



mgr Marta Anna Fik

Rozprawa doktorska

**„Wieloaspektowe badania właściwości
nowych kompleksów metali d-elektronowych”**

„Multi-faceted study of the properties
of new d-electron metal complexes”

Promotor

Prof. dr hab. Violetta Patroniak

Poznań 2017



Z całego serca dziękuję

Prof. dr hab. Violetcie Patroniak

*za wsparcie i zaufanie w pracy badawczej
oraz stwarzanie niezwykłych możliwości rozwoju.*



*Adamowi Gorczyńskiemu, Damianowi Marcinkowskiemu,
Arielowi Adamskiemu oraz Dawidowi Pakulskiemu*
za bezcenne dyskusje na tematy naukowe
oraz niezapomnianą atmosferę pracy;

dr Izabeli Pospiesznej-Markiewicz,
dr. hab. Zbigniewowi Hnatejko
za pomoc i porady

Dziękuję.

Rodzicom
za to że zawsze wierzyli w trafność moich wyborów
i troskę;

Przyjaciołom
za nieocenione wsparcie
i motywację

Dziękuję.



SPIS TREŚCI

Streszczenie w języku angielskim.....	1
Ankieta dorobku naukowego.....	4
Przewodnik po publikacjach stanowiących rozprawę doktorską:	
1. Wstęp teoretyczny.....	10
2. Cel pracy.....	14
3. Omówienie wyników badań.....	15
4. Wnioski.....	41
5. Literatura.....	43
Kopie cyklu publikacji stanowiących osiągnięcia naukowe, o którym mowa w art. 13 ust. 2 ustawy.....	47
<i>Eur. J. Med. Chem.</i> 2014 (86) 456–468	
<i>New J. Chem.</i> 2016 (40) 7943-7957	
<i>Polyhedron</i> 2015 (97) 83-93	
<i>Polyhedron</i> 2015 (102) 609–614	
<i>Eur. J. Inorg. Chem.</i> 2016 (36) 5530-5538	
Oświadczenia współautorów.....	126
Załączniki.....	148



STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Supramolecular chemistry is a promising domain standing at the crossroads of chemistry, biochemistry, physics and material science. Its foundations were laid down in 60's and were recognized in 1987 by the Nobel Prize Committee when Pedersen, Cram and Lehn were awarded for their contribution to this field. Again, in 2016 Sauvage, Stoddart and Feringa were granted with the Nobel Prize in chemistry for the design and synthesis of molecular machines.

According to the definition proposed by Lehn supramolecular chemistry is the chemistry beyond molecule. It involves a wide spectrum of molecular forces such as hydrogen bonding, π - π , van der Waals, hydrophobic/hydrophilic and electrostatic interactions and, last but not least, coordination bonding. Coordination bonding is formed as the result of the donation of the free electron pair from ligand molecule to empty orbitals of metal ion. Coordination chemistry focuses on systems consisting of metal ions and properly chosen ligands which enable them to form desired architectures. Coordination chemistry is a powerful tool in the design of new potentially applicable materials. Newly formed coordination compounds may exhibit greater properties than metal ion and ligand itself. The synergistic effect allows one to obtain entities with multiplied or slightly modified properties in comparison to starting materials.

This doctoral dissertation entitled "Multi-faceted study of the properties of new d-electron metal complexes" investigates and describes the formation and properties of new d-electron metal complexes with a special emphasis put on their biological, magnetic and photocatalytic activity. It covers the topics of the cytotoxic activity of polypyridine complexes (terpyridine with Ag(I) and V(IV/V); quaterpyridine with Ag(I) and Cu(I)) as well as magnetic properties of Fe(II) complexes and photocatalytic activity of Ag(I) complexes with Schiff base type ligands. Results obtained within this work are shortly described below.

Ag(I) complexes obtained with 6,6''-dimethyl-2,2':6',2''-terpyridine (general formula $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2]^+(\text{R}^-)_2$, where R^- stands for counterions) were thoroughly studied in terms of their biological activity, with the positive antiproliferative outcome on three human cancer cell lines: human breast cancer (T47D), human cervical carcinoma (HeLa) and human lung cancer (A-549). Performed DNA binding experiments showed that given Ag(I) species specifically interact with DNA double helix via intercalation and were visualized by confocal microscopy

to specifically bind to the nuclei. All newly synthesized helical systems exhibit promising antimicrobial activity against Gram-negative *Escherichia coli* and Gram-positive *Staphylococcus aureus* bacterial strains. Spectrophotometric properties were described as fulfilment of structural studies of newly presented complexes confirming their helical structure in solution.

The self-assembly of 6,6''-dimethyl-2,2':6',2'';6'',2'''-quaterpyridine with tetrahedral ions of Ag(I) and Cu(I) led to the formation of dinuclear double stranded helicates of general formula $[\text{Me}_2(\text{qtp})_2]^+(\text{R}^-)_2$ (Me = Ag(I) or Cu(I)). Evaluation of the biological activity of the resulting compounds was carried out with a focus on their cytotoxic properties. Their biological potential was investigated *via* MTT assay towards HeLa, T-47D and HaCaT cell lines. It was further investigated by flow cytometry and one was able to observe the DNA dependent mechanism of cytotoxic action. Moreover, it allowed one to observe that Ag(I) complexes induce the necrosis of cells while Cu(I) lead to apoptosis. We find it is due to the redox properties of metal ions chosen for this study. The redox potential of Cu ions is acceptable *in vivo* so it may have an impact on the bioavailability of the complexes. Since the mechanism of action of helicates is most likely related to their interaction with DNA a comprehensive studies of its mode were performed. Results obtained by circular dichroism (CD) technique, competitive binding fluorescence measurements, as well as DNA melting allowed one to anticipate the groove binding mode. It was further supported by molecular docking studies.

Reactions of 6,6''-dimethyl-2,2':6',2''-terpyridine ligand and VX_3 (X = Cl, Br) in aerobic conditions result in formation of two new mononuclear coordination compounds: $[\text{VO}(\text{tpy})\text{Cl}_2]$ and $[\text{VO}_2(\text{tpy})_2]\text{Br}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Their cytotoxic activity was investigated in MTT assay and supported by absorption titration spectra suggesting the possible mechanism of action going through intercalative binding mode. On the basis of high binding constants $K_{\text{bind}} = 4.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and $K_{\text{bind}} = 1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ the relationship between structure of the complex and DNA interaction could be established, highlighting indirect impact of counterions on the final structure formation and thus biological activity. Flow cytometry analysis further confirmed the DNA binding based mechanism of action. What is more, both compounds are the first reported cytotoxically active vanadium systems with 2,2':6',2''-terpyridine scaffolded family towards T47D cell line.

New ligand (Z)-2-(1-methyl-2-(pyridine-2-ylmethylene)hydrazinyl)benzoxazole (L^1) was obtained via two-step synthetic protocol. Results provide an example of inorganic self-organization of well-defined supramolecular architectures of Fe(II) ions. Particularly, two symmetric complexes of general formula $3[Fe(L^1)_2]^{+2} \cdot 6(R)^- \cdot 2(CH_3CN)$ were obtained – both complexes crystallize in a rare for functional supramolecular compounds Ia-3d crystal system. All spectroscopic methods used in this study confirm 1:2 metal:ligand stoichiometry revealed by X-Ray diffraction methods. Magnetic susceptibility measurements and Mössbauer spectroscopy indicate that Fe(II) ions are all of low spin up to 300 K. FT-IR spectra and TG measurements indicate the loss of acetonitrile molecules from the crystal lattice at *ca.* 300 K, however, at the same time, no first order phase transitions are recorded in DSC measurements. Increasing of $\chi_m T$ values in the temperature range 300 – 400 K could be a cooperative effect of loss of CH_3CN solvent molecule and probably incomplete LS \leftrightarrow HS spin transition above room temperature in both complexes.

Much attention has been focused recently on the improvement of the photocatalytic efficiency of already known degradation catalysts and design of the new ones. Since Ag(I) compounds are of high interest in the field of photodegradation processes due to their good optical and electron properties concerning HOMO-LUMO band gaps two new complexes with Schiff base type ligand of formula $[AgL^2](OTf)$ and $[Ag_2(L^2)_2](PF_6)_2$ (monomeric and helical, respectively) were designed. In this study it was shown that both mono- and dinuclear species are capable of consuming the organic waste in water, however monomeric complex $[AgL^2](OTf)$, due to the lability of one coordination site, is more active towards degradation of model compounds MB and QY. At the same time the Ag(I) ions in helical complex $[Ag_2(L^2)_2](PF_6)_2$ are hindered in a cave formed by two ligands wrapped around them what slightly inactivates the complex. However, helical complex is recyclable while $[AgL^2](OTf)$ decomposes after one turn of irradiation.

ANKIETA DOROBKU NAUKOWEGO

Mgr Marta A. Fik

Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki.

Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcia naukowe, o którym mowa w art. 13 ust. 2 ustawy, rozprawę doktorską pt. „Wieloaspektowe badania właściwości nowych kompleksów metali d-elektronowych”:

1. **Marta A. Fik**, Adam Gorczyński, Maciej Kubicki, Zbigniew Hnatejko, Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska, Eliza Wyszko, Małgorzata Giel-Pietraszuk, Violetta Patroniak; „6,6''-Dimethyl-2,2':6',2''-terpyridine revisited: new fluorescent silver(I) helicates with *in vitro* antiproliferative activity via selective nucleoli targeting”, **European Journal of Medicinal Chemistry** 2014 (86) 456–468; IF = 3,447.

Mój udział w niniejszej publikacji obejmuje badania aktywności cytotoksycznej metodą MTT liganda terpirydynowego oraz jego czterech związków kompleksowych z jonami Ag(I) wobec komórek nowotworowych HeLa, T47D i A-549 oraz zdrowych komórek HEK-293T, a także ocenę w zakresie ich zdolności bakteriostatycznych dla szczepów *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli*. Kolejnym etapem prac badawczych były eksperymenty miareczkowania spektrofotometrycznego oraz fluorymetrycznego kompleksów przez CT-DNA, kompetencyjnego miareczkowania fluorescencyjnego kompleksu EtBr – CT-DNA kompleksami metali, miareczkowanie d(CCCCCCGGGGG) badanymi związkami kompleksowymi i obserwacja za pomocą metody dichroizmu kołowego. Opisałam eksperymenty oraz dyskutowałam otrzymane wyniki, także eksperymenty przeprowadzone przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Brałam aktywny udział w dyskusji z recenzentami.

Mój udział procentowy stanowi 34%.

Udział procentowy współautorów wynosi: Adam Gorczyński (34%), Maciej Kubicki (5%), Zbigniew Hnatejko (5%), Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska (5%), Eliza Wyszko (5%), Małgorzata Giel-Pietraszuk (2%), Violetta Patroniak (10%).

2. Ariel Adamski, **Marta A. Fik**, Maciej Kubicki, Zbigniew Hnatejko, Dorota Gurda, Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska, Eliza Wyszko, Dariusz Kruszka, Zbigniew Dutkiewicz, Violetta Patroniak; „*Full characterization and cytotoxic activity of new silver(I) and copper(I) helicates with quaterpyridine*”, **New Journal of Chemistry** 2016 (40) 7943-7957; IF = 3,277.

Mój udział w niniejszej publikacji obejmuje badania spektroskopowe mające na celu określenie zdolności związków kompleksowych Ag(I) oraz Cu(I) do wiązania się z DNA. Obejmowały one eksperymenty kompetencyjnego wiązania helikatów względem EtBr bazujące na technikach luminescencyjnych oraz próby identyfikacji mechanizmu wiązania za pomocą metody dichroizmu kołowego oraz topienia DNA, a także opis i dyskusję uzyskanych wyników. Zajmowałam się również opisem wyników eksperymentu cytometrii przepływowej, a także czuwałam nad poprawnością językową i spójnością artykułu. Brałam aktywny udział w dyskusji z recenzentami.

Mój udział procentowy stanowi 30,5%.

Udział procentowy współautorów wynosi: Ariel Adamski (30,5%), Maciej Kubicki (5%), Zbigniew Hnatejko (5%), Dorota Gurda (5%), Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska (2%), Eliza Wyszko (5%), Dariusz Kruszka (2%), Zbigniew Dutkiewicz (5%), Violetta Patroniak (10%).

3. **Marta A. Fik**, Adam Gorczyński, Maciej Kubicki, Zbigniew Hnatejko, Anna Wadas, Paweł J. Kulesza, Agnieszka Lewińska, Małgorzata Giel-Pietraszuk, Eliza Wyszko, Violetta Patroniak; „*New vanadium complexes with 6,6''-dimethyl-2,2':6',2''-terpyridine in terms of structure and biological properties*”, **Polyhedron** 2015 (97) 83-93; IF = 2,011.

Mój udział obejmuje badania aktywności cytotoksycznej kompleksów wanadu wobec komórek nowotworowych (HeLa, T47D, A-549) oraz zdrowych komórek (HaCaT) metodą testu MTT oraz badania spektroskopowe w zakresie fluorescencyjnego miareczkowania kompetencyjnego kompleksu EtBr – CT-DNA roztworami kompleksów, a także miareczkowania spektrofotometrycznego kompleksów przez CT-DNA. Zajmowałam się opisem eksperymentów w pracy oraz dyskusją otrzymanych wyników, także eksperymentów cytometrii przepływowej. Brałam aktywny udział w dyskusji z recenzentami.

Mój udział procentowy stanowi 25%.

Udział procentowy współautorów wynosi: Adam Gorczyński (25%), Maciej Kubicki (5%), Zbigniew Hnatejko (5%), Anna Wadas (5%), Paweł J. Kulesza (5%), Agnieszka Lewińska (5%), Małgorzata Giel-Pietraszuk (5%), Eliza Wyszko (10%), Violetta Patroniak (10%).

4. **Marta A. Fik**, Marta Löffler, Marek Weselski, Maciej Kubicki, Maria J. Korabik, Violetta Patroniak; „*New Fe(II) complexes with Schiff base ligand: synthesis, spectral characterization, magnetic studies and thermal stability*”, **Polyhedron** 2015 (102) 609–614; IF = 2,011.

Mój udział obejmuje zaprojektowanie, syntezę i charakterystykę spektroskopową (NMR, FT-IR) oraz spektrometryczną (ESI-MS) liganda oraz związków kompleksowych Fe(II), a także ich opis w publikacji. Dokonałam krystalizacji związków kompleksowych. Zajmowałam się dyskusją wyników badań magnetycznych oraz przygotowaniem artykułu od podstaw. Brałam aktywny udział w dyskusji z recenzentami.

Mój udział procentowy stanowi 65%.

Udział procentowy współautorów wynosi: Marta Löffler (5%), Marek Weselski (5%), Maciej Kubicki (5%), Maria J. Korabik (10%), Violetta Patroniak (10%).

5. **Marta A. Fik**, Angelika E. Odachowska, Maciej Kubicki, Joanna Karpińska, Violetta Patroniak; „*Helicity in photocatalysis: advantage or obstacle? Studies on novel silver complexes – synthesis, structure and photocatalytic activity*”, **European Journal of Inorganic Chemistry** 2016 (36) 5530-5538; IF = 2,686.

Mój udział w tejże pracy obejmuje zaprojektowanie cząsteczki liganda oraz jego syntezę, a także syntezę związków kompleksowych Ag(I) i ich krystalizację. Wszystkie otrzymane związki chemiczne zostały scharakteryzowane za pomocą metod spektroskopowych (NMR, FT-IR) i spektrometrycznych (ESI-MS) oraz analizy elementarnej. Przygotowałam manuskrypt łącznie z opisem oraz dyskusją badań nad fotostabilnością katalizatorów, ich aktywnością degradacyjną związków organicznych oraz właściwościami optycznymi.

Mój udział procentowy stanowi 70%.

Udział procentowy pozostałych współautorów wynosi: Angelika E. Odachowska (5%), Maciej Kubicki (5%), Joanna Karpińska (10%), Violetta Patroniak (10%).

- A. Summary impact factor według listy Journal Citation Reports (JRC) na rok wydania publikacji wynosi: **13,432**
- B. Łączna liczba cytowań publikacji zawartych w prezentowanym cyklu według bazy Web of Science (09.01.2017): **11**
- C. Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): **2**
- D. Udział w konferencjach:
- międzynarodowych
 - Marta A. Fik**, Martyna Szymańska, Włodzimierz Czepa, Maciej Kubicki, Angelika Odachowska, Joanna Karpińska, Violetta Patroniak; „*Schiff base complexes in view of bio- and environmental aspects - photocatalytic and biological studies*”, Assises Franco-Polonoises de Chemie, 23-24.07.2015, Paryż, Francja; poster i krótkie wystąpienie – autor prezentujący
 - Marta A. Fik**, Adam Gorczyński, Maciej Kubicki, Zbigniew Hnatejko, Agnieszko Fedoruk-Wyszomirska, Eliza Wyszko, Małgorzata Giel-Pietraszuk, Violetta Patroniak; „*Novel fluorescent Ag(I) helical complexes with in vitro antiproliferative activity via selective nucleoli targeting*”, 1st International Congress: From Drug Discovery to Drug Delivery, 13-15.11.2014, Ateny, Grecja; poster – autor prezentujący
 - Adam Gorczyński, **Marta A. Fik**, Dominika Strugarek, Maciej Kubicki, Zbigniew Hnatejko, Anna Wadas, Paweł J. Kulesza, Małgorzata Giel-Pietraszuk, Eliza Wyszko, Violetta Patroniak; „*Structural and biological studies of new systems that comprise vanadium and 6,6''-dimethyl-2,2':6',2''-terpyridine*”, 1st International Congress: From Drug Discovery to Drug Delivery, 13-15.11.2014, Ateny, Grecja; poster – współautor
 - Marta A. Fik**, Ariel Adamski, Adam Gorczyński, Damian Marcinkowski, Violetta Patroniak; „*Supramolecular architectures: helicates, grids, clusters*”, Oxygenalia – Water. the molecule of life, 7-8.11.2014, Poznań, Polska; poster – autor prezentujący
 - Marta A. Fik**, Adam Gorczyński, Ariel Adamski, Damian Marcinkowski, Violetta Patroniak; „*Oxo- and dioxovanadium(IV/V) Terpyridine complexes with in vitro antiproliferative activity*”, Oxygenalia – Water. the molecule of life, 7-8.11.2014, Poznań, Polska; poster – autor prezentujący

6. Violetta Patroniak, Ariel Adamski, **Marta A. Fik**, Adam Gorczyński, Damian Marcinkowski; „*Novel metallo-supramolecular frameworks as catalysts and cytostatic agents*”, 2nd International Symposium on C-H Activation, 30.06-03.07.2014, Rennes, Francja; poster – współautor
 7. **Marta A. Fik**, Damian Marcinkowski, Adam Gorczyński, Ariel Adamski, Violetta Patroniak; „*Self-assembly as an avenue to obtain unprecedented supramolecular architectures*”; International Symposium on Nanostructured Functional Materials, 15-18.06.2014, Pułtusk, Polska; poster – autor prezentujący
 8. **Marta A. Fik**, Ariel Adamski, Adam Gorczyński, Damian Marcinkowski, Małgorzata Giel-Pietraszuk, Violetta Patroniak; „*Structural diversity of d-electron metal complexes and its outcome on their properties*”, 16th JCF-Frühjahrssymposium, 26-29.03.2014, Jena, Niemcy; poster – autor prezentujący
 9. Violetta Patroniak, Adam Gorczyński, **Marta A. Fik**, Ariel Adamski, Damian Marcinkowski; „*Self-assembling supramolecular architectures: From novel photocatalytically active polypyridine complexes, through imidazole-based biorelevant systems to hydrogen-bonded liquid crystals*”, 12th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials (12th ICFPAM), 8-13.12.2013, Auckland, Nowa Zelandia; wystąpienie ustne – współautor
 10. **Marta A. Fik**, Adam Gorczyński, Ariel Adamski, Maciej Kubicki, Małgorzata Giel-Pietraszuk, Violetta Patroniak; „*Nickel – better third of d⁸-electron metals?*”, Bioconnect 2013 „Facilitating dialogue between business and academia, 15-16.05.2013, Złotniki, Polska; poster – autor prezentujący
- b) krajowych
1. **Marta A. Fik**, Adam Gorczyński, Ariel Adamski, Damian Marcinkowski, Violetta Patroniak; „*Kompleksy helikalne pierwiastków przejściowych – synteza, struktura i właściwości*”, 57 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego. Chemia – nadzieje i marzenia, 14-18.2014, Częstochowa, Polska; poster – współautor
 2. Adam Gorczyński, **Marta A. Fik**, Ariel Adamski, Damian Marcinkowski, Violetta Patroniak; „*Synteza i właściwości nowych kompleksów metalosupramolekularnych ligandów N-heterocyklicznych*”, 57 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego. Chemia –

- nadzieje i marzenia, 14-18.09.2014, Częstochowa, Polska; wystąpienie ustne – współautor
3. **Marta A. Fik**, Adam Gorczyński, Maciej Kubicki, Małgorzata Giel-Pietraszuk, Violetta Patroniak; „*Samoorganizacja w układzie ligand/jon centralny kontrolowana obecnością wiązań wodorowych. Struktura a właściwości biologiczne*”, Ogólnopolskie Sympozjum „Chiralność – od cząstki elementarnej do Uniwersum”, 7.06.2013, Poznań, Polska; poster – autor prezentujący
 4. Adam Gorczyński, **Marta A. Fik**, Małgorzata Giel-Pietraszuk, Maciej Kubicki, Zbigniew Hnatejko, Violetta Patroniak; „*Kontrolowanie procesu samoorganizacji w układzie ligand terpirydynowy – jony srebra(I) poprzez dobór przeciwjonów*”, Ogólnopolskie Sympozjum „Chiralność – od cząstki elementarnej do Uniwersum”, 7.06.2013, Poznań, Polska; poster – współautor
- E. Udział w projektach badawczych:
- a) Grant Narodowego Centrum Nauki PRELUDIUM nr 2015/19/N/ST5/00615 „*Synteza chiralnych trójmetalicznych podwójnych helikatów oraz ich interakcje z jedno- i dwuniciowymi DNA*” – kierownik
 - b) Grant Narodowego Centrum Nauki OPUS nr 2011/03/B/ST5/01036 „*Architektury supramolekularne w nowych kompleksach jonów metali d- i f-elektronowych*” – wykonawca
- F. Staże międzynarodowe:
- Dwukrotny staż w Laboratorium Chemii Supramolekularnej Profesora Jean-Marie Lehna w Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires (ISIS), Strasbourg, Francja (30.09.2015 – 31.03.2016 oraz 01.10 – 31.12.2016)
- G. Nagrody:
- Nagroda Zespołowa II Stopnia w uznaniu za osiągnięcia naukowe w roku 2015 przyznana przez Rektora Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

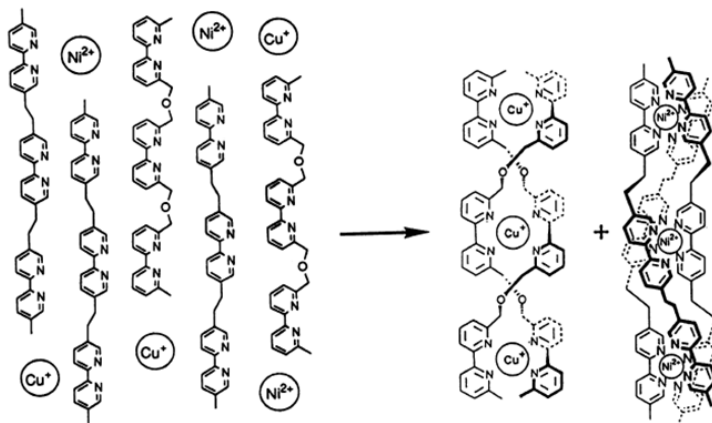
PRZEWODNIK PO PUBLIKACJACH STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

„Wieloaspektowe badania właściwości nowych kompleksów metali d-elektronowych”

1. Wstęp teoretyczny

Chemia koordynacyjna wykorzystuje zjawisko rozpoznania cząsteczkowego pomiędzy jonami metali a ligandami organicznymi. Za podwaliny pojęcia rozpoznania cząsteczkowego uważa się model klucza i zamka wprowadzony przez Emila Fischera w 1894 roku. Zajmował się on wysoce specyficznymi reakcjami enzymatycznymi [1]. Chemia typu „gość-gospodarz” stała się przedmiotem intensywnych badań w połowie XX wieku, a za moment kulminacyjny uważa się rok 1987, w którym Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn oraz Charles J. Pedersen otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii za rozwój i wykorzystanie cząsteczek o specyficznych oddziaływaniach strukturalnych cechujących się wysoką selektywnością. Nośność tematyki została również doceniona przez Komitet w 2016 roku, gdy Jean-Pierre Sauvage, Sir J. Fraser Stoddart i Bernard L. Feringa zostali laureatami Nagrody Nobla w dziedzinie chemii za opracowanie i syntezę maszyn molekularnych [2].

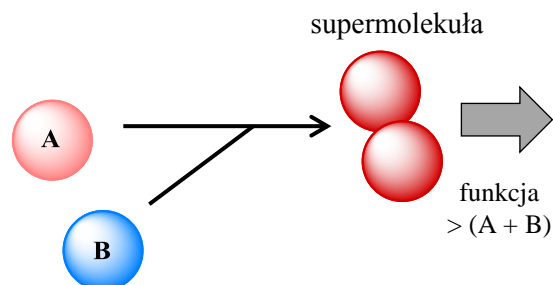
W proces samoorganizacji może być zaangażowane szerokie spektrum wiązań międzycząsteczkowych począwszy od oddziaływań elektrostatycznych (jon-dipol, dipol-dipol) oraz π - π , poprzez wiązania wodorowe, hydrofobowe i hydrofilowe, na koordynacyjnych kończąc [1]. Znamienitym przykładem jest proces tworzenia molekularnych kratek lub helikatów, który opiera się na dwóch głównych filarach: odpowiednim



zaprojektowaniu ligandów organicznych oraz doborze jonów metali o komplementarnych **Rysunek 1** Samosortowanie w układzie dwóch ligandów polipirydynowych i równomolowej mieszaninie jonów Cu^+ oraz Ni^{2+} do podwójnego i potrójnego helikatu [3].

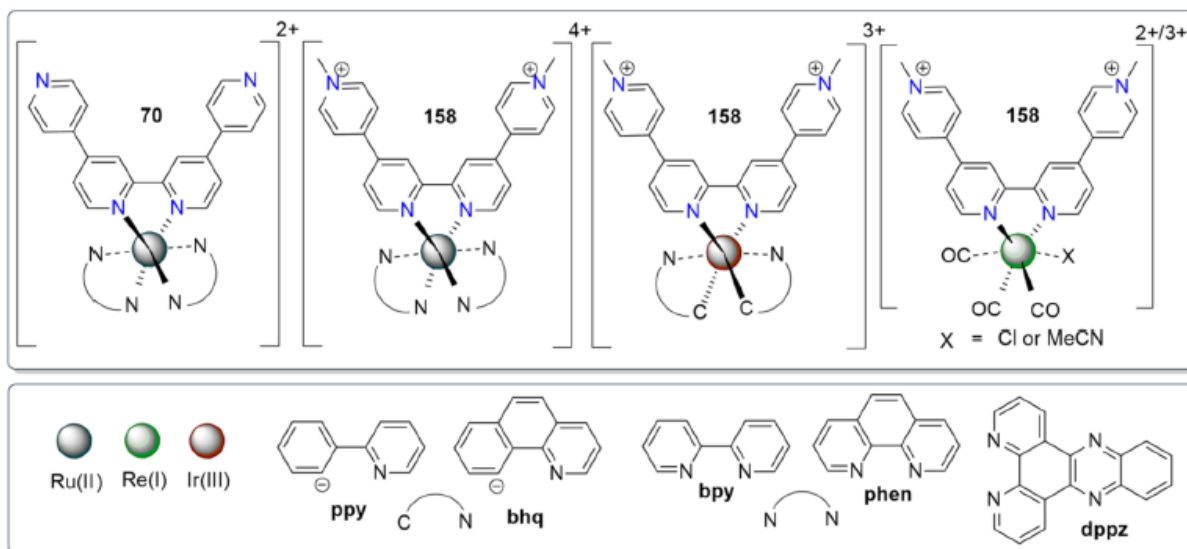
preferencjach koordynacyjnych (Rysunek 1) [3, 4].

Właściwości poszczególnych składowych supercząsteczek nie są jedynie addytywne, lecz kooperatywne. W wyniku połączenia indywidualnych chemicznych o określonych właściwościach, można otrzymać produkt ważny aplikacyjnie o unikalnej i dotąd niespotykanej aktywności biologicznej, chemicznej, i/lub fizycznej (Rysunek 2) [1].



Rysunek 2 Idea supercząsteczki.

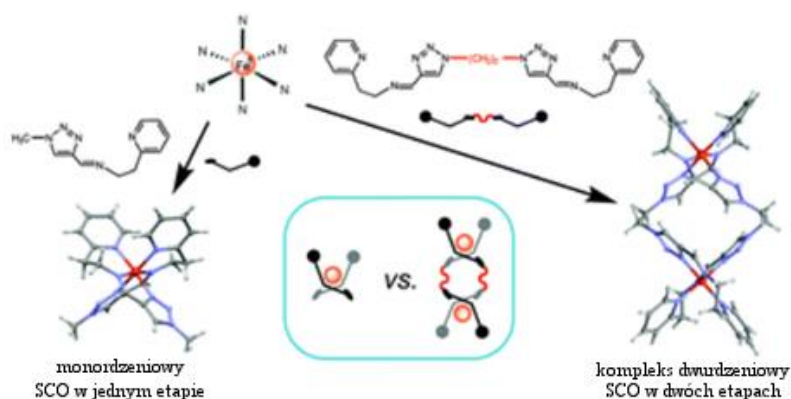
Związki kompleksowe z ligandami polipirydynowymi cieszą się niegasnącym zainteresowaniem w aspekcie ich potencjalnego wykorzystania jako metaloterapeutyki. Stabilność oraz intertność ligandów w środowisku fizjologicznym są kluczowymi elementami decydującymi o ich wartości w tworzeniu nowych leków. Kompleksy tetrapirydyny z Ru(II), Re(I) i Ir(III) wykazują atrakcyjną aktywność biologiczną, która opiera się na oddziaływaniach z DNA (Rysunek 3). Poprzez zmianę jonu metalu możliwa jest modyfikacja sposobu oddziaływań kompleksów tetrapirydyny z helisą. Ru(II) i Re(I) interkalują helisę, natomiast kompleks Ir(III) wiąże się w małym rowku [5].



Rysunek 3 Kompleksy Ru(II), Re(I) i Ir(III) wykazujące atrakcyjną aktywność biologiczną [5].

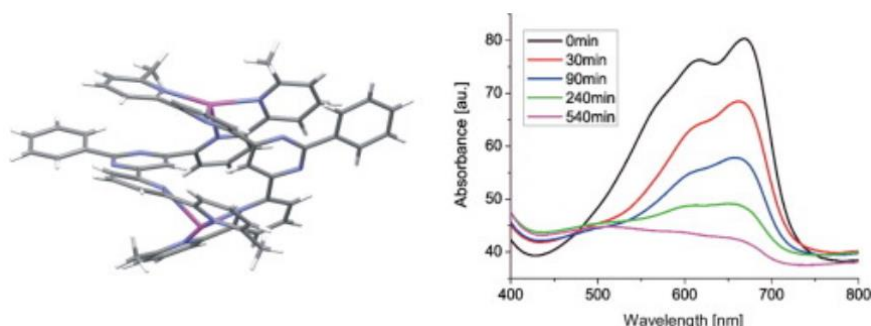
Związki kompleksowe metali d-elektronowych mogą również służyć do produkcji układów bistabilnych. Jony Fe^{2+} zawierają 6 elektronów walencyjnych na orbitalach d i w związku z tym mogą być dia- lub paramagnetykami w zależności od ich otoczenia

koordynacyjnego (Rysunek 4). Kompleksowanie tych jonów za pomocą ligandów typu zasad Schiffa pozwala na otrzymywanie układów o potencjalnie aplikacyjnych właściwościach [6].



Rysunek 4 Wpływ kompleksowania jonów Fe^{2+} na ich właściwości magnetyczne [6].

Poprzez koordynację możliwa jest taka modyfikacja przerwy HOMO-LUMO cząsteczek kompleksów, aby możliwe było ich wykorzystanie jako efektywnych fotokatalizatorów rozkładu materii organicznej w wodzie. Dotychczas wykorzystywane fotokatalizatory są wzbudzone przez światło ultrafioletowe, które stanowi jedynie 2-3% światła słonecznego, dlatego dąży się do stworzenia takich układów, gdzie akcja fotokatalityczna będzie generowana przez światło widzialne, które stanowi 45% światła słonecznego [6]. Przeprowadzono szereg eksperymentów z użyciem kompleksów srebra(I) z ligandami polipirydynowymi w roli fotokatalizatorów (Rysunek 5), uzyskując poziom degradacji barwnika organicznego: 90-100% w roztworze wodnym w czasie 7-40 godzin [6-8].



Rysunek 5 Struktura krystaliczna katalizatora $[\text{Ag}_2(\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{N}_6)_2](\text{OTf})_2$ oraz degradacja barwnika organicznego w czasie pod wpływem naświetlania promieniowaniem słonecznym [6].



We współczesnym świecie naukowym wiele grup prowadzi intensywne badania w zakresie potencjalnych zastosowań kompleksów metali d-eletronowych. Nośność tematyki skłoniła do eksploracji tego obszaru chemii w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej ze szczególnym uwzględnieniem właściwości biologicznych, magnetycznych i fotokatalitycznych.

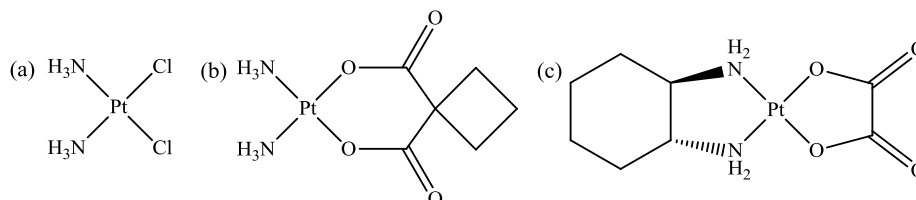
2. Cel pracy

Cel rozprawy doktorskiej najkrócej obrazuje jej tytuł „Wieloaspektowe badania właściwości nowych kompleksów metali d-elektronowych”. W doktoracie opisano syntezę nowych kompleksów metali przejściowych oraz charakterystykę i opis ich potencjału aplikacyjnego z ligandami heterocyklicznymi. W toku prac wykorzystano jony Ag^+ , Cu^+ , Fe^{2+} oraz VO^{2+} i VO_2^+ . Wyboru dokonano na podstawie struktur elektronowych, które warunkują ich podstawowe właściwości. Następnie parametry te modyfikowano pod wpływem koordynacji przez ligandy organiczne. Na potrzeby badań wykorzystano dotychczas znane i dobrze scharakteryzowane ligandy polipirydynowe: 6,6''-dimetylo-2,2':6',2''-terpirydynę i 6,6''''-dimetylo-2,2';6',2'';6'',2''''-tetrapirydynę, a także nowo otrzymane ligandy hydrazonowe z jednostką benzoksazolową lub benzotiazolową: 2-(1-metylo-2-(pirydino-2-ylometyleno)hydrazinylo)benzokazol oraz 2-(1-metylo-2-(pirydino-2-ylometyleno)hydrazinylo)benzotiazol.

Rozprawa doktorska eksploruje tematykę aktywności biologicznej związków kompleksowych Ag^+ i Cu^+ , a także VO^{2+} , VO_2^+ w aspekcie mechanizmów działania w komórkach zdrowych i nowotworowych. Dotychczas najbardziej obiecującą grupą związków wyłonioną w toku badań są helikaty srebra(I) i miedzi(I). Helikaty to związki kompleksowe o budowie analogicznej do naturalnie występującej helisy DNA. Od roku 1987, gdy zostało wprowadzone pojęcie helikatu [1], został otrzymany i scharakteryzowany szereg związków o takiej strukturze, jednakże temat ich właściwości biologicznych nie został jak dotąd wyczerpująco opisany. W ramach pracy doktorskiej badano także właściwości magnetyczne kompleksów żelaza(II) w poszukiwaniu nowych substratów do budowy nanoprzełączników opartych na zjawisku *spin crossover*. Jednocześnie poszukiwano efektywnych katalizatorów rozkładu materii organicznej wykorzystujących promieniowanie widzialne w procesie uzdatniania wody pitnej. Badania ponadto dotyczyły znaczenia struktury helikalnej kompleksów srebra(I) jako katalizatorów w procesie oczyszczania wody.

3. Omówienie wyników badań

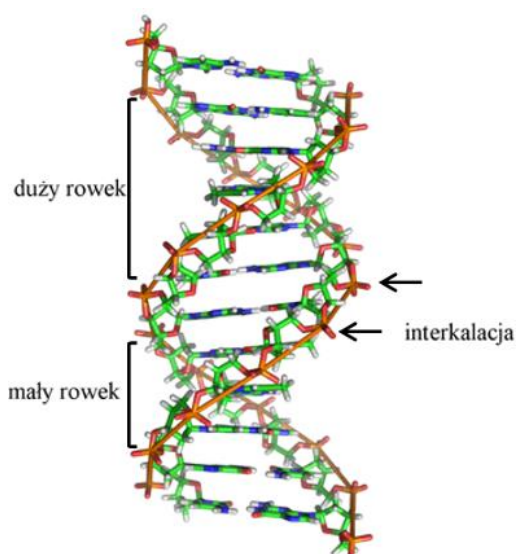
Związki kompleksowe wykazujące działanie antyproliferacyjne wobec komórek nowotworowych są zwane metaloterapeutykami. Zazwyczaj cechują się one wysokim powinowactwem do DNA, a największe triumfy wśród nich święci *cisplaty*na $\{[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]\}$ i jej pochodne [10]. *Cisplaty*na jest prolekiem i po wniknięciu do komórki ulega hydrolizie, tworząc bardziej aktywny kompleks $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)]^+$, który natychmiast tworzy addukty z DNA [11]. Te oddziaływania zmieniają drugorzędową strukturę DNA, inhibując transkrypcję i replikację. Oksaliplatyna i karboplatyna to pochodne *cisplaty*ny, które również są cytostatykami aktualnie stosowanymi w medycynie, jednak w ich cząsteczki włączono ligandy organiczne (Rysunek 6).



Rysunek 6 Wzory strukturalne (a) *cisplaty*ny; (b) oksaliplatyny; (c) karboplatyny.

Problemem opisywanych leków przeciwnowotworowych jest oporność niektórych typów komórek na nie oraz poważne efekty uboczne wynikające z ich stosowania [10], dlatego też poszukiwanie nowych klas metaloterapeutyków cieszy się niegasnącym zainteresowaniem. W najnowszych badaniach brane są pod uwagę inne jony metali, takie jak srebro(I), miedź(I) czy wanad(IV/V) [12-14]. Właściwości helikatów srebra(I) oraz miedzi(I) w komórkach nie zostały dotąd wyczerpująco opisane w literaturze, dlatego był to jeden z celów tejże rozprawy doktorskiej. Podobnie tematyka aktywności cytotoksycznej kompleksów wanadu(IV/V) z terpirydyną wymagała bardziej szczegółowej eksploracji.

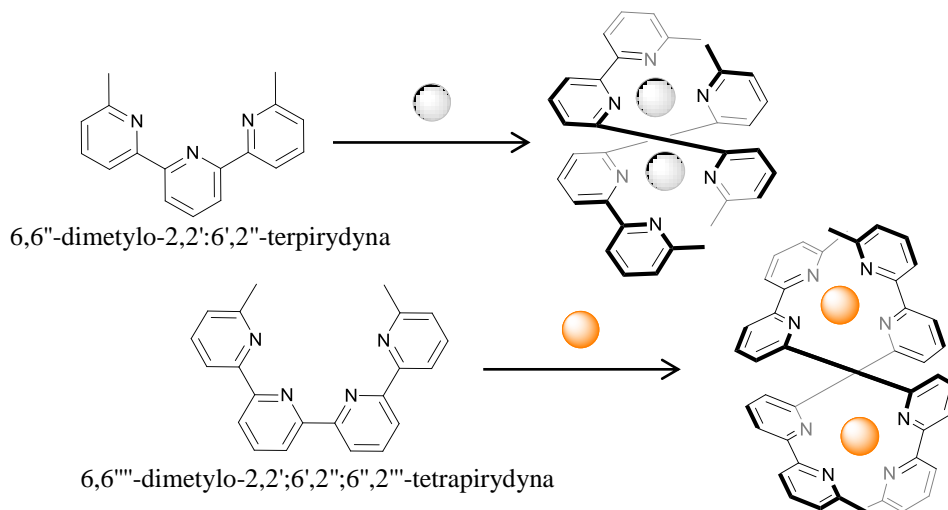
Istotą badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej było także badanie natury oddziaływań cząsteczek chemicznych z niemi DNA. Helisa DNA



Rysunek 7 Fragment helisy B-DNA (pełen obrót).

występuje w przyrodzie najczęściej w trzech postaciach: lewoskrętnego Z-DNA oraz prawoskrętnych A- i B-DNA, z czego ostatnia jest uważana za najpopularniejszą (Rysunek 7). Na jeden skręt helisy typu B przypada 10,4 pary zasad [15], można wyróżnić w niej dwa rowki – mały i duży. I tak, cząsteczki mogą oddziaływać z DNA na co najmniej pięć różnych sposobów: kowalencyjne wiązanie do nukleotydów, interkalację (wsuwanie się pomiędzy pary zasad), wiązanie w dużym lub małym rowku oraz oddziaływania elektrostatyczne na powierzchni DNA ze szkieletem cukrowo-fosforanowym [16]. Możliwa jest także hydroliza wiązania fosfodiesterowego w przypadku nukleaz, czego skutkiem jest cięcie pojedynczej lub obu nici DNA na krótsze fragmenty [17].

Chemiczna inertność ligandów polipirydynowych w warunkach wewnątrzkomórkowych oraz brak aktywności cytotoksycznej posłużyła za punkt startowy do zaprojektowania nowych helikalnych związków kompleksowych [18, 19]. W tym przypadku ligand polipirydynowy pełni funkcję nośnika informacji strukturalnej i umożliwia tworzenie podwójnych helikatów dwucentrowych z jonami metali o tetraedrycznych preferencjach koordynacyjnych, czyli z Ag^+ oraz Cu^+ (Rysunek 8).



Rysunek 8 Schematyczna prezentacja tworzenia helikatów. - jony Ag^+ ; - jony Ag^+ lub Cu^+ . Przedstawione struktury są poglądowe, przeciwjony nie zostały uwzględnione dla przejrzystości zapisu (Struktury krystaliczne są szczegółowo opisane w [18, 19]).

Zamknięcie jonów metali w helikatach skutkuje zwiększeniem objętości kationów, co ma znaczący wpływ na ich aktywność w komórkach. Przede wszystkim owocuje

to zmniejszeniem działania cytotoksycznego samych metali, ponieważ są one ciasno otoczone przez skoordynowane cząsteczki ligandów – w takiej formie interferencje z enzymami obecnymi w komórkach lub włączanie do szlaków metabolicznych są utrudnione. Za pomocą spektroskopii ^1H NMR potwierdzono, że helikaty są trwałe w medium stosowanym w badaniach biologicznych, czyli w 2% roztworze DMSO w wodzie.

Dwie pierwsze publikacje w cyklu stanowiącym niniejszą rozprawę doktorską [18, 19] eksplorują temat możliwego mechanizmu działania cytotoksycznego helikatów oligopirydynowych srebra(I) i miedzi(I) (Rysunek 6) w cytozolu. Trzecia publikacja w cyklu [20] traktuje o aktywności biologicznej monordzeniowych kompleksów wanadu (VO^{2+} oraz VO_2^+) z ligandem terpirydynowym. W tym celu w pierwszym etapie oceniana była aktywność cytotoksyczna kompleksów za pomocą testu MTT. Następnie, wykorzystując szereg metod spektroskopowych, za cel postawiono charakterystykę modelu oddziaływań związków w komórkach.

Test MTT opiera się na wykorzystaniu barwnej reakcji, w której substratem jest bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylotetrazolu (MTT). Ta żółta, dobrze rozpuszczalna w wodnym medium sól ulega redukcji w żywych komórkach pod wpływem działania oksydoreduktazy NAD(P)H. Produktem tej reakcji są fioletowe kryształy formazanu, które są łatwo rozpuszczalne w DMSO. Ocena aktywności cytotoksycznej opiera się na pomiarach absorpcji promieniowania przez roztwory, w których komórki były inkubowane ze związkami oraz z MTT [21]. Z otrzymanych danych dla każdego związku została obliczona wartość IC_{50} , która opisuje stężenie inhibujące namnażanie komórek w 50%.

Przedmiotem pierwszej publikacji cyklu [18] są cztery helikaty srebra(I): $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1), $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2(\text{O}-\text{NO}_2)](\text{NO}_3)$ (2), $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{BF}_4)_2$ (3) oraz $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (4). Powstały one w wyniku samoorganizacji liganda terpirydynowego z solami srebra w stosunku molowym 1:1 w acetonitrylu. W toku testu MTT ustalono wartości IC_{50} dla wszystkich czterech związków kompleksowych wobec trzech nowotworowych linii komórkowych: T47D (rak piersi), HeLa (rak szyjki macicy) i A-549 (rak płuc) oraz jednej zdrowej linii komórkowej HEK-293T (embrionalne komórki nerki). Test na zdrowej linii komórkowej został przeprowadzony dla sprawdzenia selektywności badanych związków wobec komórek nowotworowych.

W badanym zakresie stężeń (0-100 μM) komórki T47D oraz A-549 są *cisplaty*nooporne. Średnie wartości IC_{50} dla komórek T47D oraz HeLa wynoszą średnio odpowiednio 10,82

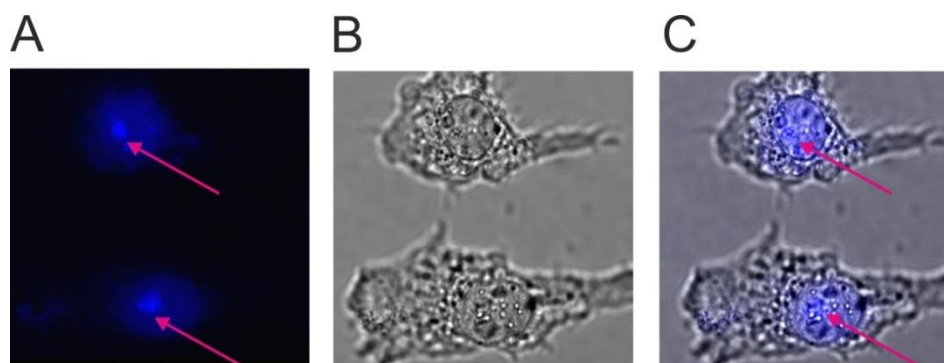
oraz 33,78 μM . Helikaty $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) oraz $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (4) nie hamują namnażania komórek A-549 w badanym zakresie stężeń (średnie $\text{IC}_{50} = 65,10 \mu\text{M}$). Związki $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) i $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{BF}_4)_2$ (3) najefektywniej inhibują wzrost komórek raka piersi (IC_{50} odpowiednio 4,6 i 6,8 μM), co jest szczególnie ważne w obliczu *cisplaty*nooporności tych komórek. Helikaty $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2(\text{O-NO}_2)](\text{NO}_3)$ (2) oraz $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (4) wykazują osłabiony efekt cytotoksyczny wobec komórek HeLa w porównaniu z *cisplaty*ną (IC_{50} odpowiednio 26,6; 73,2 i 23,5 μM). Komórki raka płuc (A-549) są najbardziej podatne na działanie antyproliferacyjne kompleksu $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{BF}_4)_2$ (3) ($\text{IC}_{50} = 38,64 \mu\text{M}$), podczas gdy helikat $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2(\text{O-NO}_2)](\text{NO}_3)$ (2) wykazuje ponad dwukrotnie słabsze działanie ($\text{IC}_{50} = 91,6 \mu\text{M}$). Co ciekawe, zdrowe komórki HEK-293T wykazują umiarkowaną do dobrej oporności na helikaty $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) oraz $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2(\text{O-NO}_2)](\text{NO}_3)$ (2) (IC_{50} wynosi odpowiednio 79,3 i $>100 \mu\text{M}$). Wobec *cisplaty*nooporności komórek T47D oraz ich podatności na działanie kompleksów $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) i $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2(\text{O-NO}_2)](\text{NO}_3)$ (2) stanowią one dobry punkt startowy do zaprojektowania nowych helikatów o zwiększonej selektywności antyproliferacyjnej względem komórek nowotworowych. Ligand terpirydynowy nie wykazuje aktywności cytotoksycznej w badanym zakresie stężeń, a helikalne związki kompleksowe srebra wykazują taką aktywność na poziomie mikromolarnym. Wyniki zostały przedstawione poniżej w **Tabeli 1**.

Tabela 1 Stężenie inhibujące namnażanie komórek w 50% - IC_{50} [μM].

Związki	Linie komórkowe			
	T47D rak piersi	HeLa rak szyjki macicy	A-549 rak płuc	HEK-293T embrionalne komórki nerki
tpy	>100	>100	>100	>100
$[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1)	4,6	16,6	>100	79,3
$[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2(\text{O-NO}_2)](\text{NO}_3)$ (2)	16,6	26,6	91,6	>100
$[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{BF}_4)_2$ (3)	6,8	18,7	38,6	43,2
$[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (4)	15,3	73,2	>100	69,2
<i>cisplaty</i> na	>100	23,5	>100	>100

Różnice w wartościach IC_{50} pomiędzy badanymi helikatami, pomimo ich jednorodności strukturalnej w roztworze, mogą być spowodowane zawartością różnych przeciwjonów. Najprawdopodobniej ma to wpływ na przenikalność helikatów przez błony komórkowe.

Dalsza część pracy doświadczalnej została skupiona na badaniach możliwego mechanizmu działania cytotoksycznego helikatu w komórkach. W tym celu przeprowadzono eksperyment wizualizacji kompleksów w komórkach eukariotycznych za pomocą mikroskopu konfokalnego. Mikroskopia ta wykorzystuje właściwości emisyjne związków pod wpływem naświetlania promieniowaniem o długości fali wzbudzenia emisji (λ_{wzb}) (w tym eksperymencie wykorzystano kanał wzbudzenia/emisji DAPI). Dużym sukcesem była wizualizacja helikatu $[Ag_2(tpy)_2](OTf)_2$ (1) w komórkach HeLa, ponieważ pokazano selektywną migrację kompleksów do jądra komórkowego. Można zauważyć zwielowrotną akumulację związków w obszarze jąder (Rysunek 9). Otrzymane wyniki obrazowania mogą tłumaczyć zwiększoną aktywność antyproliferacyjną helikatu $[Ag_2(tpy)_2](OTf)_2$ (1) wobec komórek HeLa. Komórki nowotworowe cechują się przyspieszoną proliferacją (w porównaniu do zdrowych komórek), co za tym idzie zawierają większą liczbę jąder (ze względu na intensywną mitozę), do których selektywnie trafia badany helikat [22].



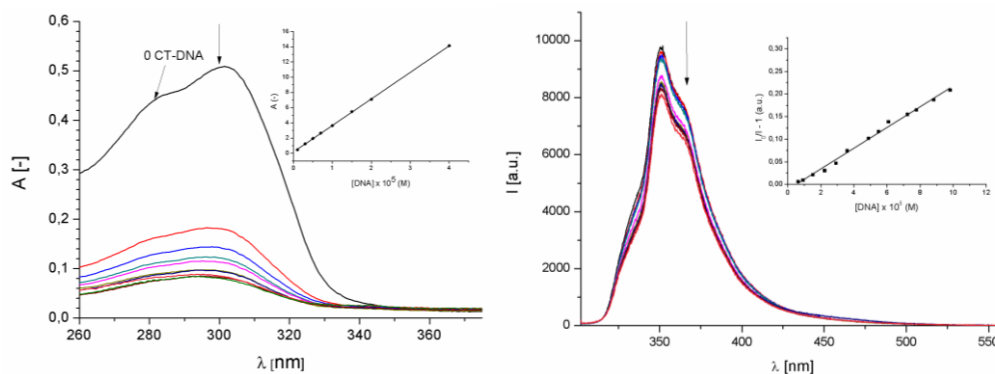
Rysunek 9 Biodystrybucja kompleksu $[Ag_2(tpy)_2](OTf)_2$ (1) widziana w mikroskopie konfokalnym. (A) Jądro komórkowe znakowane niebieską emisją helikatu. (B) Obraz w świetle widzialnym. (C) Nałożone obrazy A i B. Kompleks $[Ag_2(tpy)_2](OTf)_2$ (1) trafia selektywnie do jądra komórkowego i akumuluje się w jąderkach (wskazane różowymi strzałkami).

Otrzymane informacje stanowią ważną wskazówkę w procesie projektowania nowych metaloterapeutyków. Zobrazowanie helikatów trafiających selektywnie do jądra komórkowego sugeruje DNA-zależny mechanizm działania. Do roku 2014 tylko w grupie Rigobello dokonano wizualizacji kompleksu srebra(I) akumulującego się w jądrze komórkowym [23], jednak w publikacji [18] zaprezentowano pierwszy przykład selektywnego targetowania helikatów srebra(I) w komórkach.

Celem potwierdzenia oddziaływania związków kompleksowych z DNA oraz zbadania sposobu tych interakcji przeprowadzono szereg miareczkowań spektrofotometrycznych, w których wykorzystano helikat $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1).

Pierwszą z zastosowanych metod było miareczkowanie roztworu kompleksu $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) o stałym stężeniu ($c_{1a} = 2 \times 10^{-5}$ M) roztworem CT-DNA (*calf thymus DNA*) [24]. Uzyskane widmo cechuje się silnym pasmem absorpcji przy długości fali $\lambda_{\text{abs}} = 301,5$ nm, którego intensywność maleje o około 75% ($c_{\text{max CT-DNA}} = 100$ μM) podczas zwiększania stężenia CT-DNA (Rysunek 10). Stała wiązania wynosi $K_w = 1,9 \times 10^6$ M^{-1} i jest zbliżona do stałej wiązania EtBr ($K_w = 1,4 \times 10^6$ M^{-1}). Hipochromizm kolejnych widm dowodzi, że badany związek oddziałuje z DNA, a jego wolna forma znika z roztworu na skutek tej interakcji [25].

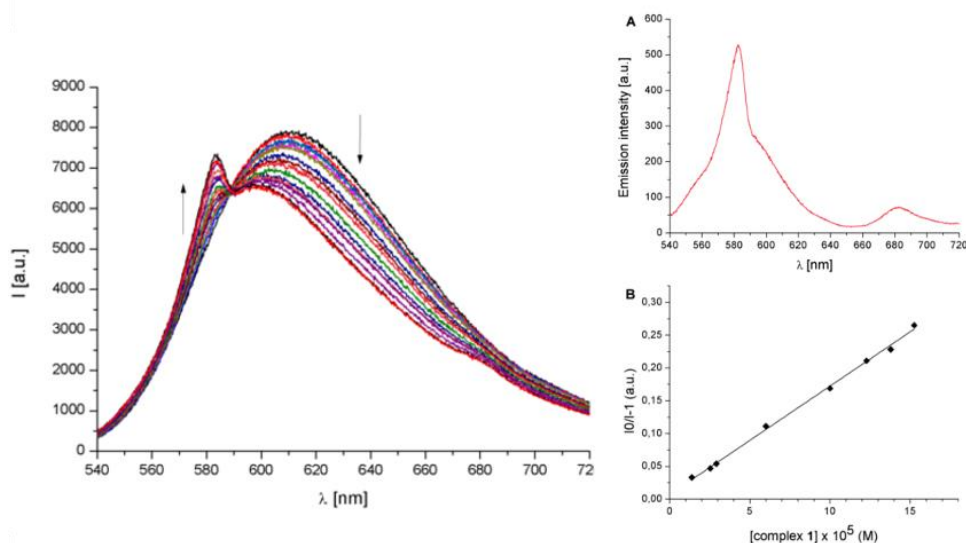
Wykorzystując właściwości emisyjne kompleksu możliwe było sprawdzenie jego zdolności do oddziaływania z CT-DNA także w niższych stężeniach ($c_1 = 4 \times 10^{-6}$). Do tej pory nie przeprowadzono podobnych eksperymentów z helikatami srebra(I). W tym celu monitorowano zmiany w paśmie emisji $\lambda_{\text{em}} = 352$ nm kompleksu ($\lambda_{\text{wzb}} = 290$ nm) w obecności zwiększającego się stężenia CT-DNA ($c_{\text{max CT-DNA}} = 100$ μM). Intensywność pasma w kolejnych widmach spada, co prawdopodobnie jest spowodowane utratą warstwy solwatacyjnej helikatu na skutek oddziaływania CT-DNA (Rysunek 10), a stała wygaszania wynosi $K_{\text{SV}} = 2,29 \times 10^4$ M^{-1} , stąd wniosek, że helikat $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) interaguje z CT-DNA już w bardzo niskich stężeniach z umiarkowaną siłą.



Rysunek 10 (po lewej) Miareczkowanie spektrofotometryczne kompleksu $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) roztworem CT-DNA ($c_{\text{CT-DNA}} = 0 - 100 \mu\text{M}$; $c_{1a} = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$); strzałki pokazują kierunek zmian hipochromowych w widmach. **Suplement:** zależność $[\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$. **(po prawej)** Widmo emisji kompleksu $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) w zwiększającym się stężeniu CT-DNA ($c_{\text{CT-DNA}} = 0 - 100 \mu\text{M}$; $c_1 = 4 \times 10^{-6} \text{ M}$); strzałki pokazują kierunek zmian. **Suplement:** zależność Sterna-Volmera $I^0/I-1$ versus $[\text{DNA}]$.

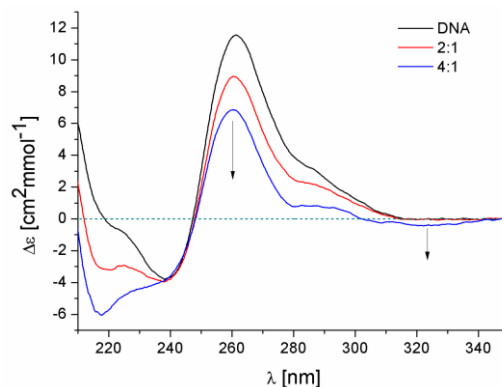
W celu uzyskania dokładniejszych informacji na temat sposobu oddziaływania helikatu $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) z CT-DNA przeprowadzono miareczkowanie fluorescencyjne, wykorzystując właściwości emisyjne kompleksu bromku etydyny (EtBr) z CT-DNA. EtBr jest słabym związkiem emisyjnym, który wiążąc się na sposób interkalacji z CT-DNA, tworzy kompleks EtBr – CT-DNA. Jest to silna interakcja, która powstaje na skutek oddziaływań pomiędzy płaskim pierścieniem fenantrydyny a pierścieniami aromatycznymi par zasad w DNA. Ów kompleks cechuje intensywne pasmo emisji przy $\lambda_{\text{em}} \sim 610 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{wzb}} = 467 \text{ nm}$). Wypieranie EtBr z kompleksu EtBr – CT-DNA przez inny związek powoduje spadek intensywności pasma analitycznego [26]. Jeśli zmiana jest znaczna, to można założyć, że związek wprowadzony do mieszaniny konkurencyjnie interkaluje CT-DNA w miejsce EtBr.

Podobny efekt zaobserwowano w przypadku kompleksu $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) (Rysunek 11). Co więcej, w miarę zwiększania stężenia nowego kompleksu helikat 1 – CT-DNA formuje się nowe pasmo emisji przy $\lambda_{\text{em}} \sim 580 \text{ nm}$ charakterystyczne dla tego indywidualu. Stanowi to wyraźny dowód, że cząsteczki EtBr są stopniowo wypierane spośród par zasad i zastępowane przez cząsteczki helikatu $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1). Stała wygaszania $K_{\text{SV}} = 1,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ i pokrywa się ona ze stałą wygaszania w miareczkowaniu fluorescencyjnym oraz innych kompleksów srebra [26].



Rysunek 11 Widmo emisyjne EtBr związanego z CT-DNA w obecności wzrastającego stężenia kompleksu $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1). **Suplement A:** widmo emisji kompleksu helikat 1 – CT-DNA ($[\text{1}] = 50 \mu\text{M}$, $[\text{CT DNA}] = 26 \mu\text{M}$). **Suplement B:** zależność Sterna-Volmera $I^0/I-1$ versus $[\text{DNA}]$ dla miareczkowania kompleksu EtBr – CT-DNA.

Ostatnią z metod wykorzystanych podczas badań jest spektroskopia dichroizmu kołowego (CD). Jest to czuła i precyzyjna metoda, która dostarcza ważnych informacji na temat zmian konformacyjnych w helisie DNA. Widmo CD B-DNA posiada dwa charakterystyczne pasma związane z helikalnością – ujemne przy $\sim 245 \text{ nm}$ oraz dodatnie przy $\sim 275 \text{ nm}$. Wiązanie w rowkach lub elektrostatyczne na powierzchni helisy nie powodują znacznych zmian w widmie, natomiast interkalacja może wyraźnie wpływać na jego kształt [27]. W tym eksperymencie wykorzystano



Rysunek 12 Widma CD oligomeru $d(\text{CCCCCGGGGG})$ bez i w obecności helikatu 1a. Strzałki wskazują kierunek zmian pod wpływem zwiększającego się stężenia helikatu.

oligomer DNA $d(\text{CCCCCGGGGG})$, którego widmo CD zarejestrowano bez i w obecności helikatu $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) w stosunkach molowych helikat : oligomer 2:1 i 4:1. Początkowe widmo CD oligomeru uległo wyraźnej zmianie podczas dodawania związku kompleksowego (Rysunek 12). Ta modyfikacja wynika ze zmian konformacyjnych helisy DNA, ponieważ helikat $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1a) jest achiralny i samodzielnie nie generuje

nowych pasm w widmie. Pasma charakterystyczne przy ~ 265 nm uległo nieznacznemu przesunięciu hipsochromowemu oraz zmniejszyła się jego intensywność. Zaobserwowano dodatkowe ujemne pasmo w zakresie 315-340 nm, którego intensywność wzrasta przy wyższych stężeniach helikatu. Przypuszczalnie jest to spowodowane dostarczeniem dodatkowego chromofora związanego z helisą oligomeru. Podobne wyniki zostały otrzymane dla innych interkalatorów DNA [28].

Podsumowując część opierającą się na badaniach spektroskopowych, można wyciągnąć wniosek o wysokim powinowactwie helikatu $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) do helisy DNA. Najbardziej prawdopodobny mechanizm opiera się na zdolności interkalacyjnej kompleksu pomiędzy parami zasad DNA.

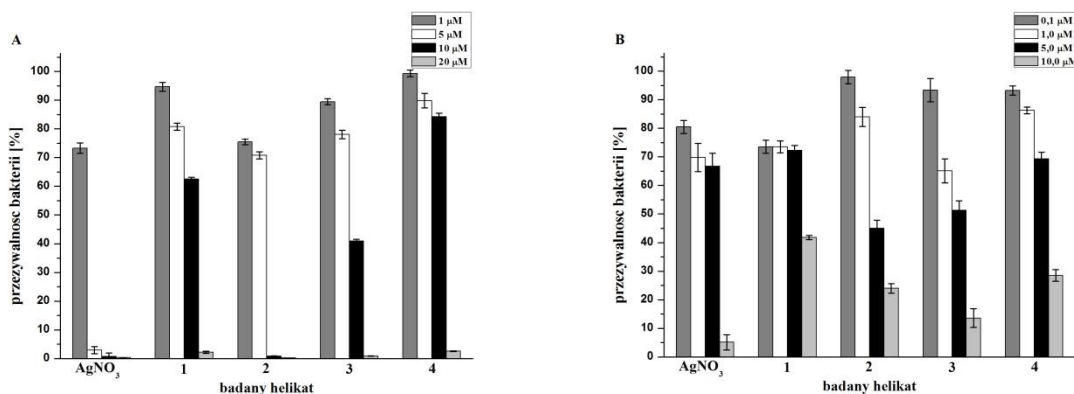
Związki srebra są także wykorzystywane jako bakteriostryki, dlatego została sprawdzona zdolność helikatów 1-4 do hamowania namnażania bakterii szczepów: Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* i Gram-ujemnych *Escherichia coli*. Oba szczepy są odpowiedzialne między innymi za ciężkie zakażenia szpitalne takie jak sepsa i bakteremia [29, 30]. Eksperymenty przeprowadzono w medium wodnym, inkubacja trwała 4 h. Wszystkie testowane związki kompleksowe hamowały namnażanie badanych bakterii (Tabela 2, Rysunek 13).

Tabela 2 Wartości MIC_{50} [$\mu\text{M Ag}^+$] dla helikalnych kompleksów Ag(I) z ligandem tpy po 4 h inkubacji ze szczepami *E. coli* oraz *S. aureus*.

Związki	Szczepy bakteryjne	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
AgNO_3	2,17	6,63
$[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1)	12,21	8,77
$[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2(\text{O-NO}_2)](\text{NO}_3)$ (2)	6,39	4,19
$[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{BF}_4)_2$ (3)	8,58	5,22
$[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (4)	14,48	7,48

Średnia wartość parametru $\text{MIC}_{50} = 6,42 \mu\text{M}$ dla *S. aureus* i $10,42 \mu\text{M}$ dla *E. coli*. W porównaniu z aktywnością azotan(V) srebra, który został wybrany jako referent, kompleksy $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2(\text{O-NO}_2)](\text{NO}_3)$ (2) i $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{BF}_4)_2$ (3) wykazują wyższą aktywność względem bakterii *S. aureus* (odpowiednio 6,63; 4,19 oraz 5,22 μM). Helikat $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2(\text{O-NO}_2)](\text{NO}_3)$ (2) najintensywniej hamuje także namnażanie bakterii *E. coli*, jednak w mniejszym stopniu niż referent – azotan(V) srebra (odpowiednio 6,39 i 2,17 μM).

Helikaty $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) i $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (4) wykazują umiarkowaną aktywność bakteriostatyczną wobec obu szczepów.



Rysunek 13 Przeżywalność bakterii w obecności zwiększających stężeń helikatów 1-4; (a) *E. coli*; (b) *S. aureus*.

Według teorii chelatacyjnej Tweedy'ego pozytywny ładunek chelatów jest częściowo zredukowany poprzez delokalizację elektronów π w całej objętości kompleksu. Zwiększa to ich charakter lipofilowy w porównaniu do niechelatowanych jonów i ułatwia penetrację przez bakteryjne błony komórkowe. Dzięki temu mogą efektywniej migrować i szybciej blokować na przykład miejsca wiążące metale w enzymach, co skutkuje zahamowaniem wzrostu bakterii [31, 32]. Źródło aktywności bakteriostatycznej związków srebra(I) nie jest do końca poznane, jednak można zaobserwować pewne tendencje – na przykład bardziej złożona struktura ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych ogranicza transport cząsteczek w poprzek [33]. Jony Ag^+ mają duże powinowactwo do grup tiolowych i to również może powodować pogorszenie funkcji komórkowych. Inną z możliwości jest to, że jony Ag^+ wymuszają kondensację DNA, co hamuje namnażanie komórek przez zatrzymanie replikacji jako mechanizm obronny przed denaturacją [34].

Kolejna publikacja cyklu [19] dalej eksploruje temat aktywności helikatów w komórkach. Badania jednak dotyczą helikatów tetrapirydyny (Rysunek 8). Rozmiar takiego kationu zwiększa się w porównaniu do kationu helikatu z tpy. Zmiana ta może powodować znaczące różnice w aktywności związków w komórkach. Podobnie, jak w przypadku terpirydyny, wykorzystano sole srebra(I) w celu otrzymania helikatów $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (1) i $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{PF}_6)_2$ (2), ale również rozszerzono badania na kompleksy miedzi(I): $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (3) oraz $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{BF}_4)_2$ (4). Zastosowanie innego metalu nie miało

na celu zmiany struktury helikatów, a modyfikację ich właściwości biologicznych. Potencjał oksydoredukcyjny Cu^+ jest akceptowalny *in vivo*, jon wchodzi w skład metaloenzymów, takich jak katalaza czy oksydaza cytochromu c [10]. Jony Cu^+ wprowadzone samodzielnie są toksyczne dla organizmów, jednak zastosowanie ich w formie większych kationów może tę sytuację zmienić. Jak dotąd podobne badania nie były prowadzone dla helikatów z ligandem tetrapirydynowym, dlatego stały się one kolejnym etapem niniejszej rozprawy doktorskiej.

Pierwszym etapem prac była ocena aktywności antyproliferacyjnej i obliczenie parametrów IC_{50} przedstawionych helikatów przy użyciu testu MTT na dwóch nowotworowych liniach komórkowych: T47D oraz HeLa oraz zdrowej linii HaCaT (fibroblasty). Tabela 3 podsumowuje otrzymane wyniki.

Tabela 3 Stężenie inhibujące namnażanie komórek w 50% - IC_{50} [μM].

Związki	Linie komórkowe		
	T47D rak piersi	HeLa rak szyjki macicy	HaCaT fibroblasty
qtp	>100	>100	>100
$[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (1)	$17,6 \pm 0,3$	$48,1 \pm 0,4$	$37,3 \pm 0,2$
$[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{PF}_6)_2$ (2)	$10,8 \pm 0,2$	$18,4 \pm 0,3$	$13,5 \pm 0,3$
$[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (3)	$44,2 \pm 0,4$	$51,7 \pm 0,1$	$49,5 \pm 0,2$
$[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{BF}_4)_2$ (4)	$62,2 \pm 0,2$	$33,3 \pm 0,2$	$36,0 \pm 0,1$
<i>cisplatylna</i>	>100	$23,5 \pm 2,8$	>100

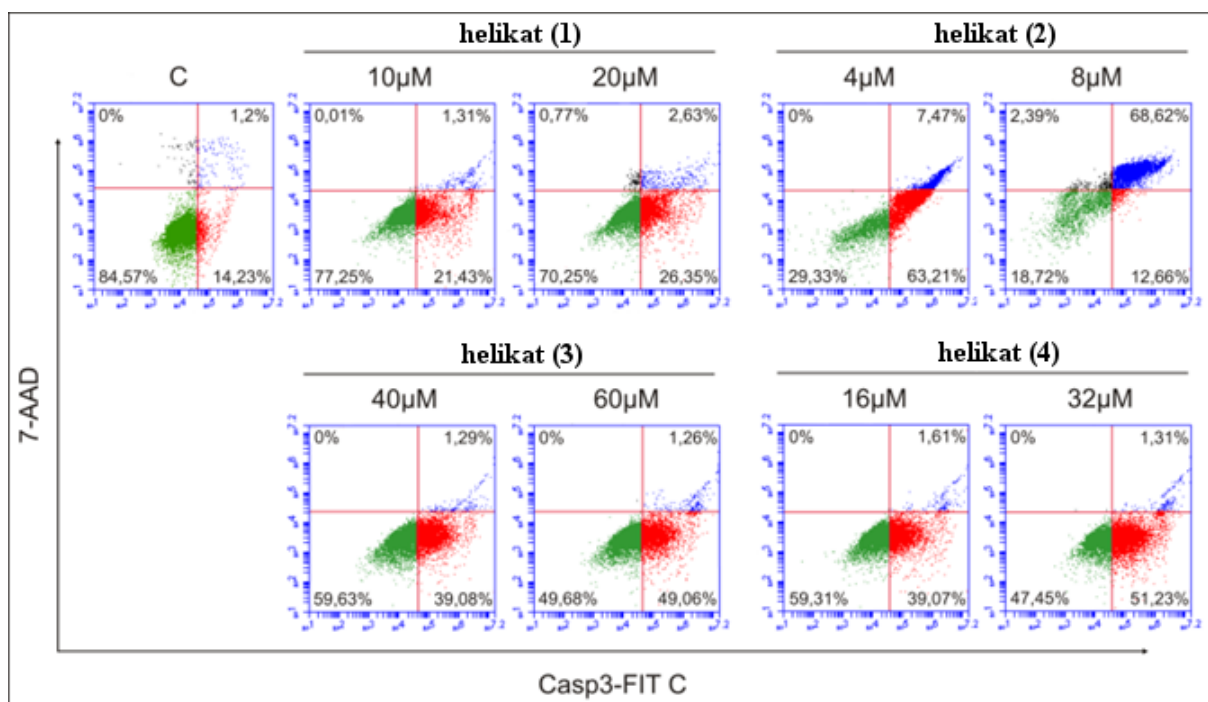
Zaobserwowano, iż helikaty srebra(I) są prawie dwukrotnie bardziej toksyczne dla badanych linii komórkowych, aniżeli helikaty miedzi(I) (średnie wartości współczynników IC_{50} to odpowiednio 23,7 i 49,2 μM) – dokładniej kompleks $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{PF}_6)_2$ (1) wykazuje najsilniejszy efekt (średnia wartość $\text{IC}_{50} = 14,2 \mu\text{M}$), a $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (3) najslabszy (średnia wartość $\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{M}$).

Zwiększenie objętości kationu kompleksu ma wpływ na jego aktywność cytotoksyczną. Mniejszy helikat $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) [18] wykazuje około 3-4 razy silniejsze działanie hamujące namnażanie komórek w porównaniu do homologicznego $[\text{Ag}_2(\text{qpy})_2](\text{OTf})_2$ (1) [19]. Prawdopodobnie powiększanie kationu helikatu ma negatywny wpływ na jego przepuszczalność przez błony komórkowe.

Helikaty będące przedmiotem badań w omawianej pracy [19] nie wykazały zadowalającej selektywności komórki zdrowe *versus* nowotworowe, jednak nadrzędną intencją było porównanie mechanizmu działania helikatów srebra(I) i miedzi(I). W tym celu oprócz

wybranych badań spektroskopowych przeprowadzono także eksperymenty cytometrii przepływowej. Metoda ta bada przebieg cyklu komórkowego na podstawie pomiaru zawartości DNA w komórkach. Wszelkie interferencje cyklu komórkowego obserwowane za pomocą tej metody są DNA-zależne [35]. Trafny dobór barwników umożliwia rozróżnienie mechanizmu pomiędzy nekrozą a apoptozą komórek. Apoptoza to proces naturalnej śmierci zdrowych lub uszkodzonych komórek, natomiast nekroza to śmierć komórek wskutek działania czynników zewnętrznych [10].

Otrzymano bardzo interesujące wyniki dla badanych helikatów. Wszystkie cztery interferują z cyklem komórkowym w sposób DNA-zależny, jednak wyraźne różnice rysują się pomiędzy działaniem helikatów ze srebrem(I) i miedzią(I) (Rysunek 14).



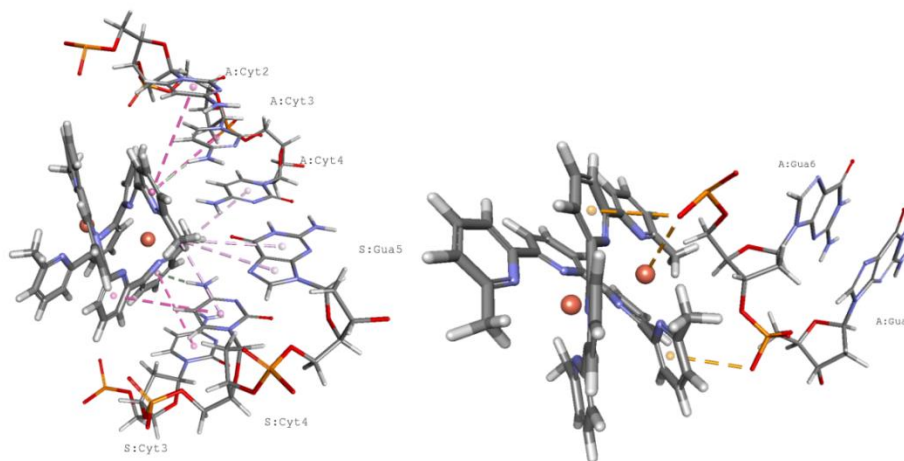
Rysunek 14 Analiza zakłóceń cyklu komórkowego komórek HeLa w obecności helikatów 1-4 za pomocą cytometrii przepływowej. Dolna lewa ćwiartka: żywe, niezabarwione komórki; dolna prawa ćwiartka: komórki, które uległy apoptozie (znakowane Casp 3/7 FITC); górna prawa ćwiartka: komórki zdeintegrowane w wyniku nekrozy znakowane barwnikiem 7-AAD; C – kontrola.

Helikaty $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (1) oraz $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{PF}_6)_2$ (2) powodują nekrozę komórek HeLa. Kompleks $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{PF}_6)_2$ (2) już w niskich stężeniach, rzędu 4 μM, generuje nekrozę blisko 70% komórek. Inny efekt jest obserwowany w przypadku helikatów $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (3) i $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{BF}_4)_2$ (4). Traktowane nimi komórki ulegają głównie

apoptozie (około 40-50%), czyli procesowi naturalnej śmierci komórki. Zjawisko to można wyjaśniać naturą redoks jonów Cu^+ , dzięki której mogą one swobodnie interferować z cyklem komórkowym. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego w świetle widzialnym pokazują dewastacyjne działanie kompleksów srebra(I) na komórki i postępującą nekrozę w porównaniu do helikatów miedzi(I).

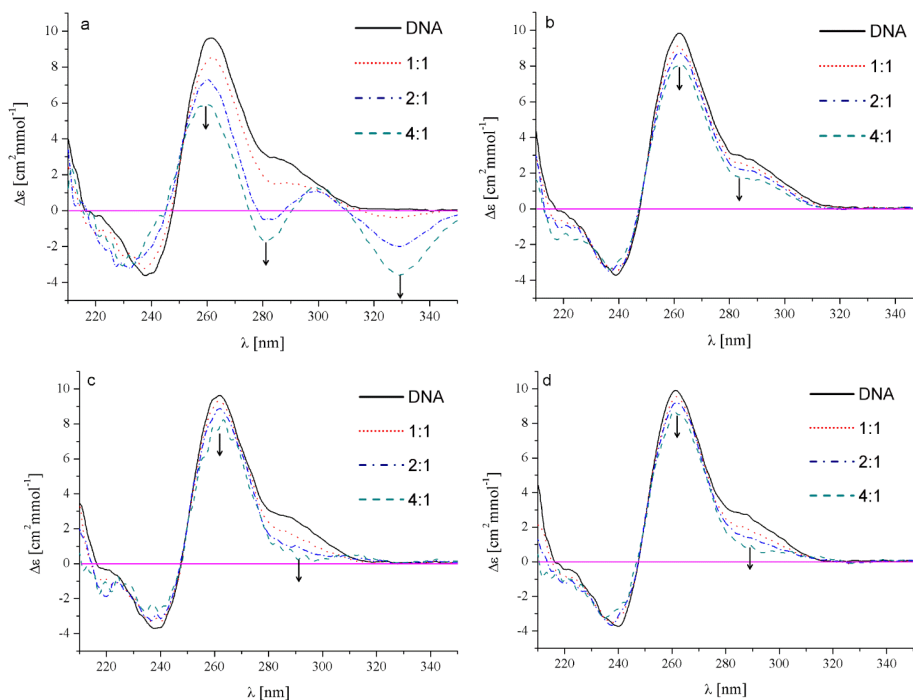
Kolejnym etapem było zbadanie sposobu oddziaływania helikatów z DNA. W tym celu posłużono się metodą dichrozimu kołowego (CD) oraz miareczkowania fluorescencyjnego z EtBr i topnienia DNA, przeprowadzono także obliczenia dokowania molekularnego.

Najbardziej korzystnym energetycznie oddziaływaniem helikatu $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (3) z oligomerem d(CCCCGGGG) jest wiązanie w małym rowku, natomiast kompleksu $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{BF}_4)_2$ (4) w dużym rowku. Oddziaływania hydrofobowe tetrapirydyny z pierścieniami aromatycznymi zasad stabilizują dokowanie w dużym rowku, a w małym siły van der Waalsa i oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy jonami Cu^+ i szkieletem fosforanowym (Rysunek 15). Ze względu na ograniczenia programowe obliczenia zostały przeprowadzone tylko dla kompleksów miedzi(I).



Rysunek 15 (po lewej) Specyficzne stabilizujące oddziaływania helikatu $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (3) w dużym rowku DNA. (po prawej) Specyficzne stabilizujące oddziaływania helikatu $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{BF}_4)_2$ (4) w małym rowku DNA.

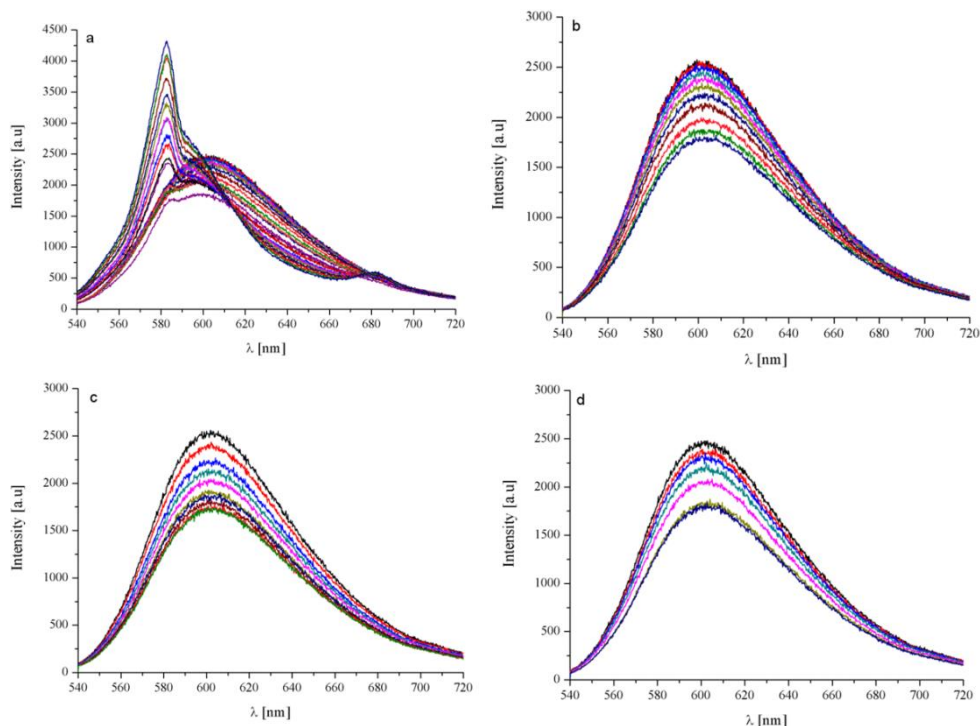
Miareczkowanie oligomeru d(CCCCGGGG) helikatami i monitorowanie zmian za pomocą CD przyniosło kolejne informacje na temat sposobu ich interakcji (Rysunek 16).



Rysunek 16 Widma CD oligomeru d(CCCCGGGG) bez i w obecności helikatów. (a) $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (1); (b) $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{PF}_6)_2$ (2); (c) $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (3); (d) $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{BF}_4)_2$ (4). Strzałki wskazują kierunek zmian pod wpływem zwiększającego się stężenia helikatów; $c_{\text{oligo}} = 10 \mu\text{M}$.

Widma helikatów 2-4 nie wykazują znaczących zmian w swojej strukturze, co wspiera koncepcję, że są wiązane w rowkach DNA i stabilizują helisę. Jedynie kompleks $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (1) zachowuje się inaczej i wywiera silny wpływ na budowę pasmową widm. Zaburzenia struktury helisy oligomeru spowodowały przesunięcie hipsochormowe obu pasm charakterystycznych o około 10 nm i pojawienie się dwóch nowych ujemnych pasm przy $\lambda \sim 280 \text{ nm}$ i $\sim 330 \text{ nm}$.

Eksperymentem uzupełniającym było fluorescencyjne miareczkowanie kompetencyjne kompleksu EtBr – CT-DNA. Rezultaty są widoczne na Rysunku 17.



Rysunek 17 Widma emisyjne EtBr związanego z CT-DNA w obecności wzrastającego stężenia helikatów: (a) $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (1); (b) $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{PF}_6)_2$ (2); (c) $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (3); (d) $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{BF}_4)_2$ (4).

Wszystkie helikaty powodują wygaszanie emisji, jednak nie przekracza ono 30% początkowej intensywności promieniowania (I^0), a dodatek kolejnych porcji roztworów helikatów nie wpływa na kształt widm. W takim przypadku jeśli stosunek stężeń $[\text{helikat}]/[\text{DNA}]$ jest niższy niż 100, to można postulować, że badane związki wiążą się w dużym lub małym rowku DNA i przez to w niewielkim stopniu wypierają EtBr spomiędzy par zasad. Stałe wygaszania tych kompleksów wynoszą odpowiednio $7,74 \times 10^5$, $2,44 \times 10^6$ i $2,80 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ dla helikatów $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{PF}_6)_2$ (2), $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (3) oraz $[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{BF}_4)_2$ (4). Podobnie jak w poprzednim eksperymencie kompleks $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (1) wykazał odmienne działanie, które można tłumaczyć jego bardzo wysokim powinowactwem do DNA.

Ostatnią metodą użytą w toku badań były eksperymenty topnienia krótkiego oligomeru DNA d(GGGGGGCCCCCC) w obecności badanych kompleksów. Ogrzewanie roztworu DNA prowadzi do wzrostu absorbancji przy $\lambda = 260 \text{ nm}$, co wiąże się z dysocjacją podwójnej helisy. Punkt przegięcia krzywej topnienia to temperatura topnienia (T_m) i jest ona powiązana

ze stabilnością termalną helisy. Oddziaływania stabilizujące strukturę drugorzędową DNA zwiększają T_m , a do takich oddziaływań należą interkalacja i wiązanie w rowkach. Wyniki uzyskane w toku badań (Tabela 4) wspierają koncepcję wiązania helikatów w rowkach i sugerują umiarkowaną siłę tych oddziaływań (średni wzrost T_m $\Delta T_m = 4,6^\circ\text{C}$) [36].

Tabela 4 Temperatry topnienia T_m d(GGGGGGCCCCCC) inkubowanego ze związkami kompleksowymi. T_m oligomeru wynosi $60,1^\circ\text{C}$.

Związki	$[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (2a)	$[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{PF}_6)_2$ (2b)	$[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (2c)	$[\text{Cu}_2(\text{qtp})_2](\text{BF}_4)_2$ (2d)
T_m [$^\circ\text{C}$]	65,9	65,1	62,7	66,1

Kolejna publikacja cyklu [20] bada tematykę biochemii związków kompleksowych wanadu. Występuje on w organizmach w śladowych ilościach jako składnik enzymów, w szczególności haloperoksydaz i nitrogenaz [37-39], a jego związki kompleksowe są potencjalnymi cytostatykami. Badania na ten temat prowadzą Gambino i Chakravarty, jednak dotąd nie zbadano pod tym kątem kompleksów 6,6''-dimetylo-2,2':6',2''-terpirydyny z jonom wanadylowym(IV) VO^{2+} i jonom oksowanadu(V) VO_2^+ . Omawiana praca przedstawia właściwości dwóch związków kompleksowych: $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{tpy})\text{Cl}_2]$ (1) oraz $[\text{V}^{\text{V}}\text{O}_2(\text{tpy})]_2\text{Br}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2). Różnice w stopniach utlenienia centrów metalicznych oraz aranżacja wokół nich mogą mieć wpływ na aktywność w komórkach. Aby zweryfikować tę hipotezę badawczą zbadano aktywność cytotoksyczną kompleksów w teście MTT, za pomocą cytometrii przepływowej oraz model oddziaływań z DNA za pomocą metod spektroskopowych.

Test MTT przeprowadzono na trzech nowotworowych liniach komórkowych: T47D, HeLa i A-549 oraz jednej zdrowej linii fibroblastów GM07492. Kompleks $[\text{VO}(\text{tpy})\text{Cl}_2]$ (1) hamuje wzrost wszystkich badanych linii komórkowych, najsilniej komórek T47D ($\text{IC}_{50} = 38,0 \pm 1,6 \mu\text{M}$), natomiast kompleks $[\text{VO}_2(\text{tpy})]_2\text{Br}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2) jest najbardziej aktywny wobec komórek HeLa ($\text{IC}_{50} = 33,2 \pm 0,9 \mu\text{M}$), będąc jednocześnie nieaktywnym wobec komórek linii A-549 (Tabela 5). Jednocześnie wobec zdrowych komórek fibroblastów IC_{50} wynosi $42,3 \pm 1,2 \mu\text{M}$ i jest o około $10 \mu\text{M}$ wyższe, niż dla komórek HeLa. Średnie wartości współczynnika IC_{50} dla komórek HeLa, T47D i GM07492 wynoszą odpowiednio: 38,0; 40,2 oraz 42,2 μM .

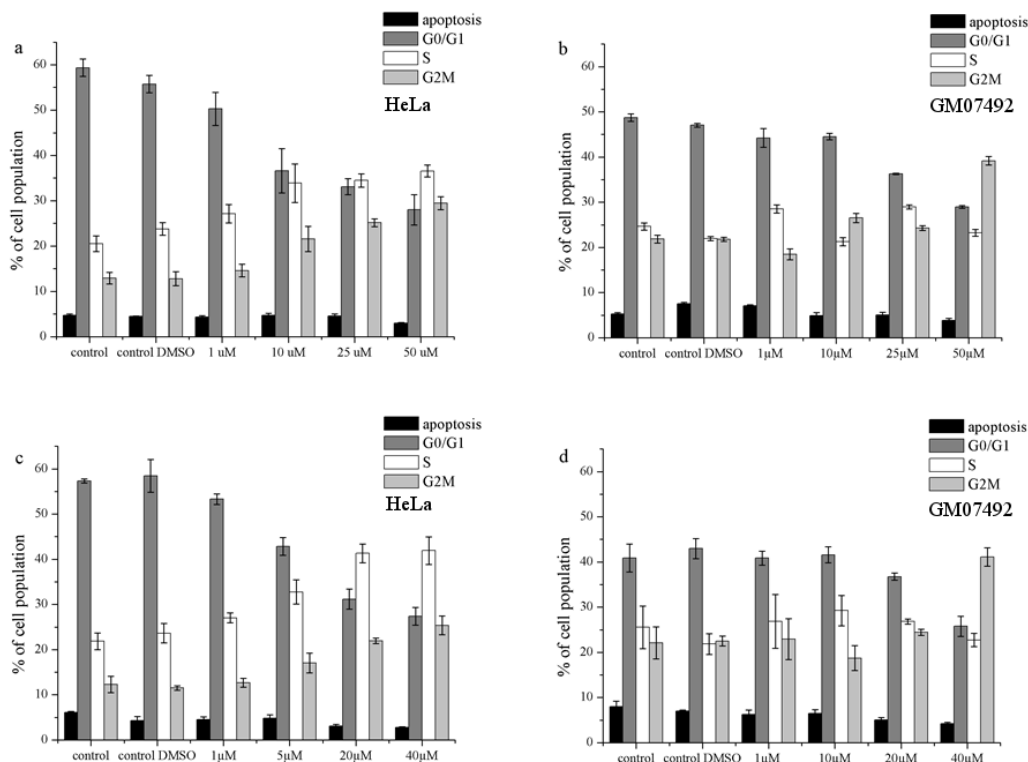
Tabela 5 Stężenie inhibitujące namnażanie komórek w 50% - IC₅₀ [μM]

Związki	Linie komórkowe			
	T47D rak piersi	HeLa rak szyjki macicy	A-549 rak płuc	GM07492 fibroblasty
tpy	>100	>100	>100	>100
[VO(tpy)Cl ₂] (1)	38,0 ± 1,6	42,9 ± 1,5	87,6 ± 2,4	42,0 ± 1,7
[VO ₂ (tpy)]Br·3.5H ₂ O (2)	42,3 ± 1,8	33,2 ± 0,9	>100	42,3 ± 1,2
<i>cis</i> platyna	>100	23,5 ± 2,8	>100	>100

Efekt cytotoksyczny liganda terpirydynowego jest niewidoczny w badanych zakresach stężeń, a nieorganiczne połączenia wanadu(IV/V), takie jak VOSO₄ czy NaVO₃, nie wykazują aktywności cytotoksycznych [40]. Stąd wniosek o tym, że jedynie jony wanadylowe(IV) i oksowanadu(V) skoordynowane przez organiczny ligand, w tym przypadku pochodną terpirydyny, są zdolne do hamowania wzrostu i namnażania komórek. Wszystkie badane związki są aktywne wobec komórek w mikromolowych stężeniach.

Przypuszczalnie aktywność cytotoksyczna może być powodowana przez reaktywne formy tlenu generowane przez związki kompleksowe wanadu(IV/V), które mogą zakłócać funkcjonowanie organeli komórkowych [41, 42], jednak by pełniej zrozumieć mechanizm posłużono się metodami spektroskopowymi oraz cytometrią przepływową.

Interferencje cyklu komórkowego generowane przez kompleksy V(IV/V) z terpirydynowym ligandem zbadano za pomocą cytometrii przepływowej na komórkach HeLa oraz GM07492 (Rysunek 18). Oba związki kompleksowe powodują areszt cyklu komórkowego w fazie G2M, jednak w nieco różny sposób. Kompleks [VO(tpy)Cl₂] (1) generuje areszt cyklu z podobną intensywnością w komórkach nowotworowych oraz zdrowych w korelacji ze stężeniem (Rysunek 18 a i b), natomiast [VO₂(tpy)]₂Br₂·3H₂O (2) wyraźnie wpływa na areszt zdrowych komórek w stężeniach zbliżonych do IC₅₀ (42,3 ± 1,2 μM), podczas gdy wzrost komórek nowotworowych jest silnie hamowany już przy stężeniu 5 μM (Rysunek 18 c i d).

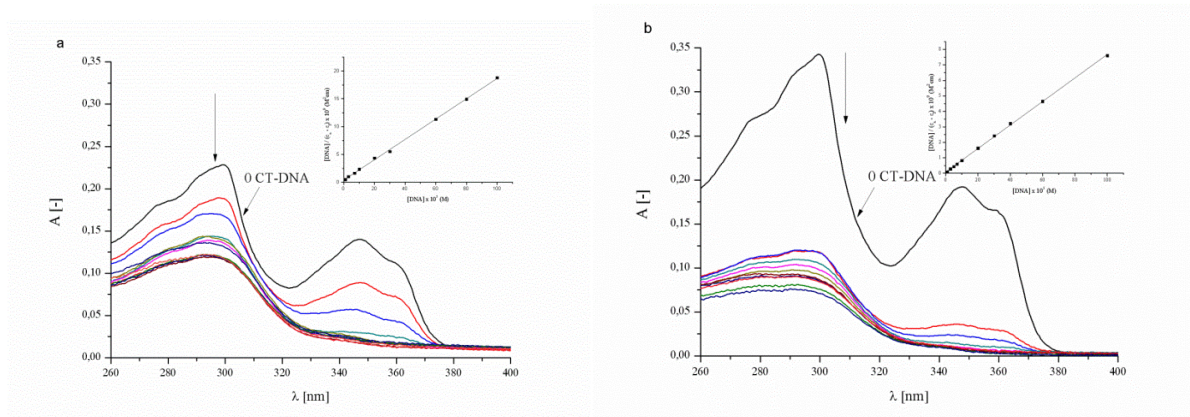


Rysunek 18 Wpływ kompleksów [VO(tpy)Cl₂] (1) (a, b) oraz [VO₂(tpy)]Br·3.5H₂O (2) (c, d) na fazy cyklu komórkowego.

Faza G2M cyklu komórkowego poprzedza podział mitotyczny komórki. W przypadku gdy struktura DNA genomowego zostanie naruszona (na przykład poprzez interkalację), to nie dochodzi do podziału komórki i DNA kumuluje się w jądrze. Otrzymane wyniki wskazują na DNA-zależny mechanizm oddziaływania.

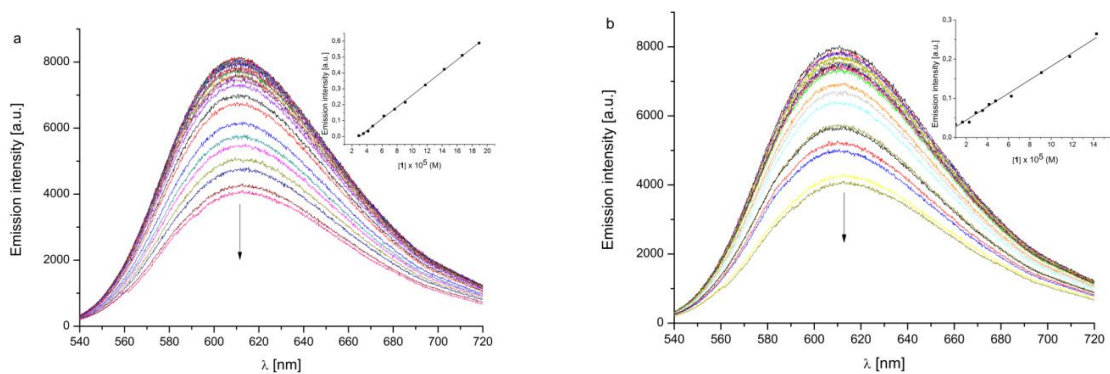
Badania spektroskopowe przeprowadzono w wodnym medium w fizjologicznym pH. W tych warunkach chlorki skoordynowane z jonem metalu w kompleksie [VO(tpy)Cl₂] (1) mogą zostać wymienione na H₂O lub OH⁻, podobnie jak to ma miejsce w przypadku *cisplatyny* [11].

W widmach absorpcji obu kompleksów wanadu występują dwa charakterystyczne pasma przy $\lambda \sim 295$ i 345 nm (Rysunek 19), których intensywność maleje wraz ze wzrostem stężenia DNA w roztworze. Oznacza to, że badane związki wiążą się z DNA. Stałe wiązania wynoszą odpowiednio $K_w = 4,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ($R = 0,99$) i $K_w = 1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ dla [VO(tpy)Cl₂] (1) oraz [VO₂(tpy)]₂Br₂·3H₂O (2). Są one wyższe niż dla wcześniej opisywanych helikatów polipirydynowych oraz innych kompleksów wanadu [43, 44].



Rysunek 19 Miareczkowanie spektrofotometryczne kompleksów: (a) $[\text{VO}(\text{tpy})\text{Cl}_2]$ (1); (b) $[\text{VO}_2(\text{tpy})]_2\text{Br}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2) roztworem CT-DNA ($c_{\text{CT-DNA}} = 0 - 100 \mu\text{M}$; $c_{\text{kompl.}} = 2 \times 10^{-5} \text{M}$); strzałki pokazują kierunek zmian hipochromowych w widmach. **Suplement:** zależność $[\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$.

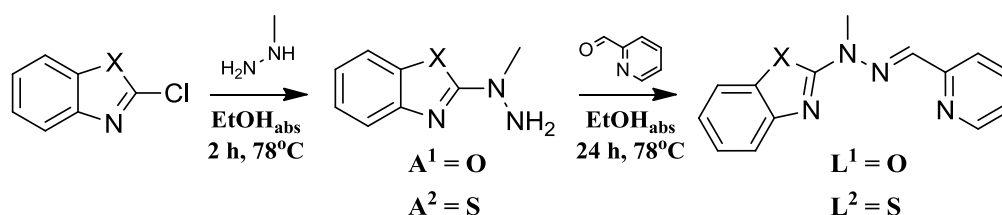
Miareczkowanie fluorescencyjne kompleksu EtBr – CT-DNA roztworami związków kompleksowych wanadu powoduje silne wygaszenie pasma emisji ($\lambda = 610 \text{ nm}$, Rysunek 20). Stałe wygaszania Sterna-Volmera wynoszą odpowiednio $3,72 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ i $1,72 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ dla kompleksów $[\text{VO}(\text{tpy})\text{Cl}_2]$ (1) i $[\text{VO}_2(\text{tpy})]_2\text{Br}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2). Pozorna stała wiązania przy 50% wygaszeniu emisji wynosi odpowiednio $K_{\text{app}} = 7,45 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ oraz $K_{\text{app}} = 7,00 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ i pokrywa się z wynikami poprzedniego eksperymentu.



Rysunek 20 Widma emisyjne EtBr związanego z CT-DNA w obecności wzrastającego stężenia kompleksów: $[\text{VO}(\text{tpy})\text{Cl}_2]$ (1) i $[\text{VO}_2(\text{tpy})]_2\text{Br}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2); strzałki pokazują kierunek zmian w widmach. **Suplement:** zależność Sterna-Volmera $I^0/I-1$ versus $[\text{DNA}]$ dla miareczkowania kompleksu EtBr – CT-DNA.

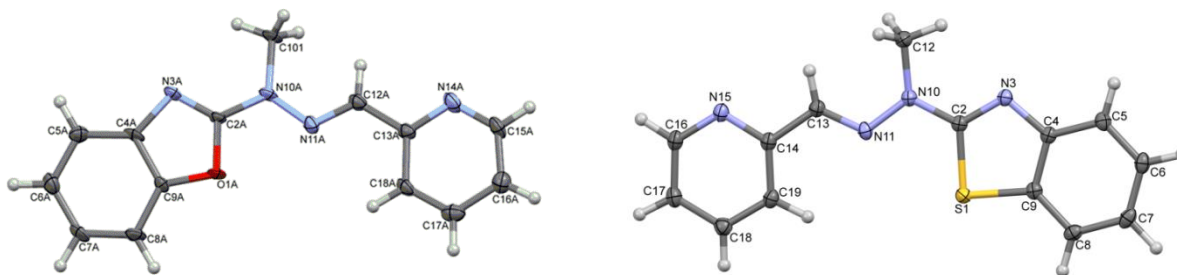
Przypuszczalnie dwa aksjalnie skoordynowane chlorki (ewentualnie H_2O lub OH^-) są zawadą steryczną i nieco utrudniają interkalację kompleksu $[\text{VO}(\text{tpy})\text{Cl}_2]$ (1) pomiędzy pary zasad. Tymczasem aranżacja wokół VO_2^+ w $[\text{VO}_2(\text{tpy})]\text{Br}\cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (2), która przyjmuje geometrię zniekształconej bipiramidy trygonalnej, ułatwia wsuwanie się kompleksu między pary zasad DNA i może to być dodatkowo stabilizowane przez oddziaływania elektrostatyczne wysuniętych na zewnątrz tlenów VO_2^+ z powierzchnią DNA. Badania cytometrii przepływowej wyraźnie potwierdzają DNA-zależny mechanizm działania przedstawionych kompleksów wanadu. Dotychczas opisywane w literaturze badania dotyczyły aktywności heteroleptycznych kompleksów wanadu, które wykazywały aktywność cytotoksyczną jedynie po naświetlaniu ich światłem w zakresie 400-700 nm [45]. W publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej [20] przedstawione związki kompleksowe hamują namnażanie komórek bez naświetlania. Można przypuszczać, że ma na to wpływ obecność atomów tlenu bezpośrednio połączonych z wanadem zamiast dodatkowego liganda organicznego. Może mieć to kluczowe znaczenie dla zjawiska interkalacji DNA, a co za tym idzie aktywności hamującej wzrost i namnażanie komórek. Związki kompleksowe $[\text{VO}(\text{tpy})\text{Cl}_2]$ (1) oraz $[\text{VO}_2(\text{tpy})]\text{Br}\cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (2) są pierwszymi przykładami związków wanadu aktywnych wobec komórek linii T47D raka piersi, co jest szczególnie interesujące w obliczu jej oporności na *cis*-platynę.

Ostatnie dwie publikacje z cyklu dotyczą właściwości związków kompleksowych Fe^{2+} [46]) oraz Ag^+ [47] z ligandami typu zasad Schiffa. Są to ligandy N_3 -donorowe, których synteza przebiega w dwóch etapach wg poniższego schematu (Rysunek 21).



Rysunek 21 Schemat syntezy ligandów L^1 oraz L^2 .

Ligand L^1 zawiera podjednostkę benzoksazolową, a ligand L^2 benzotiazolową w to miejsce. Syntezy ligandów prowadzono w warunkach gazu obojętnego z wydajnościami rzędu 80%. Ich struktury zostały potwierdzone za pomocą technik ^1H NMR, ^{13}C NMR, ESI-MS, FT-IR i analizy elementarnej, a także za pomocą metod dyfraktometrycznych (Rysunek 22).

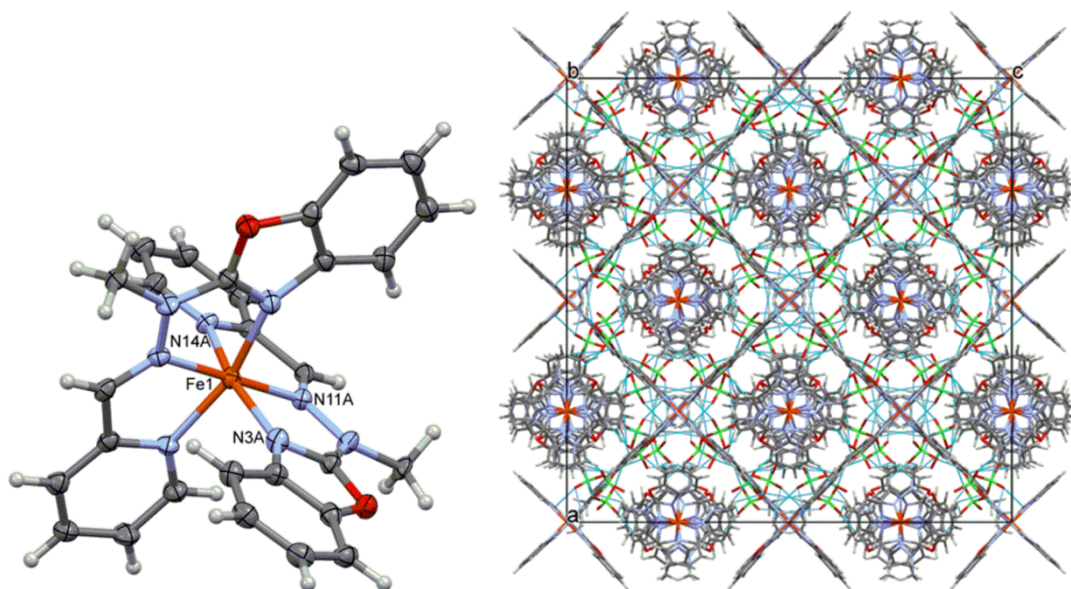


Rysunek 22 Struktury krystaliczne ligandów (po lewej) L^1 oraz (po prawej) L^2 .

Jony metali d-elektronowych znajdują zastosowanie w projektowaniu przełączników molekularnych typu *on-off*. Szczególnie interesujące są jony Fe^{2+} , ponieważ posiadają one 6 elektronów walencyjnych na orbitalach 3d, więc mogą być diamagnetyczne (w kompleksach niskospinowych) lub paramagnetyczne (w kompleksach wysokospinowych) w polu ligandów. Po zaaplikowaniu określonego czynnika możliwe jest „przełączanie” kompleksów z nisko- do wysokospinowych i na odwrót ($LS \leftrightarrow HS$) [48, 49]. Do takich czynników zaliczają się: zamiana temperatury lub ciśnienia, naświetlanie, lub przykładanie zewnętrznego pola magnetycznego, z czego pierwszy z nich cieszy się największym zainteresowaniem. Ogólnie celem badań jest otrzymanie takiego układu, w którym w temperaturze pokojowej lub zbliżonej będzie można zaobserwować wyraźne przejście elektronów na orbitale e_g , a następnie ich powrót na orbitale t_{2g} [48].

Oba kompleksy żelaza(II) scharakteryzowane w czwartej publikacji w cyklu [46] o ogólnym wzorze sumarycznym $3[Fe(L^1)_2] \cdot 6(R^-) \cdot 2(CH_3CN)$ [gdzie $R^- = BF_4^-$ w kompleksie (1) lub ClO_4^- w kompleksie (2)] zostały otrzymane w wyniku równomolowej reakcji liganda L^1 z odpowiednią solą metalu (odpowiednio $FeBF_4$ lub $FeClO_4$). Po około godzinie z ciemnoczerwonego roztworu zaczynał wypadać osad i od tego momentu reakcja była prowadzona przez kolejne 24 h. Następnie roztwory zatężano do około połowy objętości i powstały osad odsączano pod zmniejszonym ciśnieniem, a nieprzereagowane sole wmywano niewielką ilością acetonitrylu. W ten sposób, po przemyciu eterem dietylowym i suszeniu przez 3-4 h w eksykatorze próżniowym otrzymywano czyste kompleksy o stosunku jon metalu : ligand 1:2. Ciemnoczerwone, sześciokątne monokryształy odpowiednie do analizy rentgenostrukturalnej zostały otrzymane w wyniku powolnego odparowania acetonitrylu z roztworów kompleksów. Oba krystalizują w stosunkowo rzadko występującym układzie regularnym Ia-3d (No. 230) z cząsteczkami acetonitrylu w strukturze (Rysunek 23).

Jeden kation jest koordynowany przez atomy donorowe dwóch ligandów, wielościanem koordynacyjnym jest oktaedr. Jednostka asymetryczna zawiera połowę cząsteczki kompleksu, jeden przeciwjon (BF_4^- lub ClO_4^-) oraz jedną trzecią cząsteczki rozpuszczalnika.



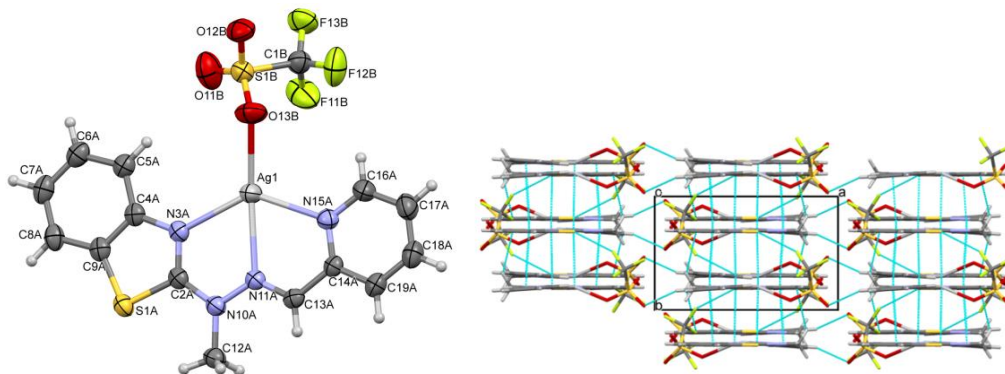
Rysunek 23 Struktura krystaliczna kompleksu $3[\text{Fe}(\text{L}^1)_2] \cdot 6(\text{BF}_4^-) \cdot 2(\text{CH}_3\text{CN})$ (1) oraz upakowanie w sieci krystalicznej. Kompleks $3[\text{Fe}(\text{L}^1)_2] \cdot 6(\text{ClO}_4^-) \cdot 2(\text{CH}_3\text{CN})$ (2) krystalizuje w analogiczny sposób.

Kolejnym z celów niniejszej rozprawy było scharakteryzowanie dotychczas niezbadanego wpływu ligandów N_3 -donorowych typu zasad Schiffa z jednostką benzoksazolową na strukturę elektronową żelaza(II) pod kątem zastosowania jako przełącznika molekularnego. W tym celu zostały przeprowadzone pomiary podatności magnetycznej w zakresie temperatur 1,8 – 400 K. Do temperatury 300 K nie obserwowano zmian. Dopiero w zakresie 350 - 400 K zaobserwowano wzrost wartości $\chi_m T$ w przypadku obu kompleksów. Może to być kooperatywny wynik przejść elektronowych $\text{LS}(^1\text{A}_1) \leftrightarrow \text{HS}(^5\text{T}_2)$ w jonach metali oraz usuwania cząsteczek rozpuszczalników z kryształów w wyniku ogrzewania (analiza termogravimetryczna sugeruje stopniową utratę cząsteczek rozpuszczalnika w zakresie temperatur 298 – 448 K) [50, 51]. Wpływ rozpuszczalnika na właściwości magnetyczne cząsteczek nie jest dobrze poznany, ale badania eksperymentalne pokazują wyraźnie jego znaczenie w zjawisku *spin-scrossover* [52]. W badanym przypadku do temperatury 400 K nie osiągnięto całkowitego przejścia elektronów i otrzymania jedynie wysokospinowych kompleksów żelaza(II). Jest to jednak dobry punkt startowy

do projektowania nowych ligandów, które będą słabiej rozszczepiały orbitale d, przez co całkowite przejścia $LS \leftrightarrow HS$ będą możliwe już w temperaturze poniżej 350 K. Tak działające systemy potencjalnie będą mogły znaleźć zastosowanie w konstrukcji urządzeń elektronicznych.

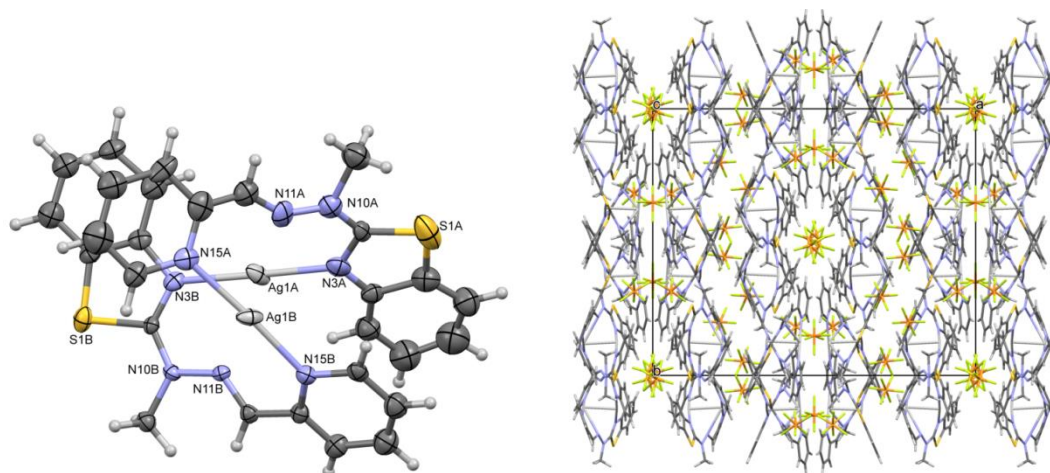
W ostatniej publikacji rozprawy doktorskiej [47] poruszono zagadnienie aktywności fotokatalitycznej kompleksów srebra(I) oraz jej zależności od struktury kompleksu. W tym celu dokonano syntezy dwóch związków kompleksowych srebra(I) z ligandem L^2 , który zawiera cząsteczkę benzotiazolu. Związki kompleksowe otrzymano w wyniku reakcji równomolowej mieszaniny liganda i soli metalu, odpowiednio $AgOTf$ i $AgPF_6$ dla kompleksów $[AgL^2(OTf)]$ (1) i $[Ag_2L^2_2](PF_6)_2$ (2), w metanolu. Żółte roztwory po 24 h zostały zatężone i produkty wytrącone eterem dietylowym. Żółte monokryształy odpowiednie do pomiarów rentgenograficznych zostały otrzymane dzięki metodzie podwójnej dyfuzji eteru diizopropylowego do metanolowego roztworu kompleksów.

Związek kompleksowy $[AgL^2(OTf)]$ (1) przyjmuje formę monomeryczną z silnie zniekształconą płaskokwadratową sferą koordynacyjną wokół jonu metalu. Trzy pozycje zajmuje kieszeń wiążąca liganda, a czwartą jon OTf (Rysunek 24).



Rysunek 24 Struktura krystaliczna kompleksu $[AgL^2(OTf)]$ (1) oraz upakowanie w sieci krystalicznej.

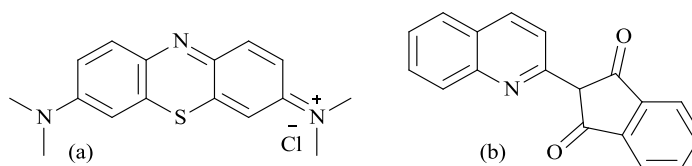
Kompleks $[Ag_2L^2_2](PF_6)_2$ (2) ma zupełnie inną strukturę. Udało się to osiągnąć poprzez wykorzystanie soli srebra(I) ze słabokoordynującym przeciwjonem, czyli w tym przypadku PF_6^- . Dzięki temu zabiegowi uzyskano podwójny helikat, w którym jony metali są skoordynowane (Rysunek 25).



Rysunek 25 Struktura krystaliczna kompleksu $[Ag_2L_2](PF_6)_2$ (2) oraz upakowanie w sieci krystalicznej.

Właściwości optyczne srebra(I) oraz liganda o rozległym układzie skoniugowanych wiązań π mogą kooperatywnie wpływać na aktywność fotokatalityczną kompleksów poprzez modyfikację przerwy energetycznej HOMO-LUMO [53]. Jak dotąd nie dokonano bezpośredniego porównania aktywności kompleksów helikalnych i monomerycznych. Dzięki preferencjom koordynacyjnym jonów Ag^+ oraz doborze odpowiedniego liganda typu zasady Schiffa możliwe było zbadanie takiej zależności w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej. Dodatkową zaletą badanych fotokatalizatorów jest łatwość syntezy oraz jej niska cena, stąd szczególnie ciekawe są cząsteczki zawierające ligandy typu zasad Schiffa, które można otrzymać z dobrymi wydajnościami w krótkim czasie. Jest to kusząca alternatywa dla ligandów polipirydynowych, które są otrzymywane w wieloetapowych syntezach w bezwodnych i beztlenowych warunkach, często z użyciem reagentów toksycznych (np. w reakcji Stille'a) [7].

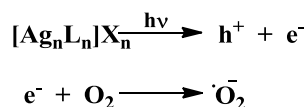
Rolę modelowych związków organicznych w badaniach aktywności katalitycznej pełniły błękit metylenowy oraz żółcień chinolinowa (Rysunek 26), barwniki powszechnie stosowane w przemyśle [54, 55].



Rysunek 26 Wzory strukturalne (a) błękitu metylenowego i (b) żółcieni chinolinowej.

Oba badane związki kompleksowe degradują barwniki organiczne w wodzie. Monomeryczny kompleks $[\text{AgL}^2(\text{OTf})]$ (1) działa efektywniej niż helikat $[\text{Ag}_2\text{L}^2_2](\text{PF}_6)_2$ (2). Może mieć to związek z labilnością jednego z miejsc koordynacyjnych i możliwości wymiany przeciwjonu na inny obecny roztworze, podczas gdy w kompleksie $[\text{Ag}_2\text{L}^2_2](\text{PF}_6)_2$ (2) jony metali są szczelniej otoczone przez cząsteczki liganda. Należy jednak nadmienić, że kompleks $[\text{AgL}^2(\text{OTf})]$ (1) ulega wyraźnym zmianom strukturalnym po jednym cyklu katalitycznym, natomiast helikat $[\text{Ag}_2\text{L}^2_2](\text{PF}_6)_2$ (2) może być wykorzystany ponownie (analiza dyfraktogramów proszkowych). Przyczyną zaniżonej aktywności degradacyjnej helikatu może być nieco wyraźniejsza tendencja $[\text{Ag}_2\text{L}^2_2](\text{PF}_6)_2$ (2) niż $[\text{AgL}^2(\text{OTf})]$ (1) do koagulacji (potencjały zeta wynoszą odpowiednio $\zeta_{5b} = 3,55$ mV oraz $\zeta_{5a} = 13,64$ mV) w medium wodnym.

Najprawdopodobniej mechanizm rozkładu materii organicznej jest inicjowany przez wybitego elektronu z poziomu HOMO kompleksu i jego rekombinację ze związkami w matrycy – na przykład O_2 , OH^- czy H_2O . Propozycja mechanizmu została przedstawiona na rysunku 27.



Rysunek 27 Wzory strukturalne (a) błękitu metylenowego i (b) żółcieni chinolinowej.

Aby pełniej porównać i zrozumieć różnice w aktywności związków kompleksowych przedstawionych w tejże pracy, przeprowadzono także badania na próbkach środowiskowych. Zawartość ogólnego węgla organicznego (OWO) zmniejsza się 2,4-krotnie w obecności helikatu $[\text{Ag}_2\text{L}^2_2](\text{PF}_6)_2$ (2) i jedynie 1,1-krotnie w obecności $[\text{AgL}^2(\text{OTf})]$ (1). Naświetlanie próbek powoduje dalszy spadek zawartości OWO w roztworze – 3-krotny w próbce z $[\text{Ag}_2\text{L}^2_2](\text{PF}_6)_2$ (2) i 1,2-krotny w próbce zawierającej $[\text{AgL}^2(\text{OTf})]$ (1). Degradacja jest mniej efektywna niż w roztworach wzorcowych z błękitem metylenowym lub żółcią chinolinową. Powodem jest obecność naturalnej matrycy w roztworze, która wpływa na zmniejszenie aktywności fotodegradacyjnej związków, ponieważ działa ona jak wewnętrzny filtr. Wolne rodniki generowane przez katalizator są wygaszane przez zmiatacze obecne w próbkach środowiskowych. Wyraźne osłabienie aktywności degradacyjnej kompleksu monomerycznego $[\text{AgL}^2(\text{OTf})]$ (1) względem helikatu $[\text{Ag}_2\text{L}^2_2](\text{PF}_6)_2$ (2) pokazuje znaczenie aranżacji wokół jonu centralnego i wpływ labilności ligandów na aktywność i trwałość



katalizatora. Natura wskazała ludzkości magiczną moc helikatów niosącą za sobą szerokie spektrum możliwości ich zastosowań, co potwierdziły wyniki badań zamieszczone w powyższej rozprawie doktorskiej.

4. Wnioski

Założeniem niniejszej rozprawy doktorskiej była charakterystyka właściwości nowych związków kompleksowych metali d-elektronowych. Praca obejmuje badania biologiczne, magnetyczne oraz fotokatalityczne. Najważniejsze wnioski i osiągnięcia wynikające z badań przeprowadzonych w ramach tejże rozprawy są następujące:

- ◆ Helikaty srebra(I) oraz miedzi(I) z 6,6''-dimetylo-2,2':6',2''-terpirydyną i/lub 6,6''''-dimetylo-2,2';6',2'';6'',2''''-tetrapirydyną wykazują aktywność cytotoksyczną wobec komórek w mikromolowych stężeniach, podobnie jak kompleksy wanadu(IV/V) z 6,6''-dimetylo-2,2':6',2''-terpirydyną;
- ◆ Helikaty $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1a) i $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2(\text{O-NO}_2)](\text{NO}_3)$ (1b) cechują się umiarkowaną selektywnością antyproliferacyjną wobec linii komórek raka piersi T47D w porównaniu do zdrowych komórek nerki HEK-293T, które są odporne na działanie *cis*platyny;
- ◆ Objętość kationów helikatów ma wpływ na ich aktywność cytotoksyczną – kompleks $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1a) jest o około 3-4 razy bardziej aktywny niż analogiczny kompleks $[\text{Ag}_2(\text{qtp})_2](\text{OTf})_2$ (2a). Najprawdopodobniej wiąże się to z różnicami w zdolności do migracji przez błony;
- ◆ Helikaty migrują selektywnie do jądra komórkowego, w szczególności do jąder. $[\text{Ag}_2(\text{tpy})_2](\text{OTf})_2$ (1a) to pierwszy związek, którego targetowanie do jądra zostało wyraźnie dowiedzione poprzez obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej;
- ◆ Wszystkie związki kompleksowe badane pod kątem właściwości cytotoksycznych cechują się DNA-zależnym mechanizmem działania, co zostało potwierdzone przez cytometrię przepływową lub mikroskopię konfokalną;
- ◆ Helikaty z ligandem terpirydynowym prawdopodobnie wiążą się poprzez interkalację z DNA, natomiast helikaty z ligandem tetrapirydynowym w rowkach DNA. Jest to powiązane z objętością kationów;
- ◆ Kompleksy wanadu(IV/V) wymuszają zahamowanie namnażania komórek poprzez interkalację DNA;
- ◆ Srebro(I) jest kluczowym elementem środków bakteriostatycznych, ponieważ jego kompleksy z 6,6''-dimetylo-2,2':6',2''-terpirydyną cechują się szczególnie wyraźną

aktywnością wobec bakterii Gram-dodatnich, natomiast kompleksy wanadu(IV/V) nie wykazują działania bakteriobójczego;

- ◆ Analogiczne helikaty miedzi(I) i srebra(I) z lub 6,6''''-dimetylo-2,2';6',2'';6'',2''''-tetrapirydyną generują śmierć komórek na różne sposoby. Pierwsze powodują nekrozę komórek, a drugie prowadzą do apoptozy;
- ◆ Kompleksy $[\text{VO}(\text{tpy})\text{Cl}_2]$ (3a) i $[\text{VO}_2(\text{tpy})]_2\text{Br}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (3b) są pierwszymi przykładami związków wanadu aktywnych cytotoksycznie wobec komórek raka piersi T47D bez konieczności naświetlania. Przypisuje się to brakowi ligandów towarzyszących i atomom tlenu bezpośrednio związanym z centrum metalicznym;
- ◆ Wykryształowano dwa kompleksy żelaza(II) o analogicznej strukturze w układzie regularnym Ia-3d o wzorze ogólnym sumarycznym $3[\text{Fe}(\text{L}^1)_2] \cdot 6(\text{R}^-) \cdot 2(\text{CH}_3\text{CN})$ (gdzie $\text{R}^- = \text{BF}_4^-$ w kompleksie 4a lub ClO_4^- w kompleksie 4b) z ligandem typu zasady Schiffa 2-(1-metylo-2-(pirydyno-2-ylometyleno)hydrazinylo)benzoksazolem;
- ◆ Kompleksy $3[\text{Fe}(\text{L}^1)_2] \cdot 6(\text{BF}_4^-) \cdot 2(\text{CH}_3\text{CN})$ (4a) i $3[\text{Fe}(\text{L}^1)_2] \cdot 6(\text{ClO}_4^-) \cdot 2(\text{CH}_3\text{CN})$ (4b) przechodzą w formę wysokospinową dopiero powyżej temperatury pokojowej, a po ochłodzeniu są w pełni diamagnetyczne.
- ◆ Ligand 2-(1-metylo-2-(pirydyno-2-ylometyleno)-hydrazinylo)benzotiazol tworzy dwa rodzaje kompleksów z solami srebra(I): monomeryczny $[\text{AgL}^2(\text{OTf})]$ (5a) i helikalny $[\text{Ag}_2\text{L}^2_2](\text{PF}_6)_2$ (5b), który może być poddawany recyklingowi i nie ulega zatruciu pod wpływem indywiduów obecnych w matrycy.

5. Literatura

- [1] K. Ariga, T. Kunitake, *Supramolecular Chemistry - Fundamentals and Applications. Advanced Textbook*, Berlin, Springer, **2006**.
- [2] Oficjalna strona internetowa Nagrody Nobla: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/ dostęp 15.12.2016
- [3] R. Kramer, J.-M. Lehn, A. Marquis-Rigault, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993** (90) 5394-5398.
- [4] M. Ruben, J. Rojo, F. J. Romero-Alguero, L. H. Uppadine, J.-M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004** (43) 3644-3662.
- [5] A. Gorczyński, J. M. Harrowfield, V. Patroniak, A. Stefankiewicz, *Chem. Rev.* **2016** (116) 14620-14674.
- [6] H. Hagiwara, T. Tanaka, S. Hora, *Dalton Trans.* **2016** (45) 17132-17140.
- [7] M. Wałęsa-Chorab, V. Patroniak, M. Kubicki, G. Kądziołka, J. Przepiórski, B. Michalkiewicz, *J. Cat.* **2012** (291) 1-8.
- [8] D. Marcinkowski, M. Wałęsa-Chorab, M. Kubicki, M. Hoffman, G. Kądziołka, B. Michalkiewicz, V. Patroniak, *Polyhedron* **2015** 91-98.
- [9] D. Marcinkowski, M. Wałęsa-Chorab, V. Patroniak, M. Kubicki, G. Kądziołka, B. Michalkiewicz, *New J. Chem.* **2014** (38) 604-610.
- [10] B. W. Harper, A. M. Krause-Heuer, M. P. Grant, M. Manohar, K. B. Garbutcheon-Singh, J. R. Aldrich-Wright, *Chem. Eur. J.* **2010** 7064-7077.
- [11] E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1999** (99) 2467-2498.
- [12] C. N. Banti, S. K. Hadjikakou, *Metallomics* **2013** (5) 569-596.
- [13] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, *Chem. Rev.* **2014** (114) 815-862.
- [14] E. Kioseoglou, S. Petanidis, C. Gabriel, A. Salifoglou, *Coord. Chem. Rev.* **2015** (301-302) 87-105.
- [15] J. Berg, L. Stryer, J. L. Tymoczko, *Biochemia*, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, **2010**.
- [16] L. Cerasino, M. J. Hannon, E. Sletten, *Inorg. Chem.* **2007** (46) 6245-6251.
- [17] A. Ali, S. Bhattacharya, *Bioorg. Med. Chem.* **2014** (22) 4506-4521.

- [18] **M. A. Fik**, A. Gorczyński, M. Kubicki, Z. Hnatejko, A. Fedoruk-Wyszomirska, E. Wyszko, M. Giel-Pietraszuk, V. Patroniak, *Eur. J. Med. Chem.* **2014** (86) 456–468.
- [19] A. Adamski, **M. A. Fik**, M. Kubicki, Z. Hnatejko, D. Gurda, A. Fedoruk-Wyszomirska, E. Wyszko, D. Kruszka, Z. Dutkiewicz, V. Patroniak, *New Journal of Chemistry* **2016** (40) 7943-7957.
- [20] **M. A. Fik**, A. Gorczyński, M. Kubicki, Z. Hnatejko, A. Wadas, P. J. Kulesza, A. Lewińska, M. Giel-Pietraszuk, E. Wyszko, V. Patroniak, *Polyhedron* **2015** (97) 83-93.
- [21] T. Bernas, J. Dobrucki, *Cytometry* **2002** (47) 236-242.
- [22] A. Citta, E. Schuh, F. Mohr, A. Folda, M.L. Massimino, A. Bindoli, A. Casini, M.P. Rigobello, *Metallomics* **2013** (5) 1006-1015.
- [23] R. J. DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou, C. B. Thompson, *Cell. Metab.* **2008** (7) 11-20.
- [24] P. Kumar, S. Gorai, M. K. Santra, B. Mondal, D. Manna, *Dalton Trans.* **2012** (41) 7573-7581.
- [25] H. Wu, J. Yuan, Y. Bai, G. Pan, H. Wang, J. Kong, X. Fan, H. Liu, *Dalton Trans.* **2010** (41) 8829-8838.
- [26] V. T. Yilmaz, E. Gocmen, C. Iysel, M. Cengiz, S. Y. Susluer, O. Buyukgungor, *J. Photochem. Photobiol. B* **2014** (131) 31-42.
- [27] L. Li, Q. Gu, J. Dong, T. Xu, J. Li, *J. Photochem. Photobiol. B* **2013** (125) 56-62.
- [28] A. Lauria, R. Bonsignore, A. Terenzi, A. Spinello, F. Giannici, A. Longo, A. M. Almerico, G. Barone, *Dalton Trans.* **2014** (43) 6108-6119.
- [29] L. Danzmann, P. Gastmeier, F. Schwab, R.-P. Vonberg, *Infec. Dis.* **2013** (13) 1-8.
- [30] S. Picozzi, C. Ricci, M. Gaeta, A. Macchi, E. Dinang, G. Paola, M. Tejada, E. Costa, G. Bozzini, S. Casellato, L. Carmignani, *Urol. Ann.* **2013** (5) 25-29.
- [31] A. Patra, B. Sen, S. Sarkar, A. Pandey, E. Zangrando, P. Chattopadhyay, *Polyhedron* **2013** (51) 156-163.
- [32] B.-F. Ruan, Y.-Z. Zhu, W.-D. Liu, B.-A. Song, Y.-P. Tian, *Eur. J. Med. Chem.* **2014** (72) 46-51.
- [33] F. Almalioti, J. MacDougall, S. Hughes, M. M. Hasson, R. L. Jenkins, B. D. Ward, G. J. Tizzard, S. J. Coles, D. W. Williams, S. Bamford, I. A. Fallis, A. Dervisi, *Dalton Trans.* **2013** (42) 12370-12380.

- [34] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000** (52) 662-668.
- [35] B.-L. Fei, B. Yin, D.-D. Li, W.-S. Xu, Y. Lu, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2016** (8) 987-996.
- [36] W. Hu, C. Blecking, M. Krajl, L. Sulman, I. Piantanida, T. Schrader, *Chem. – Eur. J.* **2012** (18) 3589-3597.
- [37] D. Rehder, *Org. Biomol. Chem.* **2008** (6) 957–964.
- [38] D.C. Crans, J.J. Smee, E. Gaidamauskas, L.Q. Yang, *Chem. Rev.* **2004** (104) 849–902.
- [39] W. Plass, *Coord. Chem. Rev.* **2011** (255) 2378– 2387.
- [40] M. Strianese, A. Basile, A. Mazzone, S. Morello, M. C. Turco, C. Pellicchia, *J. Cell. Physiol.* **2013** (228) 2202-2209.
- [41] P. Smoleński, S. W. Jaros, C. Pettinari, G. Lupidi, L. Quassinti, M. Bramucci, L. A. Vitali, D. Petrelli, A. Kochel, A. M. Kirillov, *Dalton Trans.* **2013** (42) 6572–6581.
- [42] C. Mari, V. Pierroz, S. Ferrari, G. Gasser, *Chem. Sci.* **2015** (6) 2660-2686.
- [43] L. Shivakumar, K. Shivaprasad, H. D. Revanasiddappa, *Spectrochim. Acta A* **2012** (97) 659-666.
- [44] L. Leelavathy, S. Anbu, M. Kandaswamy, N. Karthikeyan, N. Mohan, *Polyhedron* **2009** (28) 903-910.
- [45] B. Banik, P. K. Sasmal, S. Roy, R. Majumdar, R. R. Dighe, A. R. Chakravarty, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011** 1425–1435.
- [46] **M. A. Fik**, M. Löffler, M. Weselski, M. Kubicki, M. J. Korabik, V. Patroniak, *Polyhedron* **2015** (102) 609–614.
- [47] **M. A. Fik**, A. E. Odachowska, M. Kubicki, J. Karpińska, V. Patroniak, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016** 5530-5538.
- [48] G. A. Craig, O. Roubeau, C. Aromi, *Coord. Chem. Rev.* **2014** (269) 13-31.
- [49] A. Borgogno, F. Rastrelli, A. Bagno, *Dalton Trans.* **2014** (43) 9486-9496.
- [50] V. Mishra, H. Mishra, R. Mukherjee, E. Codjovi, J. Linarès, J.-F. Létard, C. Desplanches, C. Baldé, C. Enachescu, F. Varret, *Dalton Trans.*, **2009** 7462-7472.
- [51] H. Wang, C. Sinito, A. Kaiba, J. Sanchez Costa, C. Desplanches, P. Dagault, P. Guionneau, J.-F. Létard, P. Negrier, D. Mondieig, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014** 4927-4933.
- [52] M. Ruben, E. Breuning, J.-M. Lehn, V. Ksenofontov, P. Gülich, G. Vaughan, *J. Magn. Mater.* **2004** (272-276) e715-e717.
- [53] M. Dai, H.-X. Li, J.-P. Lang, *CrystEngComm* **2015** (17) 4741-4753.



- [54] C. Belapaire, T. Reyns, C. Geeraerts, J. Van Loco, *Chemosphere* **2015** (138) 784-791.
- [55] F. M. Drumond Chequer, V. de Paula Venancio, M. Rocha de Souza Prado, L. Raimundo campos de Silva e Cunha Junior, T. Mescoloto Lizier, M. Valnice Boldrin Zanoni, R. R. Burbano, M. L. P. Bianchi, L. M. G. Anutes; *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* **2015** (777) 54-61.



**KOPIE CYKLU PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH
OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE, O KTÓRYM MOWA
W ART. 13 UST. 2 USTAWY**