



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Kraków, 2 września 2015

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Olgi Mazuryk, zatytułowanej:

***"Polypyridyl ruthenium complexes for cancer treatment and  
vizualization"***

Wydział  
Biochemii,  
Biofizyki i  
Biotechnologii

Badania dotyczące zastosowań kompleksów metali w medycynie to dziedzina nowoczesnej chemii nieorganicznej, która łączy dane o strukturze i właściwościach kompleksów metali oraz przebiegu i kontroli procesów życiowych organizmu. Nowe kompleksy rutenu wykazujące właściwości katalityczne w metatezie olefin są jednym z najszybciej rozwijających się działów w nowoczesnej syntezie organicznej. Wyzwaniem jest optymalizacja struktury katalizatorów w kierunku zwiększenia ich reaktywności oraz stabilności. Szczególnie interesujące są nowe kompleksy rutenu, umożliwiające wydajne i skuteczne przeprowadzenie reakcji metatezy. Reakcja metatezy olefin została odkryta w latach 50-tych XX wieku, umożliwia ona efektywne i wydajne tworzenie wiązań C=C. Dzięki rozwojowi badań nad aktywnymi i stabilnymi katalizatorami, poznaniu ich chemii koordynacyjnej możliwe stały się syntezы nowych związków naturalnych i biologicznie czynnych. Wyrazem uznania międzynarodowej społeczności naukowców było uhonorowanie U. Chauvina, R.R. Schrocka oraz R.H. Grubbsa nagrodą Nobla w 2005 roku za prace dotyczące tej dziedziny.

W ostatnich latach zainteresowanie kompleksami rutenu rozszerzyło się o potencjalne ich wykorzystanie w terapii i diagnostyce. Obecnie dwa kompleksy rutenu znajdują się w fazie badań klinicznych, a dziesiątki nowych związków testowanych jest pod kątem ich właściwości przeciwnowotworowych lub też jako znacznik do metod obrazowania optycznego.

ul. Gronostajowa 7  
30-387 Kraków  
tel. +48(12) 664 60 02  
fax +48(12) 664 69 02  
email:  
sekretariat.wbbib@uj.edu.pl

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Olgi Mazuryk wpisuje się w ten nurt badań. Głównym celem doktorantki była synteza oraz zbadanie właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych serii polipirydylowych kompleksów rutenu, zawierających dwa ligandy: **dip** (4,7-difenylo-1,10-fenantrolina) oraz zmodyfikowany ligand **bpy** (2,2-bipirydyna) w kierunku ich potencjalnego wykorzystania w obrazowaniu zmian nowotworowych i terapii przeciwnowotworowej.

### **Uwagi ogólne**

Praca doktorska mgr Olgi Mazuryk została wykonana w Zakładzie Chemii Nieorganicznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyny Stochel oraz prof. dr hab. Tomasza Brzozowskiego. Praca napisana jest w języku angielskim, ma formę klasycznej rozprawy, z podziałem na typowe dla prac eksperymentalnych rozdziały: Wstęp zakończony celami pracy, Materiały i metody, Wyniki i dyskusja z wnioskami, Bibliografia zawierająca 174 pozycje. Wykaz skrótów przygotowany alfabetycznie znakomicie ułatwia czytanie pracy (str.147-150).

We wstępie doktorantka przedstawia analizę stanu wiedzy dotyczącą nowotworów, od ich powstawania, poprzez tworzenie obszarów hipoksycznych i naczyń krwionośnych guza, aż do tworzenia przerzutów. Kolejno przedstawia imidazole i ich rolę w diagnostyce i terapii nowotworów. Dochodzi do planowanych badań, których pierwszym celem była synteza oraz zbadanie fizykochemicznych i fotofizycznych oraz biologicznych właściwości kompleksów rutenu w kierunku możliwości ich wykorzystania w obrazowaniu i terapii przeciwnowotworowej. Moja recenzja dotyczy głównie przeprowadzonych badań biologicznych.

### **Uwagi szczegółowe**

W rozdziale 2.2.1. "Imaging of hypoxia" zabrakło szerszej informacji o metodzie EPROI (obrazowanie tlenometryczne z użyciem EPR (EPR Oxygen Imaging), która jest rozwijana z dobrym skutkiem na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ przez dr hab. Martynę Elas. Jest to metoda nieinwazyjna, daje możliwość wykonywania wielokrotnych pomiarów tego samego obiektu, oraz możliwość oznaczenia obszarów przejściowo hipoksycznych, dzięki czemu ma szerokie perspektywy zastosowań klinicznych. Będzie mogła być stosowana jako metoda diagnostyczna w różnych stanach niedotlenienia, oraz w planowaniu radioterapii nowotworów. Na podstawie dotychczasowych badań dr Elas stwierdzono dużą heterogenność przestrzenno-czasową hipoksji w nowotworach, co sugeruje, że próbkowanie jedynie kilku punktów pomiarowych nie jest reprezentatywne dla utlenowania nowotworów. Aby rejestrować hipoksję w guzach nowotworowych, z uwzględnieniem jej dynamiki przestrzennej i czasowej, potrzebna jest nieinwazyjna metoda tlenometryczna o rozdzielczości przestrzennej ok. 100-200 mikrometrów, czasowej ok. 3-10 min i tlenometrycznej rzędu ok. 1-3 mm Hg. Znajomość prac z zastosowaniem tej metody będzie szczególnie przydatna przy kontynuowaniu badań rozpoczętych w recenzowanej pracy i planowanych do wykonania w układzie *in vivo*.

Praca doktorska mgr Olgi Mazuryk zaplanowana została z dużym rozmachem, pomimo, że jest ograniczona do badań *in vitro*. Wstępne badania fizyko-chemiczne przeprowadzono dla 6 zsyntetyzowanych kompleksów Ru (II), wobec komórek nowotworowych i prawidłowych, w tym komórek śródbłonna mysiego, linii ustabilizowanej i pierwotnej. Jest to bardzo trudne, choć nowatorskie i pożądane podejście do tego typu badań. Wydaje się bowiem, że tylko komórki linii pierwotnej mogą być reprezentatywne na etapie badań *in vitro*, mających prowadzić do zastosowań klinicznych. Druga, ważna pochwała dotyczy porównywania skuteczności działania testowanego związku nie tylko dla różnych komórek nowotworowych, ale od razu także względem komórek prawidłowych (śródbłonna).

W pierwszych próbach wyselekcjonowano najbardziej interesujący spośród zsyntetyzowanych kompleksów, którym okazał się  $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bpyNitroIm})]\text{Cl}_2$  i badania biologiczne przeprowadzono głównie dla tego właśnie kompleksu.

Wyniki stanowią główny rozdział pracy, zostały opisane na 80 stronach, zawierają 72 figury, 12 tabel i 7 schematów, są podzielone na 15 rozdziałów, opisujących wyniki kolejnych doświadczeń. Taki podział z krótkim podsumowaniem na końcu każdego rozdziału ułatwia czytanie i umożliwia rozeznanie w bardzo dużej ilości wyników. Pokazuje równocześnie bardzo eleganckie planowanie kolejnych doświadczeń, które pozwoliły Autorce na sformułowanie **15 wniosków** i wskazanie kierunków dalszych badań.

1. Cytotoksyczność otrzymanych kompleksów rutenu jest znacząco większa niż cytotoksyczność związku referencyjnego, powszechnie używanej obecnie cisplatyny;

2. Toksyczność kompleksów Ru związana jest ściśle z poziomem jego akumulacji w komórkach;

3. Na poziom akumulacji w komórkach znaczący wpływ mają ładunek i lipofilowość badanych związków;

4. Największą cytotoksycznością wśród przebadanych kompleksów zarówno dla komórek nowotworowych, jak i komórek śródbłonna cechuje się najbardziej lipofilowy związek wśród kompleksów dwuwartościowych;

5. Po akumulacji, kompleksy rutenu zaburzają cykl komórkowy, hamując rozwój i podział komórek, oraz powodując ich śmierć na drodze apoptozy;

6. Jednym z czynników wywołujących apoptozę może być wzrost poziomu reaktywnych form tlenu, spowodowany akumulacją badanych kompleksów Ru w komórce;

7. Obserwowana apoptoza nie zachodzi na drodze szlaku mitochondrialnego, mimo że badane kompleksy rutenu preferencyjnie akumulują się w mitochondriach oraz w siateczce endoplazmatycznej;

8. Wyższy poziom retencji kompleksów Ru w komórkach nowotworowych raka piersi 4T1 niż w komórkach śródbłonka MLuMEC FVB może sugerować niższą ogólną toksyczność kompleksów rutenu oraz mniejsze efekty uboczne;

9. Poziom luminescencji komórek po inkubacji z badanymi kompleksami rutenu nie jest ściśle skorelowany z wydajnością luminescencji wyznaczoną dla kompleksów w roztworach wodnych;

10. Obserwowany sygnał luminescencyjny zależy od poziomu akumulacji kompleksów w komórkach oraz od wydajności kwantowej i czasów życia luminescencji kompleksów po akumulacji. Badania w układach modelowych z użyciem ludzkiej albuminy pokazały, że w wyniku tworzenia adduktów Ru-białko zwiększa się czas życia oraz wydajność kwantowa luminescencji. Ten efekt (poprzednio opisany tylko w przypadku oddziaływania z DNA), dowodzi znaczącego wpływu białek na luminescencję polipirydylowych kompleksów rutenu zawierających ligandy dip. Co więcej pokazano, że oddziaływanie z DNA nie powoduje znaczących zmian w luminescencji badanych związków. Dodatkowo, badania *in vitro* nie wykazały akumulacji kompleksów Ru w jądrze komórkowym;

11. Ważnym etapem badań była ocena potencjalnych właściwości przeciwrzutowych polipirydylowych kompleksów rutenu. W pracy pokazano, że:

- akumulacja kompleksów Ru powoduje zmianę właściwości adhezyjnych komórek nowotworowych i komórek śródbłonka;

- akumulacja kompleksów Ru hamuje ruchliwość komórek śródbłonka (w teście "rysy");

12. Obserwowane zmiany właściwości adhezyjnych oraz angiogennych zostały potwierdzone zmianą poziomu ekspresji mRNA białek biorących udział w procesach adhezji, angiogenezie oraz ruchliwości w komórkach nowotworowych oraz śródbłonna.

Opisane efekty wskazują na istotny potencjał aplikacyjny badanych polipirydylowych kompleksów rutenu w terapii przeciwrzutowej.

W rozprawie doktorskiej dużą uwagę poświęcono także **polipirydyłowemu kompleksowi rutenu zawierającemu ligand bipirydyłowy z przyłączoną grupą nitroimidazolową** i stwierdzono, że:

13. Badany kompleks jest bardziej toksyczny w stosunku do komórek w stanie niedotlenienia w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach normalnych;

14. Badany kompleks wykazuje większą akumulację oraz wyższy poziom retencji w komórkach hodowanych w atmosferze obniżonego stężenia tlenu, w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach normalnych.

15. Właściwości biologiczne połączone z wyższą wydajnością kwantową oraz dłuższym czasem życia luminescencji nitroimidazolowej pochodnej kompleksu rutenu wskazują na możliwość zastosowania tego związku jako selektywnego znacznika do obrazowania obszarów niedotlenionych.


W podsumowaniu stwierdzam, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę są nowatorskie i zostały opublikowane w fachowych czasopismach, a mgr Olga Mazuryk jest pierwszym autorem pięciu publikacji:

1. **Mazuryk O.**, Kurpiewska K., Lewiński K., Stochel G., Brindell M. (2012): Interaction of apo-transferrin with anticancer ruthenium complexes NAMI-A and its reduced form. *J. Inorg. Biochem* **116**:11-18.

2. **Mazuryk O.**, Niemiec E., Stochel G., Gillaizeau I., Brindell M. (2013): Benzothiophen-pyrazine scaffold as a potential membrane targeting drug carrier. *J. Lumin.* **140**:51-56.
3. **Mazuryk O.**, Maciuszek M., Stochel G., Suzenet F., Brindell M. (2014): 2-nitroimidazole-ruthenium polypyridyl complex as a new conjugate for cancer treatment and visualization. *J. Inorg. Biochem.* **134**:83-91.
4. **Mazuryk O.**, Magiera K., Rys B., Suzenet F., Kieda C., Brindell M. (2014): Multifaceted interplay between lipophilicity, protein interaction and luminescence parameters of non-intercalative ruthenium (II) polypyridyl complexes controlling cellular imaging and cytotoxic properties. *J. Biol. Inorg. Chem* **19**:1305-1316.
5. **Mazuryk O.**, Suzenet F., Kieda C., Brindell M. (2015): The biological effect of the nitroimidazole derivative of a polypyridyl ruthenium complex on cancer and endothelial cells. *Metallomics* **7**:553-566.

Oceniana rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003r, z późniejszymi zmianami. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Olgi Mazuryk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę poziom naukowy ocenianej rozprawy, liczbę publikacji doktorantki, w tym 3 będące wynikiem realizacji ocenianej pracy doktorskiej (IF<sub>2013</sub>=10,416; IF<sub>2014</sub>=9,567) wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

  
Prof. dr hab. Krystyna Urbańska