



Wrocław, 23 września 2022 roku

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Marii Mazur

pt. „(Aminometylo)pochodne ferrocenu – synteza, struktura i właściwości biologiczne”

Praca doktorska Pani mgr inż. Marii Mazur zatytułowana „(Aminometylo)pochodne ferrocenu – synteza, struktura i właściwości biologiczne” została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej w Zespole Chemii Metaloorganicznej i Katalizy Homogenicznej pod kierunkiem dr hab. Włodzimierza Buchowicza, prof. PW. Opisane w rozprawie badania wpisują się w najnowszą tematykę badawczą prowadzoną przez prof. W. Buchowicza, który jest ekspertem w obszarze chemii metaloorganicznej pierwiastków bloku d, która obejmuje chemię pochodnych ferrocenu o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym. Ferrocen jest związkami, który intryguje badaczy od czasu jego pierwszej, niezamierzonej, syntezy w 1951 roku. Poznanie budowy cząsteczki ferrocenu oraz jego właściwości fizycznych i chemicznych dało podwaliny wielu nowych obszarów chemii oraz wymagało zredefiniowania pojęcia wiązania chemicznego. Ferrocen oraz inne metalloceny nieustannie fascynują kolejne pokolenia badaczy, czy to ze względu na intrygującą budowę molekularną, czy właściwości fizykochemiczne jak również aktywność katalityczną oraz biologiczną.

W tym kontekście przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Marii Mazur doskonale wpisuje się w ten nurt badań, polegających na poszukiwaniu nowych pochodnych ferrocenu o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej. Praca mgr M. Mazur jest interdyscyplinarna ze względu na połączenie poszukiwań syntetycznych z weryfikacją aktywności biologicznej otrzymanych związków wobec wybranych linii komórkowych.

Celem pracy było otrzymanie i zbadanie właściwości pochodnych ferrocenu z atomem azotu w pozycji β do pierścienia cyklopentadienylowego. Inspiracją do podjęcia tych badań była wysoka aktywność biologiczna tzw. „starych leków”, w których wprowadzono fragment ferrocenowy, jak to ma miejsce w przypadku ferrochiny (pierwowzór molekularny - chlorochina) czy ferrocifenu (pierwowzór molekularny - tamoxifen). W celu zwiększenia potencjalnej aktywności badanych układów jako podstawniki Doktorantka wybrała aminokwas, uracyl oraz grupę aminoallilową, które wykorzystywane są w innych związkach

o właściwościach cytotoksycznych. Takie modyfikacje miały pozwolić, wg Autorki, na poprawienie aktywności biologicznej pierwotnych związków.

Rozprawa doktorska Pani mgr Marii Mazur została napisana w tradycyjnej formie i wydana w formie książkowej. Dysertacja napisana jest w układzie klasycznym i obejmuje: wprowadzenie, przegląd literatury, wyniki badań własnych z dyskusją, podsumowanie i opis procedur eksperymentalnych. Na końcu zamieszczono spis bibliograficzny liczący 197 pozycji literaturowych, natomiast cała praca liczy 130 stron. Część literaturowa podzielona jest na podrozdziały, które w sposób bardziej szczegółowy kategoryzują opisywany przez Doktorantkę obszar badawczy. Z kolei część dotycząca wyników własnych składa się z 3 części, zgodnie z zaproponowanymi grupami związków, z którymi pracowała mgr inż. M. Mazur. Każda z tych części zawiera wprowadzenie, omówienie uzyskanych rezultatów oraz krótkie podsumowanie danej części. Dzięki temu czytelnik ma szansę na szybką orientację w dosyć rozbudowanym tematycznie obszarze badawczym.

We wstępie Autorka przedstawia krótko założenia pracy oraz precyzuje cele, które zamierzała osiągnąć. Lektura przeglądu literatury, na który przypada 38 stron maszynopisu, daje solidne wprowadzenie do obszaru zainteresowań Doktorantki. Część ta jest zwięzłym przeglądem budowy i chemii ferrocenu oraz jego pochodnych, przy czym Autorka skupiła się na metodach syntezy aminowych pochodnych ferrocenu, w których funkcjonalizacji ulegają zarówno jeden, jak i oba pierścienie cyklopentadienylowe. Literatura dotycząca pochodnych ferrocenu jest przebogata, stąd też zrozumiałe jest ograniczenie się do wybranych reakcji pochodnych ferrocenu ściśle związanych z tematem pracy. W kolejnej części przeglądu literaturowego omówione są przykłady biologicznie aktywnych związków metaloorganicznych i koordynacyjnych, które znalazły zastosowanie w medycynie. Cisplatyna oraz jej analogi stanowią dla Autorki punkt odniesienia w tej części. Skuteczność cisplatyny jest jednak ograniczona, a toksyczność związków platyny skłania do poszukiwań alternatywnych układów aktywnych. Metyloaminowe pochodne ferrocenu, ze względu na niską toksyczność dla zwierząt, są obiektem szerokich badań. Wzrost zainteresowania aminowymi pochodnymi ferrocenu nastąpił po wprowadzeniu ferrochiny jako czynnika antymalarycznego. Do tej pory mechanizm cytotoksycznego działania pochodnych ferrocenowych nie jest w pełni poznany, dlatego projektowanie kolejnych układów o potencjalnej aktywności jest raczej oparte na metodzie „prób i błędów”, jednak wzbogacanie znanych już leków fragmentami ferrocenowymi często okazuje się skuteczną strategią. Przegląd literatury czyta się z dużą przyjemnością, gdyż nie przytłacza ilością informacji, natomiast daje klarowny obraz aktualnego stanu wiedzy. W tej części pracy zabrakło mi podrozdziału omawiającego podstawy metod służących do badania aktywności biologicznej związków wobec bakterii, grzybów czy linii komórkowych. W części poświęconej badaniom własnym Autorka kilkakrotnie odwołuje się do takich

eksperymentów, natomiast omawiane linie komórkowe, które były stosowane, czy parametry aktywności są czytelne już tylko dla fachowców z tego obszaru.

Opis wyników własnych przedstawiony jest na 43 stronach i został podzielony na trzy ścieżki tematyczne. Pierwsza część dotyczy hybryd ferrocen-aminokwas-uracylu. Połączenia ferrocenu z uracylem stanowią słabo zbadany obszar. Za tym podejściem przemawiała aktywność biologiczna pochodnych uracylu. Spodziewano się tu efektu synergicznego a dodatkowo przyjęto, że aminokwasowe ramię mogłoby zapewnić obecność pożądaných grup aminoferrocenowych. Niestety pomimo zastosowania różnorodnych podejść syntetycznych to zadanie okazało się trudne do zrealizowania dla prostszych aminokwasów. Dopiero wykorzystanie metody *click*, zaowocowało otrzymaniem hybryd ferrocen-aminokwas-uracylu połączonych łącznikiem triazolowym. Związki te udało się wyizolować z satysfakcjonującymi wydajnościami i scharakteryzować spektralnie oraz rentgenostrukturalnie. Badania aktywności biologicznej nie wykazały aktywności cytotoksycznej tych koniugatów wobec komórek nowotworowych glejaka, ani wobec wybranych szczepów bakterii czy drożdży. Rezultaty osiągnięte przez Autorkę w tej części wzbogacają warsztat syntetyczny i pokazują, że uzyskanie założonego celu syntetycznego zazwyczaj wymaga pewnej korekty pierwotnie założonego kursu.

W kolejnym podejściu Doktorantka skupiła swoje wysiłki syntetyczne na wprowadzeniu motywu *ansa*[n]-ferrocenu, w których pierścienie cyklopentadienylowe połączone są mostkami alifatycznymi. Ta grupa związków metaloorganicznych również wykazuje obiecujące właściwości biologiczne, prawdopodobnie ze względu na nierównoległe ułożenie pierścieni cyklopentadienylowych wymuszone przez łącznik alifatyczny. Wykorzystanie podstawionych pochodnych *ansa*[n]-ferrocenu skutkowało wprowadzeniem chiralności do cząsteczek. W wyniku tych badań Autorka otrzymała najpierw izomeryczne pochodne aldehydowe w postaci racematów **129** i **130**, które rozdzieliła i scharakteryzowała spektralnie oraz rentgenostrukturalnie. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na błąd na **rysunku 8**, na którym omyłkowo przedstawiono strukturę koniugatu z uracylem, natomiast podpis rysunku wskazuje na widmo racemicznego związku **129**. Ze względu na brak symetrii w cząsteczkach, widma protonowe okazały się trudne w interpretacji. W tym miejscu sugerowałbym wykorzystanie korelacyjnych metod 2D NMR w celu bardziej jednoznacznego przypisania odpowiednich sygnałów na widmach. Dla związku racemicznego (\pm)-**129** podjęto próby rozdzielenia enancjomerów, które zaowocowały wzrostem nadmiaru enancjomerycznego. W kolejnym etapie racemat (\pm)-**129** poddano analogicznym modyfikacjom z wykorzystaniem reakcji *click*, jak w przypadku aldehydu ferrocenowego, w celu otrzymania chiralnych koniugatów ferrocen-uracylu z mostkiem triazolowym. W wyniku tych prac otrzymano i wyizolowano odpowiedni racemiczny koniugat (\pm)-**139**, który został scharakteryzowany spektralnie. Ponownie w tym miejscu zabrakło analizy 2D NMR w celu bardziej jednoznacznego

przypisania sygnałów widmowych. Rozdział ten jest podsumowany badaniami aktywności biologicznej otrzymanych koniugatów wobec różnych linii komórkowych wybranych nowotworów (rak piersi czy rak płuc). W toku tych badań wykazano większą aktywność pochodnej *ansa*-ferrocenowej aniżeli analogicznej pochodnej ferrocenu (bez mostka alifatycznego pomiędzy pierścieniami cyklopentadienylowymi). Nie mamy jednak informacji o aktywności czystych optycznie enancjomerów związku **139**. Tu pojawia się pytanie do Autorki, czy takie próby były podejmowane w trakcie realizacji projektu.

W trzeciej części badań własnych mgr inż. M. Mazur skupiła się na amino-allilowych pochodnych ferrocenu jako nieco mniej złożonych związkach amino-ferrocenowych o potencjalnej aktywności biologicznej. Za cel postawiono sobie otrzymanie mono- i dipodstawionych pochodnych aminoallilowych ferrocenu lub *ansa*-ferrocenu. W reakcji aldehydu ferrocenowego z aminami allilowymi w obecności $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (aminowanie redukcyjne) otrzymano 3 pochodne monopodstawione **141a-141c** z różnymi podstawnikami na atomie azotu. Analogiczna procedura z wykorzystaniem monoaldehydu *ansa*-ferrocenowego również pozwoliła na otrzymanie racemicznych produktów (\pm)-**146a** i (\pm)-**146b** z dobrymi wydajnościami. Synteza dialliloaminowej pochodnej ferrocenu sprawiła pewne trudności, jednak odpowiednie produkty otrzymano z przeciętnymi wydajnościami (16-41%). Ciekawy wynik uzyskano w reakcji dialdehydu ferrocenowego z równomolową ilością N-alliloaminy w warunkach aminowania redukcyjnego. W efekcie wyizolowano aza-*ansa*[3]-ferrocen z dobrą wydajnością (50%). Związek ten został scharakteryzowany spektralnie i rentgenostrukturalnie.

Najważniejszym elementem tej części były próby przeprowadzenia diaminoallilowych pochodnych ferrocenu w odpowiednie *ansa*-ferroceny w reakcji metatezy z zamknięciem pierścienia. Zadanie to udało się osiągnąć dla pochodnej z podstawnikiem fenyłowym w obecności katalizatora Grubbsa II generacji. Autorka przeprowadziła modelowe eksperymenty stechiometryczne w celu zrozumienia przyczyn braku reaktywności pozostałych pochodnych z innymi podstawnikami ($\text{R} = \text{H}, \text{Me}$). Jako przyczynę uznano blokowanie miejsca koordynacyjnego rutenu w katalizatorze Grubbsa a przez to zablokowanie cyklu katalitycznego reakcji. Widma NMR dla reakcji stechiometrycznej w tym układzie wskazują na utworzenie karbenu tylko w niewielkim stopniu, stąd być może diamina blokuje więcej niż jedno miejsce koordynacyjne rutenu i zachowuje się jak ligand N,N-bischelatowy. Próbą obejścia tego problemu było przeprowadzenie aminy w sole amoniowe, jednak nie doprowadziło to do poprawienia reaktywności. Ta część również jest podsumowana badaniami aktywności biologicznej otrzymanych pochodnych metyloaminoallilowych ferrocenu. Aktywność cytotoksyczna tych związków była zbliżona do pozostałych cząsteczek opisanych w tej rozprawie. Pewnym zaskoczeniem była niska cytotoksyczność aza-*ansa*-ferrocenu.

Metodologia zastosowana w pracy skupiona jest na syntezie organicznej, katalizie oraz kilku metodach analitycznych. Część eksperymentalna pracy zawiera bardziej szczegółowy opis

substancji oraz stosowanych procedur przez Autorkę. Nowe pochodne były oczyszczane i analizowane z wykorzystaniem metod spektroskopii NMR (^1H i ^{13}C) oraz spektrometrii mas, natomiast krystaliczne pochodne były badane rentgenostrukturalnie. Ta część pracy wykonana została bardzo solidnie i nie budzi żadnych wątpliwości.

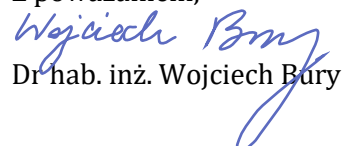
Od strony technicznej rozprawa jest napisana bardzo poprawnie i nie sprawia czytającemu problemów w analizie treści. W mojej opinii rozprawa nie zawiera istotnych błędów językowych, możemy jednak napotkać pewną liczbę sformułowań żargonowych w opisach widm. Tu jedynie wspomnę, że na schemacie 2, przedstawiającym rotację pierścieni cyklopentadienylowych, konformery zostały podpisane odwrotnie (D_{5h} vs. D_{5d}) ale jest drobna pomyłka. Część graficzna rozprawy jest wykonana bardzo starannie, rysunki i schematy są klarowne i czytelne.

Na dorobek naukowy Doktorantki, który stał się podstawą rozprawy doktorskiej, przypadają 3 publikacje w renomowanych czasopismach międzynarodowych: *ChemistrySelect* (2019), *Dalton Trans.* (2020) oraz *Eur. J. Inorg. Chem.* (2022), oraz jedna praca w zeszytach naukowych UMK. We wszystkich tych pracach doktorantka jest wiodącą autorką, co dodatkowo zostało poświadczane odpowiednimi oświadczeniami. W sumie Pani M. Mazur jest współautorką 4 opublikowanych prac w czasopismach międzynarodowych. Niestety zabrakło informacji o wystąpieniach konferencyjnych Doktorantki, na których prezentowane były wyniki badań, jednak ze względu na okres pandemiczny ta forma prezentacji mogła być mocno ograniczona. Istotnym faktem jest **wyróżnienie pracy z Dalton Trans. na okładce** tego czasopisma w formie grafiki prezentującej pojedynkę warszawskiej Syrenki (symbol wielofunkcyjnego leku) z bazyliiszkiem (zapewne to symbol nowotworu).

Podsumowując, w świetle powyższych faktów stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca mgr Marii Mazur spełnia wymagania, określone w obowiązujących przepisach. W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Marii Mazur do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na zgromadzony materiał doświadczalny oraz multidyscyplinary charakter pracy, a także niewątpliwy dominujący wkład Doktorantki w przygotowanie publikacji naukowych w międzynarodowych czasopismach o istotnym wkładzie (sumaryczny $\text{IF} > 9$), wnioskuję również do RND o rozpatrzenie wyróżnienia tej rozprawy. Opracowanie nowatorskich sposobów tworzenia koniugatów w oparciu o poznane już leki jest bardzo ważnym aspektem zarówno od strony poznawczej, jak również zastosowań chemii organicznej i koordynacyjnej w nowoczesnych terapiach przeciwnowotworowych, co jest ogromną zaletą przedstawionej pracy.

Z poważaniem,


Dr hab. inż. Wojciech Bury