



RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Darii Jamroz pt.:

**„Półsandwiczowe kompleksy metalokarbonylowe żelaza, molibdenu
i rutenu: synteza, reaktywność oraz zastosowanie w biochemii”**

wykonanej w Katedrze Chemii Organicznej

Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

pod kierunkiem naukowym: dr hab. Bogny Rudolf, prof. UŁ

Rozprawa doktorska Pani mgr Darii Jamroz podejmuje bardzo ważną i aktualną tematykę syntezy i reaktywności kompleksów metaloorganicznych o potencjalnym zastosowaniu w biochemii. Chemia biometaloorganiczna jest nauką interdyscyplinarną łączącą chemię metaloorganiczną, medycynę, biologię i biochemię. Syntetycznie otrzymane koniugaty kompleksów metaloorganicznych ze względu na swoje specyficzne właściwości fizykochemiczne, fotochemiczne i elektrochemiczne mogą być stosowane jako inhibitory enzymów, środki luminescencyjne, katalizatory w żywych komórkach lub środki wspomagające monitorowanie wnętrza komórki. Związki metaloorganiczne są wykorzystywane jako efektywne katalizatory w syntezie związków o pożądanej konfiguracji stereochemicznej oraz w medycynie jako środki przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe, przeciwmalaryczne oraz radiofarmaceutyki. Badania nad syntezą biokoniugatów kompleksów metaloorganicznych wskazują na szerokie ich zastosowanie także jako znaczniki biomolekuł. Większość typowych metod biokoniugacji białek polega na modyfikacji chemicznej lizyny w białkach. Alternatywną metodą koniugacji jest modyfikacja grupy sulfhydrylowej cysteiny. Żadna z tych strategii nie ma jednak zastosowania do znakowania pojedynczej molekuly. Problemem jest interferencja różnych składników w złożonym medium próbki. Rozwiązaniem mogą być nowe metody biokoniugacji opierające się na elementach niewystępujących w przyrodzie. Dobrym rozwiązaniem okazało się wykorzystanie grup funkcyjnych, które wprowadza się do biomolekuł. W tym kontekście wybór tematyki rozprawy doktorskiej mgr Darii Jamroz jest w pełni uzasadniony oraz doskonale wpisuje się w nurt poszukiwań nowych farmaceutyków i narzędzi biotechnologicznych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w formie monografii składającej się ze: streszczenia w j. polskim i angielskim, celu i zakresu pracy, części literaturowej, badawczej oraz eksperymentalnej, podsumowania i wniosków, wykazu skrótów, spisu rysunków, schematów i tabel oraz cytowanej literatury. Praca zawiera 35 rysunków, 61 schematów, 7 tabel oraz 123 pozycje literaturowe. Zakończeniem monografii jest opis dorobku naukowego Autorki. Całość opracowania liczy 132 strony. Praca napisana jest poprawną polszczyzną, a dobrze zaprojektowane rysunki, schematy i tabele ułatwiają czytanie rozprawy i analizę prezentowanych danych. Kolejność rozdziałów jest logiczną konsekwencją realizowanego tematu badań.

Jako **cel pracy** mgr Daria Jamroz wyznaczyła sobie badania reaktywności i zastosowania w biochemii półsandwiczowych kompleksów metaloorganicznych żelaza, molibdenu i rutenu. Realizację postawionego celu przeprowadziła czteroetapowo syntetyzując kompleksy z wykorzystaniem reakcji z β -diketonami, reakcji podstawienia CO ligandem fosforynowym, reakcji podstawienia chlorowca ligandem difosfinowym oraz opracowując nowe bioortogonalne metody wprowadzania znacznika metaloorganicznego do biomolekuł. Podjęła również próbę oceny aktywności biologicznej otrzymanych połączeń. Biorąc pod uwagę potrzebę ciągłego poszukiwania nowych chemioterapeutyków cel pracy jest w pełni uzasadniony, a problem badawczy nadal aktualny.

W **części literaturowej** pracy Doktorantka wykazała się aktualną wiedzą na temat chemii metali przejściowych oraz szczegółowo scharakteryzowała wybrane ligandy występujące w kompleksach metaloorganicznych. Szczegółowo omówiła ligand karbonylowy, fosfinowy, cyklopentadienyłowy oraz β -diketonowy. Wyjaśniła pojęcie chemii biometaloorganicznej oraz podała przykłady zastosowania kompleksów w medycynie i biochemii. W podrozdziale dotyczącym reakcji bioortogonalnych Autorka przedstawiła ogólny schemat i warunki specyficzne reakcji typu „click”. Szczegółowo opisała reakcje cykoladdycji także indukowane światłem. Zakończeniem tej części rozprawy jest omówienie reakcji biokonjugacji katalizowanych metalami przejściowymi oraz reakcji bioortogonalnych, które w ostatnich latach zyskały dużą popularność ze względu na możliwość prowadzenia reakcji chemicznych bezpośrednio w organizmach żywych bez ingerencji w naturalnie zachodzące procesy biologiczne w komórkach. Całość stanowi bardzo dobre wprowadzenie w podjętą tematykę badawczą.

Zasadniczą część rozprawy doktorskiej mgr Darii Jamroz stanowi **Część badawcza**. Badania przedstawione przez Doktorantkę stanowią kontynuację prac nad syntezą i reaktywnością chemiczną kompleksów metalokarbonylowych prowadzonych w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Łódzkiego. Zainteresowania naukowe Doktorantki skupiły

się wokół fotochemicznej reakcji kompleksu $\text{CpFe(CO)}_2\text{I}$ z wybranymi β -diketonami, w wyniku której uzyskano nieoczekiwany produkt charakteryzujący się wymianą wszystkich ligandów. Autorka podjęła próbę wyjaśnienia mechanizmu tej reakcji oraz zbadania analogicznych reakcji dla kompleksu rutenowego. W tym celu Doktorantka zaplanowała i przeprowadziła wszystkie niezbędne syntezy starannie opisując całą procedurę i ilustrując schematami. Otrzymane produkty scharakteryzowała za pomocą widm ^1H NMR i IR, podając charakterystyczne sygnały i pasma absorpcji. Ponadto, Doktorantka przeprowadziła syntezę tradycyjną metodą, a porównanie widm produktów potwierdziło tożsamość uzyskanych związków. W celu optymalizacji warunków reakcji Doktorantka wykonała szereg dodatkowych reakcji jodków metalokarbonylowych z β -diketonami w różnych warunkach, a uzyskane dane podała w tabeli. Potwierdzeniem wysokiego poziomu tego fragmentu dysertacji doktorskiej jest fakt, że Autorka udowodniła, iż oczekiwane produkty reakcji można otrzymać tylko pod wpływem światła. Co więcej wykazała, że czas naświetlania ma wpływ na wydajność reakcji i zaproponowała mechanizm fotochemicznej reakcji jodków metalokarbonylowych z β -diketonami. Doskonałym uzupełnieniem badań jest ocena aktywności biologicznej produktów reakcji.

Kolejny etap rozprawy doktorskiej mgr Daria Jamroz wykonała we współpracy z prof. Nazarovem z Moscow State University. W celu otrzymania kompleksów żelaza i rutenu z fosforynem cukrowym wykonała reakcję fotochemicznej wymiany liganda CO na ligand fosforynowy. W obu przypadkach Doktorantka otrzymała mieszaninę diastereoizomerów, którą zidentyfikowała za pomocą analizy MS, IR, HPLC, widma ^{31}P NMR. Szkoda, że nie udało się rozdzielić poszczególnych izomerów szczególnie w kontekście badań biologicznych.

Kontynuując badania mgr Daria Jamroz opisała kompleksy zawierające ligand difosfinowy, które otrzymała w wyniku katalitycznego podstawienia chlorowca w kompleksach $\text{CpM(CO)}_2\text{I}$ ($\text{M}=\text{Fe}$, Ru). Ze względu na obecność dwóch atomów fosforu w ligandzie difosfinowym możliwe jest otrzymanie dwóch rodzajów soli. Reakcje prowadzono w stosunku równomolowym jak i przy dwukrotnym nadmiarze kompleksu metalokarbonylowego, w wyniku czego otrzymano sole gdzie jeden lub dwa atomy fosforu są skoordynowane z jednym atomem metalu fragmentu CpM(CO)_2 ($\text{M}=\text{Fe}$, Ru). Doktorantka zaproponowała mechanizm reakcji. Całość dowodzi dojrzałości naukowej Doktorantki oraz dobrego przygotowania do prowadzonych badań. Jedynie co mogę zasugerować to uzupełnienie badań nad mechanizmami reakcji o obliczenia teoretyczne oraz dodanie substancji referencyjnej do testów biologicznych.

W ostatniej części swojej pracy Doktorantka zajęła się opracowaniem bioortogonalnych metod wprowadzania znacznika do biomolekuł w reakcjach typu „click” bez użycia metalicznego katalizatora, którym są zazwyczaj toksyczne jony miedzi. W tym celu znacznik zawierający ugrupowanie metalokarbonylowe i pierścień cyklooktynu poddał reakcji cykoladdycji SPAAC ze zmodyfikowanym białkiem i dendrymerem PAMAM-G4 zawierającymi ugrupowanie azydkowe. Zadawalające wyniki Doktorantka uzyskała metodą „one pot” bez oczyszczania produktów pośrednich reakcji. Kontynuując badania mgr Daria Jamroz przeprowadzała reakcję Dielsa-Aldera z cyklopentadienem i furanem. Otrzymane metalokarbonylowe norborneny oraz oksonorborneny poddała reakcji z tetrazyną oraz białkiem zmodyfikowanym tetrazyną. Nowo otrzymane połączenia zostały starannie opisane i scharakteryzowane. Niewątpliwym atutem pracy są pomiary rentgenograficzne oraz obliczenia teoretyczne. Na uwagę zasługuje dokładność i konsekwencja podczas wykonywania zaplanowanych doświadczeń oraz staranność w opracowaniu uzyskanych wyników badań. Całość bez wątpienia dowodzi niezwykłych zdolności analitycznych Doktorantki.

Cześć eksperymentalną rozprawy można podzielić na dwie części: uwagi ogólne oraz część syntetyczną. W pierwszej części Doktorantka zamieściła spis odczynników/rozpuszczalników, określiła sposób kontrolowania postępów reakcji, scharakteryzowała metody identyfikacji nowo otrzymanych struktur podając nazwiska osób, z którymi współpracowała. W dalszej części opisała metody oznaczania: ilościowego kompleksów w koniugatach białka BSA, stężenia zmodyfikowanego białka, stopnia modyfikacji białka oraz proces dializy. Opisy są bardzo dokładne i szczegółowe jedynie w części dotyczącej badań biologicznych zabrakło informacji na temat kierunku badań oraz informacji o metodyce chociażby w formie odnośnika literaturowego.

Druga część dotycząca syntezy napisana jest wręcz wzorowo. Doktorantka szczegółowo opisała wszystkie procedury w sposób staranny i klarowny, podała warunki reakcji pozwalające na śledzenie kolejnych etapów badań, określiła sposób krystalizacji oraz wydajność reakcji. Każdy związek został zidentyfikowany za pomocą nowoczesnych metod spektroskopowych, a odpowiednie dane zostały prawidłowo opisane. Na uwagę zasługuje staranność i szczegółowość zamieszczonych opisów. Ciekawym pomysłem jest zamieszczenie schematów przy poszczególnych syntezach. To znacznie ułatwia czytanie pracy i analizę danych. Całość świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki do prowadzonych badań oraz zaangażowaniu w ich wykonanie. Doktorantka potrafi posługiwać się zaawansowanymi technikami badawczymi i ciągle doskonali swój warsztat badawczy.

W rozdziale „Podsumowanie i wnioski” mgr Daria Jamroz dokonała streszczenia uzyskanych wyników badań. W ramach realizacji przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej Doktorantka:

1. zoptymalizowała i wyjaśniła mechanizm fotochemicznej reakcji kompleksów metaloorganicznych typu $\text{CpM}(\text{CO})_2\text{I}$ z β -diketonami;
2. opracowała metodę wprowadzenia fosforynowej pochodnej cukrowej do kompleksu metalokarbonylowego na drodze fotochemicznej reakcji wymiany;
3. otrzymała kompleksy zawierające ligand difosfinowy w reakcji katalitycznego podstawienia chlorowca;
4. określiła potencjał przeciwnowotworowy otrzymanych połączeń wskazując za najbardziej obiecujące kompleksy posiadające ligand difosfinowy;
5. opracowała dwie metody selektywnego znakowania biomolekuł przy zastosowaniu strategii SPAAC i iEDDA.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że część wyników została opublikowana w czasopiśmie *Applied Organometallic Chemistry* (IF=3,259), a kolejna część jest przygotowywana do druku.

Kolejne rozdziały: 8. **Wykaz skrótów**, 9. **Spis rysunków**, 10. **Spis Schematów** oraz 11. **Spis Tabel** znacznie ułatwiają analizę zamieszczonych w tekście danych i zamieszczonych ilustracji.

Zestawienie wykorzystanych źródeł (rozdział 12. **Literatura cytowana**) obejmuje 123 starannie dobrane pozycje literaturowe. Specjalistyczna bibliografia pokazuje, iż Autorka ma dobre przygotowanie teoretyczne w zakresie prowadzonych badań.

Mgr Daria Jamroz jest bardzo aktywna naukowo, o czym świadczy załączony do tekstu rozprawy punkt 13. **Dorobek Naukowy Autora**. Wykaz osiągnięć na tym etapie kariery jest imponujący. Doktorantka jest autorką 3 opublikowanych publikacji o zasięgu międzynarodowym i jednej w przygotowaniu. Uzyskane w rozprawie wyniki badań prezentowała podczas 17 konferencji krajowych i 7 międzynarodowych. Ponadto, dwukrotnie uzyskała dotacje Projektów dla młodych naukowców, brała udział w praktykach w ramach projektu Erasmus oraz była członkiem komitetu organizacyjnego konferencji naukowych Łódzkiego Sympozjum Doktorantów Chemii. Doktorantka podjęła również dwie próby uzyskania stypendium BGF Doktorat Cotutelle we współpracy w Université Pierre et Marie Curie.

Całość rozprawy doktorskiej oceniam bardzo wysoko. Nieliczne błędy językowe oraz edytorskie, które znalazły się w tekście nie mają wpływu na wartość merytoryczną pracy.

W trakcie czytania rozprawy nasunęły mi się dwa następujące zagadnienia i prosiłabym Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony:

1. Czy widzi Pani możliwość zastosowania otrzymanych znaczników w diagnostyce lub terapii chorób nowotworowych?
2. Czy brała Pani pod uwagę znakowanie izotopowe?

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest przykładem wielowątkowego podejścia do tematu i stanowi doskonale połączenie badań eksperymentalnych ze znajomością zagadnień teoretycznych. Pani mgr Daria Jamroz jasno sformułowała, konsekwentnie realizowała i w całości osiągnęła obrany przez siebie cel. Jego realizacja wymagała od Doktorantki znajomości wielu metod badawczych, technik analitycznych oraz zaawansowanego warsztatu syntetycznego. Uzyskane wyniki badań uważam za wartościowe, ciekawe i wnoszące wkład do nauki. Przedstawiony materiał badawczy spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określonym w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65/03, poz. 595 z późn. zm.). **Dlatego, wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Darii Jamroz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie ze względu na nowatorski charakter, wysoką wartość merytoryczną pracy oraz jej aplikacyjny charakter wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pt.: **„Półsandwiczowe kompleksy metalokarbonylowe żelaza, molibdenu i rutenu: synteza, reaktywność oraz zastosowanie w biochemii”** autorstwa mgr Darii Jamroz.

Lublin, 08.11.2019r.

Kierownik
Samodzielnej Pracowni Radiofarmacji


dr hab. Monika Pitucha