



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

dr hab. Katarzyna Kurpiewska, prof. UJ
Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii
Zakład Krystalochemii i Krystalofizyki
Zespół Biokrytalografii
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
email: katarzyna.kurpiewska@uj.edu.pl

Kraków, 27.01.2025 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Karoliny Doroty Kałduńskiej**

**pt.: „*Synteza i badania strukturalne biomimetycznych kompleksów żelaza(III) i
miedzi(II)*”**

1. Przedmiot recenzji

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Karoliny Doroty Kałduńskiej stanowiąca podstawę w procedurze uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie chemia wykonana została w Zakładzie Krystalochemii i Biokrytalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem promotora Prof. dr hab. Andrzeja Wojtczaka i promotorki pomocniczej dr Anny Kozakiewicz-Piekarz. Tematyka rozprawy doktorskiej porusza istotne zagadnienia związane z zaprojektowaniem i otrzymaniem kompleksów metali żelaza(III) i miedzi(II) pełniących rolę biomimetyków metaloenzymów, odpowiednio dioksygenaz i oksydazy katecholowych. Inspiracją prac badawczych Doktorantki były procesy utleniania katecholi do chinonów z udziałem tlenu cząsteczkowego przeprowadzane przez związki kompleksowe w sposób imitujący działanie enzymów. Cechą wyróżniającą zaprojektowane związki spośród bogatej biblioteki substancji, których syntezy rozpoczęto już w latach 80-tych, było wykorzystanie N₂O-donorowych ligandów w związkach kompleksowych żelaza(III) i miedzi(II) oraz N₂O₂-donorowego liganda w syntezie związków z kationem miedzi (II).

Wykazano, iż związki chemiczne będące biomimetykami odgrywają kluczową rolę w badaniach nad procesami biologicznymi, dostarczając modeli naśladujących działanie naturalnych systemów enzymatycznych. Opracowanie strukturalnie i funkcjonalnie związków imitujących naturalne biomolekuły, wspiera rozwój wiedzy o mechanizmach biochemicznych oraz procesach katalitycznych zachodzących w organizmach żywych. Symulacja aktywnych centrów enzymów pozwala na opracowanie nowych materiałów katalitycznych wspomagających projektowanie procesów przemysłowych minimalizujących zużycie drogich lub trudno dostępnych materiałów, a zdolność biomimetyków do naśladowania złożonych

procesów biologicznych czyni je niezastąpionym narzędziem w chemii biologicznej. Wspomniane walory biomimetyków zachęcają więc do podjęcia pogłębionych badań, które pozwolą na pełniejsze wykorzystanie ich potencjału. Z tego punktu widzenia konieczne jest opracowanie skutecznych metod otrzymywania tego typu związków o jak najwyższej aktywności. Biorąc pod uwagę toksyczne i mutagenne działanie katecholi na organizmy żywe, zidentyfikowanie związków biomimetycznych mających zdolność do utleniającej konwersji polifenoli stanowi ciekawy i ważny problem badawczy. Zgłębienie wiedzy w tym obszarze zainspirowało Doktorantkę do podjęcia badań, których **podstawowym celem było opracowanie nowych połączeń fragmentów organicznych z żelazem(III) lub miedzią (II), które mogłyby naśladować biologiczną aktywność wybranych enzymów, dla których substratem jest katechol.**

Z formalnego punktu widzenia oceniana rozprawa doktorska zawarta jest na 291 stronach maszynopisu i posiada układ typowy dla opracowań opartych na eksperymencie (wykaz skrótów, część literaturową, cel pracy, część eksperymentalną, wyniki i dyskusję, wnioski, streszczenie, anglojęzyczny abstract, spis tabel, spis rysunków oraz bibliografię licząca 141 pozycji literaturowych). Pracę kończy dorobek publikacyjny Doktorantki zawierający 3 publikacje.

Dysertacja rozpoczyna się *Częścią literaturową* i niezwykle szczegółową analizą obecnego stanu wiedzy, w którym Doktorantka na 60 stronach, w oparciu o 117 pozycji literaturowych zaprezentowała przegląd dotychczasowych osiągnięć spójnych z jej planami badawczymi, a dokładniej koncepcji projektowania biomimetyków żelaza (III) i miedzi (II). Ta wnikliwa analiza doprowadziła Autorkę do wniosku, iż wiele czynników może wpływać na aktywność projektowanych związków i racjonalne zaprojektowanie tego typu połączeń nie jest łatwym zadaniem. W świetle przeprowadzonych badań w ramach rozprawy doktorskiej ten fragment jest bardzo istotny, gdyż pozwala w pełni docenić wkład zaplanowanych przez Doktorantkę badań skupionych na poszerzeniu wiedzy na temat opisanej grupy biomimetyków. Ponadto, to staranne i dojrzałe przygotowanie teoretyczne do wykonania badań własnych pozwoliło Doktorantce na sformułowanie w kolejnym rozdziale *Celu pracy*. Autorka pokreśliła, iż przeprowadzone studia literaturowe wyraźnie wykazały brak doniesień dla interesującej grupy ligandów, i to właśnie ta luka zainspirowała ją do skoncentrowania swoich prac badawczych na wykorzystaniu N_2O -donorowych ligandów oraz N_2O_2 -donorowego liganda w syntezie nowych związków biomimetycznych, naśladujących miejsca aktywne dioksygenaz i oksydaz katecholowych.

Część eksperymentalną otwiera wykaz odczynników zastosowanych w trakcie badań, po którym Doktorantka niezwykle oszczędnie opisała metody wykorzystane do charakterystyki otrzymanych związków oraz systematycznie przedstawiła przebieg wykonanych syntez, podając wyniki analizy spektroskopii rezonansu magnetycznego oraz analizy elementarnej **dla 27 zasad Schiffa będących pochodnymi trzech amin: 3-(dimetyloamino)-1-propylaminy – ligandy S6-S14 (9 związków), 2-(dimetyloamino)etyloaminy – ligandy S16-S24 (9 związków) i 2-(dietyloamino)etyloaminy S26-S34 (9 związków).** W tym miejscu zaznaczę, że lista ligandów nie zawiera numerów od 1 do 5 oraz 15 i 25. Budowę ligandów Autorka potwierdziła

spektroskopią NMR, spektroskopią w podczerwieni oraz analizą elementarną. Należy z podziwem odnieść się do liczby przeprowadzonych syntez, jednak powielenie w niemal wszystkich fragmentach tych samych lub podobnie brzmiących sformułowań nie ułatwia lektury tej części pracy. Może lepszym pomysłem w tym przypadku byłoby przedstawienie opisu syntez w formie zbiorczej np. tabelarycznej.

Najobszerniejszy rozdział *Wyniki i dyskusja* zawiera przede wszystkim rzetelny opis wyników badań strukturalnych związków, dla których Doktorantce udało się wykonać syntezę i otrzymać monokryształy. Opis związków kompleksowych o potencjale biomimetycznym Autorka rozpoczęła od wyników zakończonych sukcesem eksperymentów strukturalnych dla związków kompleksowych żelaza(III) z ligandami MB1 i MB2 otrzymanymi od dr hab. Magdaleny Barwiołek. Autorce udało się otrzymać **4 produkty**: 2 monojądrowe i 2 dijądrowe związki z żelazem(III), w których gdzieś dodatkowe miejsce w sferze koordynacyjnej zajmowały aniony Cl^- lub cząsteczka rozpuszczalnika. Ponieważ związki dijądrowe były nietrwałe, pomiary aktywności przeprowadzone zostały tylko dla związków monojądrowych i nie potwierdziły ich zdolności do przekształcenia pochodnej katecholu do chinonu.

Kolejny rozdział o numerze 17 poświęcony opisowi wyników uzyskanych dla 7 z 27 zsyntezowanych zasad Schiffa w mojej ocenie jest nadmiernie szczegółowy. Zgadzam się, że otrzymanie ligandów stanowiło ważny etap w osiągnięciu celu, niemniej jednak tak drobiazgowo analiza struktury otrzymanych ligandów znacznie rozbudowuje dysertację, której najważniejszymi wynikami są zaprojektowane związki kompleksowe. Ligandami, które Autorce udało się wykrystalizować były **4 pochodne 2-(dimetyloamino)etyloaminy** (S17, S18, S19 i S23) oraz **3 pochodne 2-(dietyloamino)etyloaminy** (S24, S27 i S28). Pomimo licznych prób Doktorantka nie otrzymała kryształów ligandów będących pochodną propylaminy. Myślę, że rozbudowany opis dla 5 ligandów, które pojawiły się w docelowych związkach kompleksowych oraz zamieszczenie skróconego opisu dla 2 pozostałych z odpowiednim komentarzem Autorki lub przeniesienie części danych (zwłaszcza tych, które nie wnoszą istotnych informacji) do materiałów dodatkowych pracy zaprezentowanych np. w formie aneksu, pozwoliłoby na korzystne skondensowanie dysertacji. Wykonany przegląd bazy CSD pozwolił na zidentyfikowanie analogicznej struktury (kod WEVDEH) do tej otrzymanej dla związku S19.

Wykorzystując ciekawe podejście w syntezie zaprojektowanych połączeń, a dokładniej wykonywanie syntezy zasad Schiffa *in situ* bezpośrednio przed syntezami docelowych związków kompleksowych część z otrzymanych ligandów utworzyło połączenia z żelazem(III) lub miedzią(II). W dalszej części dysertacji bazując na samodzielnie otrzymanych zasadach Schiffa Autorka otrzymała **3 struktury** zawierające żelazo(III): S17-Fe o wzorze ogólnym kationu $[\text{Fe}(\text{L})_2\text{Cl}_2]^+$, S19-Fe oraz S29-Fe o wzorze $[\text{Fe}(\text{L})\text{Cl}_2]$, przy czym otrzymana struktura S19-Fe została przez Doktorantkę zidentyfikowana w bazie CSD oznaczonej kodem UKICUM. Przedstawiona w dalszych częściach analiza aktywności kompleksów S17-Fe, S19-Fe i S29-Fe ujawniła aktywność wobec modelowego substratu 3,5-di-*tert*-butylokatecholu (3,5-DTBC). W mojej ocenie bardzo wartościowym fragmentem pracy są eksperymenty związane z otrzymaniem kompleksów typu **S-Fe-CAT**, które doprowadziły do wyznaczenia **7 struktur**

połączeń tego typu z ligandami: S7 i S9 (wzór ogólny kationu $[\text{Fe}(\text{L})_2(\text{CAT})]^+$), dla połączeń z S17 i S18 otrzymano związki typu $[\text{Fe}(\text{L})_2(\text{CAT})]$. Dla ligandów S27 (dwie struktury różniące się rozpuszczalnikami) oraz S28 otrzymano struktury kompleksów dijądrowych według wzoru $[\text{Fe}_2(\text{L})_2(\text{CAT})_2]$. Co ciekawe struktury krystaliczne układów żelazo(III)-ligand-katechol otrzymano tylko dla ligandów, które w pierścieniach aromatycznych w pozycjach 3 i 5 zawierają podstawniki chlorkowe, bromkowe bądź grupy *tert*-butylowe. Możliwość przeanalizowania przestrzennego układu ligandów w obecności skoordynowanego katecholu z pewnością pozwoliło na głębsze zrozumienie warunków w jakich dochodzi do przyłączenia potencjalnego substratu i ułatwiło końcową dyskusję.

W przypadku eksperymentów z wykorzystaniem miedzi(II) jako jonu centralnego Autorka otrzymała monokryształy dla **13 związków kompleksowych** Cu(II) z ligandami S6 do S9, S22, S26 do S29, S31 do S34, dla których wykonała badania strukturalne. Także w tym przypadku Doktorantka pogrupowała otrzymane kompleksy ze względu na otoczenie jonu centralnego. I tak: do gr I o ogólnym wzorze $[\text{Cu}(\text{L})\text{Cl}_2]$ przypisany został związek S9-Cu; do gr II o wzorze $[\text{Cu}_3(\text{L})_2\text{Cl}_4]$ zaklasyfikowano związki S22-Cu, S32-Cu i S34-Cu; gr III o wzorze $[\text{Cu}(\text{L})_2]\text{Cl}_2$ została zaobserwowana dla połączeń S7-Cu i S8-Cu. Do gr IV o wzorze $[\text{Cu}_2(\text{L})_2\text{Cl}_4]$ przypisano związek S26-Cu, natomiast w ostatniej najliczniejszej grupie V o wzorze $[\text{Cu}(\text{L})\text{Cl}]$ znalazły się związki S6-Cu, C27-Cu, C28-Cu, C29-Cu, S30-Cu oraz S33-Cu. W wyniku przeszukania bazy CSD spośród otrzymanych przez Autorkę struktur odnaleziono strukturę związku S7-Cu o kodzie BUDHAK oraz S27-Cu o kodzie XICHAT. Autorka konsekwentnie opisała i graficznie przedstawiła sposób koordynacji centralnego kationu miedzi, natomiast analiza ΔA wykazała wartości powyżej 1 dla związków S6-Cu i S9-Cu oraz powyżej 0.5 dla S7-Cu, S22-Cu, S32-Cu oraz S34-Cu. Dla pozostałych kompleksów miedzi opisanych w rozdziale 20.1 otrzymano wartości w zakresie 0.340 (S8-Cu) do 0.032 (S28-Cu). Podsumowując dla wszystkich 16 otrzymanych związków biomimetycznych żelaza(III) lub miedzi(II) Autorka wykazała aktywność względem 3,5-DTBC potwierdzając jednocześnie ich zdolność do konwersji zgodnej z działaniem oksydaz katecholowych. Żaden z badanych biomimetyków nie wykazał aktywności podobnej do dioksygenaz katecholowych.

Fascynującym jest fakt, że w otrzymanych związkach kompleksowych obserwujemy szereg geometrycznych sposobów w jaki jon centralny jest koordynowany, począwszy od konformacji płaskiego kwadratu (S7-Cu, S8-Cu, S22-Cu, S27-Cu do S29-Cu, S31-Cu do S34), zdeformowanej huśtawki (S6-Cu i S9-Cu), przez piramidę kwadratową (MB1-diFe, MB2-Fe, MB2-diFe, 29-Fe) i bipiramidę trygonalną (S19-Fe, S26-Cu), kończąc na zdeformowanym oktaedrze (MB1-Fe, S17-Fe). W tym miejscu warto zaznaczyć, że w miejscach aktywnych naśladowanych metaloenzymów kation żelaza wykazuje najczęściej koordynację zdeformowanej bipiramidy trygonalnej, natomiast kationy miedzi otoczone są atomami formującymi piramidę trygonalną. Biorąc pod uwagę ten aspekt, tylko w strukturze S19-Fe żelazo posiada podobną konformację do jonu w miejscu aktywnym enzymu i konsekwentnie wykazuje wysoką wartość ΔA . Natomiast zaskakujące są wyniki aktywności dla kompleksów miedzi(II), dla których udało się uzyskać kryształy, a tym samym wyodrębnić związki z roztworów i wykonać pomiary widm UV-vis. Analiza geometrii i aktywności w tym przypadku

nie wykazała bowiem wyraźnej korelacji. Kontynuując lekturę rozprawy docieramy do cennego i interesującego fragmentu, w którym Autorka dokonała wizualizacji struktur w reprezentacji van der Waalsa. Zawarte w tej części rozważania uważam za cenne dopełnienie dyskusji nad sterycznymi ograniczeniami wpływającymi na możliwość konwersji 3,5-DTBC. Muszę również przyznać, że wobec tak bogatych i zróżnicowanych wyników znalezienia zależności czy prawidłowości stanowiło dla Autorki niełatwe zadanie, jednak czytając wnioski dostrzegamy biegłość Doktorantki nie tylko w przeprowadzaniu syntez, ale również w interpretacji złożonych informacji w sposób logiczny i spójny. Co więcej, część uzyskanych wyników naukowych Doktorantka z powodzeniem opublikowała w wieloautorskim artykule w czasopiśmie *Materials*, z którego pochodzi część rysunków i schematów zamieszczonych również w recenzowanej dysertacji.

Kontynuując niniejszą recenzję pragnę zwrócić uwagę, że koncepcja pracy jest poprawna i przemyślana. Praca zawiera bogaty oraz wartościowy materiał eksperymentalny udokumentowany tabelami, wykresami, rysunkami, widmami ^1H NMR, FT-IR oraz UV-ViS. W swojej dysertacji Doktorantka wykazała się umiejętnością: **i)** sformułowania problemu badawczego; **ii)** planowania eksperymentów i ich przeprowadzania; **iii)** doboru właściwych metod badawczych; **iv)** wnikliwej analizy otrzymanych wyników; **v)** poprawnego wnioskowania oraz oceny otrzymywanych wyników na tle danych literaturowych.

Podsumowując, należy stwierdzić, że w czasie realizacji badań i eksperymentów zaplanowanych w ramach przedłożonej rozprawy doktorskiej, **Pani mgr Karolina Kałduńska osiągnęła założony cel główny pracy, a uzyskane i opublikowane wyniki mają duże znaczenie poznawcze i, przede wszystkim, praktyczne.** Do najważniejszych osiągnięć niniejszej dysertacji zaliczyć należy:

1. Wykonanie syntezy 27 zasad Schiffa będących źródłem ligandów w docelowych związkach kompleksowych oraz przeprowadzenie analizy 7 struktur wykrystalizowanych ligandów.
2. Uzyskanie 16 związków kompleksowych typu Fe(III)- lub Cu(II)-ligand oraz 8 połączeń typu Fe(III)-ligand-katechol w formie monokryształów i przeprowadzenie dla nich eksperymentów krystalograficznych.
3. Wykazanie, że otrzymane biomimetyki wykazują aktywność oksydaz katecholowych oraz potwierdzenie analizą strukturalną uzyskanych produktów będących wynikiem reakcji 3 badanych związków biomimetycznych z 3,5-DTBC.
4. Sformułowanie wniosków dotyczących architektury otrzymanych związków kompleksowych pod kątem rodzaju jonu metalu i jego sfery koordynacyjnej, a także wpływu efektów elektronowych i sterycznych na strukturę zaprojektowanych biomimetyków.

2. Uwagi o charakterze merytorycznym

Pomimo wysokiej jakości badań przedstawionych w dysertacji, do jej treści wkradły się nieścisłości, a niektóre fragmenty wzbudziły dodatkową recenzencką ciekawość, dlatego wymagają one dyskusji, wyjaśnienia lub rozwinięcia w czasie publicznej obrony:

1. W pracy, pomimo tytułu, trudno doszukać się wprost definicji „biomimetyku” i przykładów najnowszych osiągnięć w tej dziedzinie. Proszę o wyjaśnienie i doprecyzowanie tego terminu oraz krótkie zaprezentowanie doniesień ukazujących niezwykle potężny potencjał biomimetyków.
2. W *Części literaturowej* zamieszczono wzory ligandów budujących związki biomimetyczne analizowane w ramach przeglądu literaturowego, natomiast nie zaprezentowano ani jednego przykładu pełnej struktury biomimetyku otrzymanego przez innych autorów.
3. W opisie metody zastosowanej do badania aktywności (str. 114) zabrakło odnośnika, który pozwoliłby na zapoznanie się z procedurą zaproponowaną w literaturze, tym samym w dysertacji nie znajdujemy informacji o zastosowanym stężeniu substratu oraz uzasadnienia śledzenia postępu reakcji przez 2h (w części doniesień czas badania aktywności był znacznie dłuższy).
4. W opisie sposobu prowadzenia eksperymentów rentgenograficznych podano wykorzystanie promieniowania Cu, natomiast w Tabeli 1 (str. 118) jako źródło promieniowania odnajdujemy Mo. Proszę wyjaśnić od czego zależało użycie danego rodzaju promieniowania.
5. Proszę o wyjaśnienie z czego wynikają raportowane w plikach checkcif ostrzeżenia związane z brakującymi refleksami np. w pliku dla S7-Cu (608 refleksów) czy dla S8-Cu (143 refleksy)?
6. Mając do dyspozycji zarejestrowane zmiany absorbancji odzwierciedlające rosnące stężenie produktu (str. 241-242) zaskakujący jest brak analizy ΔA w funkcji czasu pod kątem szybkości reakcji.
7. Dlaczego nie przeprowadzono pomiarów dla zmieniającego się stężenia substratu, które pozwoliłyby na obliczenie parametrów kinetycznych V_{max} , K_m i K_{cat} w oparciu o podejście Michaelisa-Menten? Uzyskane wartości pozwoliłyby na porównanie z danymi literaturowymi i ocenę aktywności otrzymanych związków na tle biomimetyków opisanych w części literaturowej.
8. Biorąc pod uwagę kłopoty z otrzymaniem kryształów czy rozważała Pani uzyskanie modeli teoretycznych kwantowymi metodami obliczeniowymi?

3. Uwagi językowe i edytorskie

Zwyczajowo recenzenci w swych recenzjach starają się znaleźć w tekście drobne niezręczności. Takich w pracy niestety jest sporo i chociaż nie umniejszają one wysokiej wartości recenzowanej przeze mnie dysertacji zwrócę uwagę na kilka najważniejszych:

1. W pracy napotyka się na brak konsekwencji w stosowaniu czasu teraźniejszego i przeszłego. Jest to szczególnie częste w *Części literaturowej* gdzie Autorka opisuje wyniki badań raportowanych przez innych naukowców.
2. W wielu miejscach skrót bazy Protein Data Bank jest błędnie podawany jako PBD. W rozprawie zmienia się również zapis oznaczający dziesiątą część liczb.
3. W początkowej części pracy Autorka zapisuje słowo Autorzy z dużej litery, by w późniejszych fragmentach stosować zapis z małej litery.

4. Niestety w treści dysertacji występują błędy interpunkcyjne, błędy stylistyczne i kilka ortograficznych.

Należy również podkreślić, że rysunki zawarte w pracy przygotowane są niezwykle starannie, a w czasie recenzji nie stwierdzono innych, istotnych błędów edytorskich i językowych.

4. Podsumowanie

Wymienione wyżej uwagi nie obniżają bardzo dobrej oceny przeprowadzonych badań. Podsumowując należy stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdzające wiedzę i umiejętność posługiwania się współczesnymi metodami do rozwiązywania problemów naukowych z pogranicza chemii i biologii. Jednocześnie wkład Pani Karoliny Kałduńskiej w projektowanie i charakterystykę biomimetyków żelaza(III) i miedzi(II) oceniam jako istotny i oryginalny. **Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Karoliny Kałduńskiej spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018. Poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Wydziału Chemii UMK w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Kałduńskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**