, C. Roma-Rodrigues, J. A. A. Fernández, S. F. Vila, L. Sanchez, C. S. B. Gomes, A. R. Fernandes, B. Royo, *Inorg. Chem.*, 2021, 60, 8011–8026.
- 126 A. Muley, K. S. Karumban, P. Gupta, S. Kumbhakar, B. Giri, R. Raut, A. Misra, S. Maji, *J. Organomet. Chem.*, 2021, 954–955, 122074.
- 127 W. K. Chu, C. K. Rono, B. C. E. Makhubela, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2024, 27, e202300541.

- 128 A. Kaszuba, J. Sitkowski, T. Muzioł, K. Pokrzywka, Ł. Kaźmierski, M. Maj, F. Steppeler, E. Wojaczyńska, M. Hoffmann, I. Łakomska, *Dalton Trans.*, 2025, 54, 5334
- 129 A. Tafelska-Kaczmarek, R. Kołodziejska, M. Kwit, B. Stasiak, M. Wypij, P. Golińska, *Materials*, 2020, 13, 4080.
- 130 Mateusz Jakubowski, Rozprawa Doktorska, *Projektowanie, charakterystyka spektroskopowa i cytotoksyczność nowych, mieszanych kompleksów platyny(II) z ligandami N-, O- i S-donorowymi*, Toruń 2020.
- 131 J. H. Price, A. N. Williamson, R. F. Schramm, B. B. Wayland, *Inorg. Chem.*, 1972, 11(6), 1280-1284
- 132 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, et al., Gaussian 16, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2016.
- 133 K. Nakamoto, *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds*, J. Wiley and Sons New York 2009.
- 134 A. R. Powers, X. Yang, T. J. Del Castillo, I. Ghiviriga, K. A. Abboud, A. S. Veige, *Dalton Trans.*, 2013, 42, 14963.
- 135 N. K. Allampally, C. G. Daniliuc, C. A. Strassert, L. De Cola, *Inorg. Chem.*, 2015, 54, 1588–1596.
- 136 X. Zhang, A. M. Wright, N. J. Deyonker, T. K. Hollis, N. I. Hammer, C. E. Webster, E. J. Valente, *Organometallics*, 2012, 31, 1664–1672.
- 137 J. Pracharova, T. Saltarella, T. Radosova Muchova, S. Scintilla, V. Novohradsky, O. Novakova, F. P. Intini, C. Pacifico, G. Natile, P. Ilik, V. Brabec, J. Kasparkova, *J. Med. Chem.*, 2015, 58, 847–859.
- 138 J. D. Hoeschele, J. Kasparkova, H. Kostrhunova, O. Novakova, J. Pracharova, P. Pineau, V. Brabec, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2020, 25, 913–924.
- 139 D. Urankar, A. Pevec, J. Košmrlj, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2011, 1921–1929.
- 140 P. Marqués-Gallego, H. Den Dulk, J. Brouwer, H. Kooijman, A. L. Spek, O. Roubeau, S. J. Teat, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 2008, 47, 11171–11179.
- 141 A. P. S. Fontes, Å. Oskarsson, K. Löqvist, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, 2001, 40, 1745–1750.
- 142 Y. Qu, S. Gama De Almeida, N. Farrell, *Inorg. Chim. Acta.*, 1992, 201, 123-129.
- 143 I. Łakomska, K. Hoffmann, A. Wojtczak, J. Sitkowski, E. Maj, J. Wietrzyk, *J. Inorg. Biochem.*, 2014, 141, 188–197.
- 144 I. Łakomska, E. Szłyk, J. Sitkowski, L. Kozerski, J. Wietrzyk, M. Pełczyńska, A. Nasulewicz, A. Opolski, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, 98, 167–172.

- 145 E. Szl, I. L. Akomska, A. Surdykowski, T. Gl Owiak B, L. Pazderski, J. Sitkowski, L. Kozerski, *Inorg. Chim. Acta.*, 2002, 333, 93-99.
- 146 T. L. Ho, *Chem. Rev.*, 1975, 75, 1–20.
- 147 P. Marqués-Gallego, S. Contaldi, H. den Dulk, M. Monari, J. Brouwer, U. Jaehde, G. V. Kalayda, J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, 103, 1602–1608.
- 148 Md. A. Arafath, H. C. Kwong, F. Adam, *Acta Crystallogr., Sect. E: Crystallogr. Commun.*, 2019, 75, 1486–1489.
- 149 A. K. D. S. Pereira, C. M. Manzano, D. H. Nakahata, J. C. T. Clavijo, D. H. Pereira, W. R. Lustri, P. P. Corbi, *New J. Chem.*, 2020, 44, 11546–11556.
- 150 A. I. Matesanz, J. M. Herrero, E. J. Faraco, L. Cubo, A. G. Quiroga, *ChemBioChem*, 2020, 21, 1226–1232.
- 151 I. Łakomska, M. Babinska, A. Wojtczak, J. Sitkowski, *Inorganica Chim. Acta*, 2016, 453, 516–521.
- 152 S. Rubino, V. Di Stefano, A. Attanzio, L. Tesoriere, M. A. Girasolo, F. Nicolò, G. Bruno, S. Orecchio, G. C. Stocco, *Inorganica Chim. Acta*, 2014, 418, 112–118.
- 153 U. Doğan, Ö. Özcan, G. Alaca, A. Arı, S. Günnaz, H. T. Yalçın, O. Şahin, S. İrişli, *J. Mol. Struct.*, 2021, 1229, 129785.
- 154 T. Meng, Q. P. Qin, Z. R. Wang, L. T. Peng, H. H. Zou, Z. Y. Gan, M. X. Tan, K. Wang, F. P. Liang, *J. Inorg. Biochem.*, 2018, 189, 143–150.
- 155 B. Morak-Młodawska, M. Jeleń, E. Martula, R. Korlacki, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24, 6970.
- 156 T. Cardoso, A. S. Almeida, F. Remião, C. Fernandes, *Chemosensors*, 2021, 9, 304.
- 157 M. Sharifian Gh., *Mol. Pharmaceutics*, 2021, 18, 2122–2141.
- 158 J. X. Soares, Á. Santos, C. Fernandes, M. M. M. Pinto, *Chemosensors*, 2022, 10, 340.
- 159 J. A. Arnott and S. L. Planey, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2012, 7(10), 863–875.
- 160 M. Fandzloch, A. Wojtczak, J. Wiśniewska, K. Stefańczak, J. M. Salas, I. Łakomska, *Inorganica Chim. Acta*, 2016, 443, 170–178.
- 161 X. Yu, Y. Li, D. Wu, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2004, 30, 69–73.
- 162 D. Pindjakova, L. Vrablova, T. Strharsky, J. Kos, J. Jampilek, *Chem. Proc.* 2022, 8(1), 100.
- 163 S. V. Blokhina, M. V. Ol'khovich, A. V. Sharapova, I. B. Levshin, G. L. Perlovich, *J. Mol. Liq.*, 2021, 324, 114662.

- 164 Z. Trávníček, M. Matiková-Mařarová, R. Novotná, J. Vančo, K. Štěpánková, P. Suchý, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, 105, 937–948.
- 165 H. Jefferies, J. Coster, A. Khalil, J. Bot, R. D. McCauley, J. C. Hall, *ANZ J. Surg.*, 2003; 73, 517–522.
- 166 G. K. Balendiran, R. Dabur, D. Fraser, *Cell Biochem. Funct.*, 2004, 22, 343–352.
- 167 D. Petrović, B. Stojimirović, B. Petrović, Z. M. Bugarčić, Ž. D. Bugarčić, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15, 4203–4211.
- 168 Y. Kasherman, S. Sturup, D. Gibson, *J. Med. Chem.*, 2009, 52, 4319–4328.
- 169 L. Wang, Z. Liu, S. He, S. He, Y. Wang, *J. Mater. Chem. B.*, 2021, 9, 4587–4595.
- 170 G. Facchetti and I. Rimoldi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2019, 29, 1257–1263.
- 171 R. E. Morris, R. E. Aird, P. Del Socorro Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N. D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, *J. Med. Chem.*, 2001, 44, 3616–3621.
- 172 R. E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler, D. I. Jodrell, *Br. J. Cancer*, 2002, 86, 1652–1657.
- 173 A. Pitto-Barry, N. P. E. Barry, *Polym. Chem.*, 2014, 5, 3291.
- 174 M. Kurahashi, K. Kanamori, K. Takeda, H. Kaji, K. Nakanishi, *RSC Adv.*, 2012, 2, 7166–7173.
- 175 M. Y. Kozlov, N. S. Melik-Nubarov, E. V. Batrakova, A. V. Kabanov, *Macromolecules*, 2000, 33, 3305–3313.
- 176 N. Sarin, F. Engel, G. V. Kalayda, M. Mannewitz, J. Cinatl, F. Rothweiler, M. Michaelis, H. Saafan, C. A. Ritter, U. Jaehde, R. Frötschl, *PLoS One*, 2017, 12(7), e0181081.
- 177 I. Łakomska, D. Śmiłowicz, M. Jakubowski, J. Sitkowski, A. Wojtczak, *Materials*, 2020, 13, 1–17.
- 178 I. Łakomska, A. Wojtczak, J. Sitkowski, L. Kozerski, E. Szłyk, *Polyhedron*, 2008, 27, 2765–2770.
- 179 I. Łakomska, M. Fandzloch, A. Wojtczak, E. Szłyk, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2011, 79, 497–501.
- 180 I. Łakomska, M. Jakubowski, M. Barwiołek, T. Muzioł, *Polyhedron*, 2019, 160, 123–129.
- 181 M. Fandzloch, A. Wojtczak, J. Sitkowski, I. Łakomska, *Polyhedron*, 2014, 67, 410–415.
- 182 I. Łakomska, M. Fandzloch, A. Wojtczak, *Inorg. Chem. Commun.*, 2014, 49, 24–26.

- 183 I. Łakomska, M. Fandzloch, T. Muzioł, T. Lis, J. Jezierska, *Dalton Trans.*, 2013, 42, 6219–6226.
- 184 A. Bendi, M. R. Sirija, A. S. Bhatiwal, Chinmay, V. Chauhan, A. Tiwari, *J. Mol. Struct.*, 2024, 1317, 139121.
- 185 A. A. Abbas, K. M. Dawood, *RSC Adv.*, 2023, 13, 11096.
- 186 J. Farhat, L. Alzyoud, M. Alwahsh, B. Al-Omari, *Cancers*, 2022, 14, 2196.
- 187 K. S. Lam, G. K. Lloyd, S. T. C. Neuteboom, M. A. Palladino, K. M. Sethna, M. A. Spear, B. C. Potts, *Natural Product Chemistry for Drug Discovery*, 2009, 355–373.
- 188 <https://sigma.larvol.com/company.php?e1=536798&tab=OTTtrac&sourcepg=TZC>  
odczyt z dnia 28.06.2025
- 189 M. Samadaei, M. Pinter, D. Senfter, S. Madlener, N. Rohr-Udilova, D. Iwan, K. Kamińska, E. Wojaczyńska, J. Wojaczyński, A. Kochel, *Molecules*, 2020, 25, 2355.
- 190 D. Iwan, K. Kamińska, E. Wojaczyńska, M. Psurski, J. Wietrzyk, M. Daszkiewicz, *Materials*, 2020, 13, 1–12.
- 191 K. Kamińska, E. Wojaczyńska, J. Wietrzyk, E. Turlej, A. Błażejczyk, R. Wieczorek, *Tetrahedron Asymmetry*, 2016, 27, 753–758.

# Dorobek naukowy

## Wykształcenie

---

**2021 - 2026**

**Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych - Academia Scientiarum Thoruniensis** na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu

---

**2019 - 2021**

**Studia magisterskie** na Wydziale Chemii Uniwersytetu Kopernika w Toruniu  
Kierunek: Chemia medyczna

---

**2016 - 2019**

**Studia licencjackie** na Wydziale Chemii Uniwersytetu Kopernika w Toruniu  
Kierunek: Chemia medyczna

## Staż naukowe

---

**13.01.2025 - 24.01.2025**

**Staż naukowy na Uniwersytecie Jagiellońskim** (Kraków, Polska)

Zakres prowadzonych badań: opracowanie metodyki skutecznej enkapsulacji związków koordynacyjnych platyny(II) i rutenu(II) w micelach kopolimerów Pluronic®

---

**02.09.2024 - 27.09.2024**

**Staż naukowy na Uniwersytecie Jagiellońskim** (Kraków, Polska)

Zakres prowadzonych badań: analiza interakcji związków koordynacyjnych platyny(II) i rutenu(II) z białkami transportowymi

---

**19.06.2023 - 17.07.2023**

**Staż naukowy na Uniwersytecie w Pizie** (Piza, Włochy)

Zakres prowadzonych badań: analiza interakcji związków koordynacyjnych platyny(II) i rutenu(II) z DNA

## Granty

---

**2024**

**NAWA PROM** - grant na wyjazd konferencyjny 21st International Conference on Biological Inorganic Chemistry

---

**2023**

**STSM Grant (COST Action: CA18202)** - grant na odbycie stażu naukowego na Uniwersytecie w Pizie

---

---

**2022**

**Grant Młodych Naukowców Wydziału Chemii UMK** - grant na realizację projektu pod tytułem „*Projektowanie nowych związków kompleksowych platyny(II) i rutenu(II) jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych*”

---

**2021 - 2025**

**8 Minigrantów ze Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych AST** - granty na dofinansowanie wyjazdów konferencyjnych, stażowych oraz zakup odczynników

## Publikacje naukowe

---

**2025**

**A. Kaszuba**, J. Sitkowski, T. Muzioł, A. Tafelska-Kaczmarek, K. Pokrzywka, Ł. Kaźmierski, I. Gurgul, M. Maj, J. M. Dąbrowski, I. Łakomska „*Improving Anticancer Efficacy of Azole-Platinum(II) Complexes Through Pluronic® Micelles Formulation Strategy*” Dalton Trans., artykuł w trakcie recenzji.

---

**2025**

**A. Kaszuba**, J. Sitkowski, T. Muzioł, K. Pokrzywka, Ł. Kaźmierski, M. Maj, F. Steppeler, E. Wojaczyńska, M. Hoffmann I. Łakomska „*Unveiling the promising in vitro anticancer activity of lipophilic platinum(II) complexes containing (1S,4R,5R)-4-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-((S)-1-phenylethyl)-2-azabicyclo[3.2.1]octane: a spectroscopic characterization and DFT calculation*” Dalton Trans., 2025, 54, 5334 - 5354.

---

**2024**

**A. Kaszuba**, M. Barwiołek, J. Sitkowski, A. Wojtczak, I. Łakomska „*Structural characteristics and biological properties of new pseudo-octahedral ruthenium(II) complexes containing a biphenyl moiety*” Polyhedron 2024, 249, 116780.

---

**2022**

M. Jakubowski, I. Łakomska, **A. Kaszuba**, A. Wojtczak J. Sitkowski, A.A. Jarzęcki, „*Factors Affecting the Stability of Platinum(II) Complexes with 1,2,4-Triazolo[1,5-a]pyrimidine Derivatives and Tetrahydrothiophene-1-Oxide or Diphenyl Sulfoxide*” Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 3656.

## Patenty

---

**2026**

I. Łakomska, **A. Kaszuba** „*Trans-dichlorkowy związek koordynacyjny platyny(II) z (1S,4R,5R)-4-(4-fenilo-1H-1,2,3-triazol-1-ylo)-2-((S)-1-feniloetylo)-2-azabicyklo[3.2.1]oktanem i sposób jego otrzymywania*” PL 449369 A1

## Czynne uczestnictwo w konferencjach naukowych

---

**28.07.2025 - 01.08.2025**

**21st International Conference on Biological Inorganic Chemistry** (Long Beach, Stany Zjednoczone)

**A. Kaszuba**, K. Pokrzywka, M. Maj, J. Dąbrowski, I. Łakomska „*Strategies to improve cytotoxic properties of new anticancer dichloride platinum(II) complex*” (poster)

---

**20.03.2025 - 22.03.2025**

**V Ogólnopolskie Forum Chemii Nieorganicznej** (Warszawa, Polska)

**A. Kaszuba**, K. Pokrzywka, M. Maj, J. Dąbrowski, T. Muzioł, J. Sitkowski, I. Łakomska „*Triazolowe kompleksy platyny(II) o obiecującym potencjale przeciwnowotworowym*” (komunikat ustny)

---

**14.11.2024 - 16.11.2024**

**6th Advances in Pharmaceutical Analysis, 10th Conference of Polish Metabolomic Society Symposia** (Łódź, Polska)

**A. Kaszuba**, M. Maj, K. Pokrzywka, J. Sitkowski, I. Łakomska „*Lipophilic platinum(II) complexes containing triazole derivatives with high cytotoxic potential*” (poster)

---

**01.07.2024 - 04.07.2024**

**11th Chemistry Towards Biology Conference (CTB11): Understanding molecular processes in living systems - towards biomedical applications** (Kraków, Polska)

**A. Kaszuba**, J. Sitkowski, A. Wojtczak, I. Łakomska „*Structural characterization and assessment of anticancer properties of new piano-stool ruthenium(II) complexes with disubstituted triazolopyrimidines ligands*” (poster)

---

**07.07.2024 - 11.07.2024**

**9th EuChemS Chemistry Congress** (Dublin, Irlandia)

**A. Kaszuba**, J. Sitkowski, A. Wojtczak, I. Łakomska „*New lipophilic biphenyl ruthenium(II) complexes - structure and biological properties*” (poster) - wyróżnienie za poster

---

**06.02.2024 - 07.02.2024**

**Konferencja sprawozdawcza Centrum Doskonałości „W Kierunku Medycyny Spersonalizowanej” w ramach Inicjatywy Doskonałości - Uczelnia Badawcza (IDUB)** (Bydgoszcz, Polska)

**A. Kaszuba**, K. Kowalska, M. Maj, A. Tafelska- Kaczmarek, J. Sitkowski, I. Łakomska „*Wpływ liganda nieodchodzącego na właściwości biologiczne nowych dichlorkowych pochodnych Cisplatyny*” (komunikat ustny)

---

---

**18.09.2023 - 22.09.2023**

**65. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego (Toruń, Polska)**

1) **A. Kaszuba**, K. Pokrzywka, M. Maj, A. Tafelska-Kaczmarek, J. Sitkowski, I. Łakomska „*Charakterystyka strukturalna nowych związków koordynacyjnych platyny(II) o obiecujących właściwościach cytotoksycznych*” (komunikat ustny)

2) **A. Kaszuba**, J. Sitkowski, A. Wojtczak, I. Łakomska „*Charakterystyka strukturalna i właściwości biologiczne nowych pseudo-oktaedrycznych kompleksów rutenu(II) z ugrupowaniem bifenylowym*” (poster)

---

**03.08.2023 - 07.08.2023**

**6th EuChemS Inorganic Chemistry Conference (Wiedeń, Austria)**

**A. Kaszuba**, J. Sitkowski, A. Tafelska-Kaczmarek, M. Maj, I. Łakomska „*New platinum(II) complexes with modified triazole and imidazole ligands as potential anticancer agents*” (poster)

---

**16.02.2023 - 17.02.2023 r.**

**Konferencja sprawozdawcza Centrum Doskonałości „W Kierunku Medycyny Spersonalizowanej” w ramach IDUB**

**A. Kaszuba**, M. Maj, J. Sitkowski, I. Łakomska „*Nowe cytotoksyczne związki kompleksowe platyny(II) ze zmodyfikowanym ligandem 1,2,4-triazolowym*” (komunikat ustny)

---

**22.08.2022 - 02.09.2022**

**44th International Conference on Coordination Chemistry (Rimini, Włochy)**

**A. Kaszuba**, I. Łakomska, J. Sitkowski, M. Maj „*Structural and biological characterization of new platinum(II) complexes with modified 1,2,3-triazole*” (poster)

---

**05.06.2022 - 10.06.2022**

**XXVIII International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry, (Smolenice, Słowacja)**

**A. Kaszuba**, M. Maj, J. Sitkowski, I. Łakomska „*Lipophilic trans dichloride platinum(II) complex with modified 1,2,4-triazole ligand as a promising anticancer prodrug*” (komunikat ustny)

---

**27.05.2021 - 29.05.2021**

**e-Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego**

**A. Kaszuba**, J. Sitkowski, I. Łakomska, M. Jakubowski „*Charakterystyka strukturalna i oddziaływanie z glutationem nowego dichlorkowego kompleksu platyny(II) z (1s,4r,5r)-4-(4-fenylo-1H-1,2,3-triazol-1-ylo)-2-((S)-1-fenyloetylo)-2-azabicyklo-[3.2.1]oktanem*” (komunikat ustny)

---

---

**10.09.2020 - 12.09.2020**

**I Ogólnopolska Konferencja Online Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego**

A. Kaszuba, J. Sitkowski, I. Łakomska „*Synteza i charakterystyka strukturalna nowego związku kompleksowego platyny(II) z ligandem triazolowym*” (komunikat ustny)

## **Współautorstwo w wystąpieniach konferencyjnych**

---

**11.05.2025 - 15.05.2025**

**Fizykochemia granic faz - metody instrumentalne (Lublin, Polska)**

I. Łakomska, A. Kaszuba „*O projektowaniu związków kompleksowych rutenu zdolnych do niszczenia nowotworów*”

---

**20.03.2025 - 22.03.2025**

**V Ogólnopolskie Forum Chemii Nieorganicznej (Warszawa, Polska)**

I. Łakomska, A. Kaszuba „*Ocena potencjału cytotoksycznego lipofilowych kompleksów platyny(II) ze zmodyfikowanym 1,2,3-triazolem*”(komunikat ustny)

---

**26.02.2024 - 27.02.2024**

**4th European NECTAR Conference and Final Action Meeting (Milazzo, Włochy)**

I. Łakomska, A. Kaszuba, M. Maj, K. Kowalska, T. Biver, J. Sitkowski „*Solution study of cytotoxic platinum(II) complexes with 1-(benzofuran-2-yl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)ethenone*” (poster)

---

**28.07.2024 - 03.08.2024**

**45th International Conference on Coordination Chemistry (Fort Collins, Stany Zjednoczone)**

I. Łakomska, A. Kaszuba, J. Sitkowski, T. Muzioł, M. Hoffmann “*The experimental and theoretical approach to platinum(II) complexes containing (1S, 4R, 5R)-4-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-((S)-1-phenylethyl)-2-azabicyclo[3.2.1]octane and dimethyl sulfoxide*” (poster)

---

**18.11.2024 - 19.11.2024**

**International Conference on Advanced Functional Materials & Biomaterials and Biodevices (Dubaj, Zjednoczone Emiraty Arabskie)**

I. Łakomska, A. Kaszuba, M. Maj, K. Pokrzywka, J. Sitkowski „*The influence of steric hindrance of the N-donor ligand on the structure and biological properties of dichloride platinum(II) complexes*” (komunikat ustny)

---

---

**25.08.2021 - 27.08.2021**

**2nd European NECTAR Conference** (Lizbona, Portugalia)

I. Łakomska, M. Jakubowski, J. Wiśniewska, **A. Kaszuba**, J. Sitkowski  
„Dicarboxylato platinum(II) complexes containing dimethyl sulfoxide and triazolopyrimidine as potential anticancer agents : synthesis, structural and biological studies in solution” (poster)

---

**02.09.2019 - 06.09.2019**

**62. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego** (Warszawa, Polska)

I. Łakomska, **A. Kaszuba**, E. Wojaczyńska, J. Sitkowski „Charakterystyka spektroskopowa i cytotoksyczność in vitro nowego kompleksu platyny(II) z (1S, 4R, 5R)-4-(4-fenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-((S)-1-fenyletylo)-2-azabicyklo-[3.2.1]oktanem” (poster)

---

## Praktyki zawodowe

---

**01.07.2019 - 30.09.2019**

**J.S. Hamilton Poland Sp. z o.o. - staż w dziale farmacji**

---

**01.08.2018 - 21.10.2018**

**Eurocast Sp. z o.o. - laborantka w dziale kontroli jakości**

---

**09 - 27.07.2018**

**Eurocast Sp. z o.o. - praktyki w dziale kontroli jakości**

---

## Działalność dydaktyczna

---

**27.02.2025 - 20.09.2025**

**Wydział Chemii Uniwersytetu Kopernika w Toruniu** - prowadzenie zajęć laboratoryjnych dla studentów z przedmiotów Analiza spektroskopowa i Chemia bionieorganiczna

---

**30.04.2024 - 20.09.2024**

**Wydział Chemii Uniwersytetu Kopernika w Toruniu** - prowadzenie zajęć laboratoryjnych dla studentów z przedmiotów Analiza spektroskopowa i Chemia bionieorganiczna

---

**20.02.2023 - 20.09.2023**

**Wydział Chemii Uniwersytetu Kopernika w Toruniu** - prowadzenie zajęć laboratoryjnych dla studentów z przedmiotu Analiza spektroskopowa

---

## Podnoszenie kompetencji

---

**01.10.2023 - 05.02.2024**

Kurs dokształcający w zakresie języka angielskiego konwersacyjno - doskonalący

---

**23.03.2023**

Szkolenie: ABC Canvy, czyli jak łatwo tworzyć grafiki online

---

**08.12.2022**

Szkolenie: Mendeley i Scencedirect - przydatne narzędzie w pracy naukowca

---

**30.11.2022**

Szkolenie: Nowoczesne rozwiązania do pracy z hodowlami komórkowymi

---

**14.09.2022**

Szkolenie: Zarządzanie danymi badawczymi w pigułce

---

**14.02.2022 - 18.02.2022**

Szkolenie: Szkoła Cytometrii: „Cytometria przepływowa - podstawowe narzędzie badawcze

## Członkostwo w organizacjach i stowarzyszeniach naukowych

---

**22.03.2023 - 01.04.2024**

NECTAR Cost Action CA18202

---

**25.04.2022 - obecnie**

Polskie Towarzystwo Chemiczne

---

**05.10.2021 - 31.12.2025**

Centrum Doskonałości „W kierunku medycyny spersonalizowanej” w ramach IDUB, Zespół Badawczy BRAIN

## Działalność organizacyjna

---

**13.09.2025**

Pomoc w organizacji XXVIII Zjazdu Absolwentów UMK

---

**22.04.2024**

Współorganizacja XXII Toruńskiego Festiwalu Nauki i Sztuki

---

**06.03.2024**

Współorganizacja Dnia na UMK - stąd trafisz wszędzie

---

**15.12.2023**

Współorganizacja Dnia Otwartego Wydziału Chemii UMK

---

---

**18.09.2023 - 22.09.2023**

**Współorganizacja 65. Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego**

---

**20.05.2023**

**Pomoc w organizacji Zjazdu Absolwentów Wydziału Chemii oraz Kierunku Chemia Wydziału Mat-Fiz-Chem**

---

**01.02.2023 - 31.09.2024**

**Członkostwo w Zespole ds. Promocji i Popularyzacji Nauki działającym na Wydziale Chemii UMK - prowadzenie mediów społecznościowych Wydziału Chemii UMK**

## **Stypendia**

---

**01.11.2024 - 31.01.2026**

**Zwiększenie stypendium doktoranckiego finansowanego z programu IDUB**