



Białystok, 15.11.2019 r

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Darii Jamroz**

**pt. „Półsandwiczowe kompleksy metalokarbonylowe żelaza, molibdenu i ruteny: synteza, reaktywność oraz zastosowanie”**

Praca doktorska Pani mgr Darii Jamroz została wykonana w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. UŁ dr hab. Bogny Rudolf.

Dorobek badawczy Pani Jamroz w zakresie przedstawionej pracy stanowią trzy artykuły naukowe, wszystkie opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i dobrym współczynniku oddziaływania. Dodatkowo jedna praca jest w przygotowaniu. Doktorantka jest również autorką 24 wystąpień konferencyjnych (postery i komunikaty) prezentowanych na konferencjach i seminariach o zasięgu ogólnopolskim (17) i międzynarodowym (7). Była kierownikiem dwóch projektów przyznawanych w ramach dotacji statutowej na Uniwersytecie Łódzkim. Odbyła ona dwa, krótkoterminowe staże w ramach programu ERASMUS+ w bardzo dobrym ośrodku badawczym (Universite Pierre et Marie Curie obecnie Université Paris Sorbonne). Pani magister brała aktywny udział o organizacji dwóch konferencji naukowych dla doktorantów.

Kompleksy metaloorganiczne skupiają obecnie uwagę badaczy ze względu na zakres potencjalnych aplikacji. Zagadnienia podjęte w rozprawie doktorskiej mgr Darii Jamroz wskazują na te zastosowania, dobrze wpisując się w nowoczesne trendy badawcze takie jak poszukiwania nowych leków (terapia) i markerów mogących znaleźć zastosowanie w diagnostyce medycznej.

Tematyka przedłożonej pracy dotyczy opracowania metodyki otrzymywania i reaktywności półsandwiczowych kompleksów metalokarbonylowych metali przejściowych takich jak: żelazo, molibden i ruten. Uzyskane związki poddano badaniom biologicznym takim jak cytotoksyczność, właściwości antyproliferacyjne oraz przeciwnowotworowe. Zbadano również możliwość znakowania biomolekuł z udziałem związków metalokarbonylowych.

Dostarczona do recenzji praca obejmuje 132 strony jednolitego manuskryptu. Zawartość została podzielona w sposób klasyczny na „Cel i zakres pracy” (1 strona), „Część literaturowa” (32 strony), „Część badawcza” (18 stron), „Część eksperymentalna” (21 stron) oraz „Podsumowanie i wnioski” (3 strony). W skład rozprawy wchodzi również: „Streszczenie w języku polskim i angielskim” (4 strony), Wykaz skrótów (5 stron), „Spis rysunków, schematów i tabel” (łącznie 5

stron). W końcowej części pracy znajduje się spis piśmiennictwa (14 stron, 123 pozycje) oraz „Wykaz dorobku naukowego” Doktorantki (4 strony).

W rozdziale „Cel i zakres pracy” autorka przedstawiła zaplanowane syntezy związków metalokarbonylowych z różnymi ligandami organicznymi, które miały wpłynąć na uzyskanie lub zwiększenie aktywności biologicznej (głównie przeciwnowotworowej) lub dające możliwość ich wykorzystania jako znaczników układów biologicznych. Wprowadzeniem do badań własnych jest 32 stronicowa część literaturowa. Autorka przedstawiła w niej informacje związane z tematyką badań, rozpoczynając od zagadnień chemii metali przejściowych. Skupiła się ona na omówieniu i charakterystyce, stosowanych w pracy, ligandów: karbonylowego, fosfinowego, cyklopentadienowego i  $\beta$ -diketonowego z uwzględnieniem wpływu budowy ligandu na aktywność biologiczną. Kolejny rozdział, tej części pracy, poświęciła ona omówieniu zagadnień związanych z wykorzystaniem koniugatów związków metaloorganicznych z biocząsteczkami takimi jak peptydy, białka (w tym enzymy, przeciwciała), steroidy, cukry, DNA i inne. Przedstawionych zostało kilka przykładów zastosowań tego typu układów w chemii bioorganicznej, w tym jako inhibitory enzymów, związki uwalniające tlenek węgla, układy o aktywności przeciwnowotworowej, radiofarmaceutyki. Autorka zwróciła również uwagę na rolę związków metaloorganicznych w syntezie organicznej, w szczególności katalizie. Nie jasny jest tylko powód umieszczenia katalizy w podrozdziale 4.2. W rozdziale trzecim części literaturowej Pani magister przedstawiła informacje na temat reakcji bioortogonalnych, czyli takich, które mogą być stosowane w żywych komórkach lub organizmach bez ingerencji w naturalne procesy w nich zachodzące. Omówiła ona ligację Staudingera, reakcje typu „click” (w tym fotoindukowaną), 1,3-dipolarną cykloaddycję azydków do alkinów, cykloaddycję SPAAC, cykloaddycję Dielsa-Aldera (w tym z odwrotnym układem elektronowym), reakcje biokoniugacji katalizowane metalami przejściowymi oraz reakcje ketonów i aldehydów. Część literaturowa została dobrze skonstruowana i zredagowana poprawnym językiem chemicznym. Pozwala ona na zapoznanie się z przedmiotem pracy i informacjami niezbędnymi do poruszania się w tematyce przedstawionych w kolejnej części pracy - badaniach własnych.

Badania będące przedmiotem rozprawy są cennym uzupełnieniem badań prowadzonych w grupie profesor Bogny Rudolf.

„Część badawcza” podzielona została na 4 podrozdziały. W pierwszym Doktorantka przedstawiła wyniki związane z reakcjami kompleksów metalokarbonylowych z  $\beta$ -diketonami o charakterze CH-kwasów. Do badań wybrano fotochemiczną reakcję karbonylowych kompleksów rutenu i żelaza z acetyloacetonem oraz jego pochodnymi. Reakcja ta jest bardzo ciekawa ze względu na możliwość wymiany nie tylko ligandów karbonylowych ale również cyklopentadienylowych i jodkowych w jednym etapie. Interesujące jest również zbadanie reaktywności innych związków dikarbonylowych w reakcji wymiany ligandów katalizowanej światłem. Doktorantka udowodniła, że w przypadku gdy związkami dikarbonylowymi były estry lub ketoestry takie jak: malonian dietylu lub acetylooctan etylu reakcja nie zachodziła. Jako powód podała delokalizację elektronów biorących udział w koordynacji atomu centralnego kompleksu lub/i zawadę przestrzenną. Dodatkowo na podstawie przeprowadzonych optymalizacji warunków reakcji oraz reakcji z użyciem mikrofal Doktorantka, wysunęła wnioski pozwalające na zaproponowanie mechanizmu reakcji, w którym wskazała na rolę formy  $\beta$ -ketoenolowej w procesie otrzymywania produktu dipodstawionego (str. 48 jest „ $\beta$ -diketon przyjmuje formę

$\beta$ -ketoenu” sugeruję sformułowanie „istnieje w formie ketoenolowej”, gdyż mamy tu do czynienia z równowagą keto-enolową i współistnieniem obu form, z których jedna jest w przewadze). Doktorantka popiera swoje wnioski doniesieniami literaturowymi, co świadczy o wnikliwej analizie literatury przedmiotu. Jednakże zdarzają się przypadki, np. na str. 44, kiedy Autorka zmienia kolejność i najpierw opisuje swój eksperyment, a potem popiera go odnośnikiem literaturowym. Jest to drobiazg, jednakże z punktu widzenia recenzenta, uważam, że łatwiej by było śledzić tok rozumowania, gdyby najpierw podano przesłanki, które skłoniły autorkę do zmiany źródła światła w reakcjach fotochemicznych dla kompleksów Ru na UV, w miejsce naświetlania światłem widzialnym. Co do tej części pracy proszę Doktorantkę o ewentualną dyskusję, na temat dodatkowych zalet stosowania metody syntezy kompleksów diketonowych z kompleksów karbonylowych, w porównaniu z metodami syntezy tych kompleksów, np. z chlorków Fe i Ru. Uzyskane kompleksy były badane pod względem aktywności przeciwnowotworowej w stosunku do komórek gruczolaka piersi MCF-7. Stwierdzono, że zarówno acetoniany rutenu jak i żelaza w istotnym stopniu indukują apoptozę komórek nowotworowych. Do opisu wkradło się trochę nieścisłości, jak np. podpis pod rysunkiem 27 nie wyjaśnia idei tego badania (str. 50 „analiza wolnych tioli”). Sformułowanie „apoptoza z szybkością poniżej 30%” jest nieprawidłowe. Badania te mogły by być lepiej opisane, po konsultacjach z autorami badań biologicznych, które zawsze warto przeprowadzić. Ta uwaga dotyczy jedynie tej w części. Badania biologiczne przedstawione w dalszych rozdziałach są odpowiednio przedstawione.

Wyniki pracy opisane w drugim rozdziale, są komplementarne i stanowią cenny wkład w poznanie oraz zwiększenie spektrum zastosowań reakcji fotochemicznej wymiany ligandów w kompleksach karbonylowych. Doktorantka wykonała syntezy kompleksów rutenu i żelaza wbudowując fosforynową pochodną D-glukofuranozy w miejsce jednej grupy karbonylowej. Wykorzystała do tego celu fotochemiczną metodę wymiany ligandów przedstawioną i omówioną w części pierwszej badań. W obu przypadkach (kompleksy Ru i Fe) uzyskano równomolowe mieszaniny diastereoizomerów. Prawdopodobnie ze względu na zawadę przestrzenną podstawieniu ulegała jedynie jedna grupa karbonylowa w substratach. Proszę o komentarz dotyczący sformułowania „Uzyskałam produkty ... z wydajnością 70 i 65%” str. 51. W jaki sposób liczona była wydajność skoro powstawała mieszanina diastereoizomerów? Warto zauważyć, że tego typu pochodne nie były wcześniej otrzymywane i, że wykazują one dobre właściwości przeciwnowotworowe w stosunku do linii komórkowych gruczolaka pęcherzykowego podstawnej nabłonka A549 oraz gruczolaka piersi MCF-7.

Cennym wkładem w badania reaktywności kompleksów metalokarbonylowych są badania podjęte i opisane w trzeciej części badań własnych. Celem prowadzonych syntez było uzyskanie kompleksów z ligandem difosfinowym w postaci soli z przeciwjonem jodkowym. W zależności od stosunku molowego kompleksu metalokarbonylowego do difosfinoferrocenu powstawały różne produkty. Przy nadmiarze kompleksu tworzył się produkt dwumetaliczny, natomiast w przypadku mieszaniny równomolowej substratów uzyskano produkt difosfinowy - monopodstawiony. W związku z powyższym proszę o dyskusję na temat powodu, dla którego kompleks dwukleszczowy nie powstawał w przypadku zastosowania równomolowej ilości substratów w z ligandami difosfinowymi (schemat 33, str. 54). Zabrakło dyskusji na ten temat w pracy. Zsyntezowane związki wykazywały dobre właściwości przeciwnowotworowe (linie komórkowe A549 oraz HT-29), jednakże charakteryzowały się równocześnie dużą toksycznością w stosunku do

komórek zdrowych. Jest to poważny problem z punktu zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych. Jednakże najnowsze badania pokazują jednak, że enkapsulacja związków w nośnikach oraz zastosowanie terapii celowanej pozwala na zminimalizowanie cytotoksyczności substancji aktywnych.

Ostatnia część badań własnych dotyczy znakowania biocząsteczek i makrocząsteczek kompleksami metalokarbonyłowymi. Podstawą do podjęcia się tych badań były właściwości spektralne tych kompleksów, mianowicie występowanie intensywnych pasm absorpcji charakterystycznych dla drgań wiązań CO w zakresie promieniowania IR. Reakcje znakowania przeprowadzono z udziałem maleimidowych kompleksów karbonylowych rutenu, żelaza i molibdenu. Znakowanymi związkami wielkocząsteczkowymi były zarówno związki naturalne jak białko (albumina wołowa) i dendrymery. Do immobilizacji związków wybrano bioortogonalne metody, spełniające warunki tzw. „zielonej syntezy”. Zalety i innowacyjność zastosowania oraz wybór tych metod Doktorantka przedstawiła wyczerpująco w części literaturowej. Z punktu widzenia zastosowań do immobilizacji znaczników są one niezwykle interesujące. Do immobilizacji kompleksów Autorka wybrała reakcje cykloaddycji SPAAC oraz Dielsa-Aldera z odwrotnym układem elektronowym. Na podstawie przeprowadzonych badań oraz zaawansowanych i złożonych analiz stwierdziła, że reakcja Dielsa-Aldera z odwrotnym układem elektronowym daje lepsze rezultaty sprzęgania zarówno dla kompleksów żelaza jak i rutenu. Natomiast kompleks molibdenowy był najmniej reaktywny i trwały w tych reakcjach. W przypadku obu metod wydajność znakowania była niewielka, stąd też moje pytania, dotyczące w szczególności cykloaddycji SPAAC do pochodnej albuminy wołowej BSA. Czy prowadziła Pani testy reaktywności kompleksów metalokarbonylowych z grupami ADIBO w reakcjach z innymi związkami zawierającymi grupy azydkowe (w mniej skomplikowanych przestrzennie układach), w warunkach prowadzenia reakcji z BSA(N<sub>3</sub>)? Czy środowisko reakcji mogło mieć wpływ na trwałość kompleksów? Interesującym jest fakt rozpadu i eliminacji fragmentu metalokarbonylowego. Co mogło być jego powodem? Ta część pracy obejmuje odrębny i ważny problem badawczy. Przedstawione badania choć nie zakończyły się spektakularnymi wynikami wnoszą cenne informacje na temat możliwości zastosowania reakcji bioortogonalnych w złożonych układach jakimi są związki wielkocząsteczkowe.

Kolejnym rozdziałem rozprawy jest część eksperymentalna. Zawiera ona szczegółowo opisane procedury syntezy, metodologię oczyszczania próbek oraz oznaczeń ilościowych. Syntezy są ilustrowane schematami, a opisy eksperymentów są przygotowane z należytą starannością i poparte charakterystyką fizykochemiczną.

Pragnę zauważyć, że zakres wykonanej, przez Doktorantkę, pracy badawczej, tj. synteza kompleksów metaloorganicznych i metalokarbonylowych, ich modyfikacje oraz analiza wyników badań, w szczególności złożonych związków wielkocząsteczkowych (BSA, dendrymerów i ich pochodnych) wymagała interdyscyplinarnej wiedzy teoretycznej i umiejętności preparatywnych. Doktorantka wykazała się znajomością różnorodnych technik analitycznych na podstawie, których potrafiła opracować wyniki. Charakterystyka związków została przeprowadzona z należytą starannością z użyciem technik spektralnych takich jak NMR (H i P), FT-IR oraz analizy elementarnej, spektrometrii mas. Uzyskane kompleksy poddano badaniom krystalograficznym i obliczeniom teoretycznym. Interpretacja wyników nie budzi zastrzeżeń merytorycznych. Uzyskane związki przebadano pod względem aktywności przeciwnowotworowej na różnych liniach komórkowych.

Na wyróżnienie zasługuje interdyscyplinarność przedstawionych w pracy badań oraz współpraca w ramach ich realizacji z kilkoma grupami badawczymi zarówno w Polsce jak i we Francji (2 staże Erasmus+).

Do tekstu rozprawy zakradła się pewna, niewielka (co warto podkreślić), liczba nieścisłości i błędów, z których kilka z obowiązku recenzenta wymieniam.

Schemat 4 str. 20 tworzenie kompleksu metalu z diketonem zachodzi pod wpływem metalu a nie  $H^+$ , na rysunku jest odwrotnie - strzałki skierowane w nie te strony. Strona 39 w tytule aldehyd jest przez „ch”. Zdarzają się również niedopatrzienia takie jak kropki w miejsce przecinków w danych liczbowych (co prawdopodobnie jest efektem kopiowania danych z publikacji anglojęzycznych) np. str. 44, 47. Na stronie 47 jest „acetylooctanu dietylu” powinno być „acetylooctanu etylu”. Doktorantka zamiennie stosuje odmianę słowa ligand, raz jest „ligandu” innym razem „liganda”. Co do odmiany rzeczowników bezosobowych środowisko naukowe jest podzielone, jednakże sama skłaniam się do jej stosowania. Trafiają się także lapsusy językowe i skróty myślowe jak np. „niecała jedna grupa azydkową” str. 65 „niecałe 4 grupy azydkowe” str. 66; „struktury krystalograficzne”, powinno być „struktury krystaliczne” str. 72 i badania krystalograficzne str. 81. Doktorantka powinna zwrócić uwagę na niepotrzebne spacje w nazwach związków organicznych np. spis odczynników stosowanych do syntez str. 79.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska pani mgr Darii Jamroz zawiera wymagane w rozprawach doktorskich elementy nowości naukowej, co zostało dodatkowo udokumentowane artykułami opublikowanymi w czasopismach o zasięgu międzynarodowym znajdujących się na liście filadelfijskiej. Stanowi ona ważny wkład w rozwój chemii związków metaloorganicznych oraz badań wpływu budowy tych związków na aktywność biologiczną. Zamieszczone uwagi mają charakter formalny oraz wynikają z zainteresowania wynikami pracy. Nie mają one wpływu na bardzo dobrą ocenę merytoryczną badań przedstawionych w ramach rozprawy.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca Pani mgr Darii Jamroz pt. „Półsandwiczowe kompleksy metalokarbonylowe żelaza, molibdenu i rutenu: synteza, reaktywność oraz zastosowanie” spełnia wszystkie wymagania „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003 r i zwracam się do Komisji ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne UŁ Wydziału Chemii o dopuszczenie Pani mgr Darii Jamroz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska, prof. UwB