

Lublin, dnia 28.01.2025

Prof. dr hab. Anna E. Kozioł

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Doroty KAŁDUŃSKIEJ

pt.

SYNTEZA I BADANIA STRUKTURALNE BIOMIMETYCZNYCH KOMPLEKSÓW ŻELAZA(III) I MIEDZI(II)

Rozprawa została wykonana przez Doktorantkę pod opieką naukową prof. dr. hab. Andrzeja Wojtczaka oraz dr Anny Kozakiewicz-Piekarz. Badania były przeprowadzone w Zakładzie Krystalochemii i Biokrystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Badania zawarte w tej rozprawie można traktować jako badania podstawowe w zakresie zaawansowanej chemii koordynacyjnej o znaczeniu biochemicznym.

Formalna charakterystyka pracy. Rozprawa doktorska jest napisana w języku polskim w formie monografii zawierającej 291 stron. W tym tekście część literaturowa to 60 stron, część eksperymentalna – 182 strony, z czego opis wyników badań zajął 146 stron. Praca ma klasyczny układ treści: *wstęp literaturowy – cel – badania własne – podsumowanie – spis odnośników*. Kolejnymi rozdziałami są:

1. Wstęp – jest wprowadzeniem do charakterystyki dioksygenaz katecholowych i oksydazy katecholowej, które katalizują degradację katecholu (benzeno-1,2-diolu), a przede wszystkim jest tu omówienie wiedzy o biomimetycznych kompleksach żelaza i miedzi, pozwalających na badanie mechanizmów działania tych metaloenzymów *in vitro*. **2.** Cel pracy, materiały i metody stosowane do syntezy i charakterystyki związków. **3.** Opis syntezy ligandów i kompleksów oraz sposobu krystalizacji. W kolejnych podrozdziałach analizowane są struktury poszczególnych układów wyznaczone metodami rentgenografii strukturalnej i aktywność kompleksów wobec 3,5-di-*tert*-butylokatecholu (3,5-DTBC). **4.** Dyskusja i podsumowanie – gdzie opisany został wpływ modyfikacji ligandów na strukturę sfer koordynacyjnych jonów metali i, w konsekwencji, na wydajność reakcji utleniania. **5.** Ostatnie rozdziały to bibliografia (liczba odnośników – 141) oraz spisy tabel i rysunków.

Dokumentacja naukowa rozprawy została uzupełniona danymi w formie elektronicznej. Są to pliki dokumentujące badania 37 monokryształów metodami rentgenografii strukturalnej (formaty plików: *cif* i *checkcif*).

Ocena merytoryczna pracy

Celem pracy była synteza i przebadanie aktywności nowej grupy biomimetycznych kompleksów żelaza(III) i miedzi(II) jako analogów miejsc aktywnych enzymów – dioksygenaz katecholowych i oksydazy katecholowej. W centrach aktywnych tych metaloprotein znajdują się głównie jony żelaza, miedzi oraz manganu, wanadu lub niklu. Liczne doniesienia literaturowe wskazują, że budowa ligandów w związkach biomimetyków kompleksowych odgrywa kluczową rolę w aktywności oraz mechanizmach konwersji

katecholi. To stanowiło podstawę do zaprojektowania nowych ligandów *N,O*-donorowych z grupy zasad Schiffa. Dioksygenazy katecholowe, w zależności od mechanizmu konwersji substratu, można podzielić na dioksygenazy intradiolowe i ekstradiolowe. Dioksygenazy intradiolowe katalizują rozszczepienie wiązania C1–C2 w pierścieniu aromatycznym katecholu, a głównym produktem jest kwas *cis,cis*-mukonowy. W przypadku mechanizmu ekstradiolowego rozszczepienie następuje na wiązaniu C2–C3 pierścienia aromatycznego, a produktem jest semialdehyd kwasu 2-hydroksymukonowego. W strukturach tych enzymów charakterystyczne jest koordynowanie jonu Fe(III) dwoma wiązaniami Fe–N do reszt histydyny oraz wiązaniami Fe–O z resztami aminokwasowymi lub cząsteczkami wody. Natomiast oksydazy katecholowe katalizują utlenienie grup hydroksylowych katecholu do grup karbonylowych, a jedynym produktem reakcji jest chinon. W centrum katalitycznym zawierają one dwa jony miedzi(II). Każdy jon miedzi(II) jest stabilizowany poprzez trzy wiązania koordynacyjne do reszt histydynowych Cu–N_{his}.

Z tego względu uznaje się, że zasady Schiffa dobrze naśladują centra aktywne metaloenzymów, a ponadto możliwe jest stworzenie nowych wariantów ligandów z różnymi układami atomów chelatujących. Badane były ligandy trój-, cztero- i pięciokleszczowe o atomach koordynujących N₃, N₂O, NO₂, N₄, N₃O, N₂O₂, NO₃ oraz N₂O₂S. We wstępie Doktorantka omawia opisane dotychczas ligandy i ich biomimetyczne kompleksy z kationami żelaza i miedzi. Bardzo obszerny jest przegląd budowy ligandów, stereochemii kompleksów, a w szczególności sfer koordynacyjnych kationów, i zależności ich aktywności katalitycznej od tych czynników. Podkreślana jest też rola środowiska (rozpuszczalników) w przebiegu reakcji utleniania katecholi. Omówiona powyżej część literaturowa pracy jest merytorycznie we fragmentach tożsama z opublikowaną pracą przeglądową autorstwa Karoliny Kałduńskiej, Anny Kozakiewicz, Magdaleny Wujak i Andrzeja Wojtczaka, pt. *Biological Inspirations: Iron Complexes Mimicking the Catechol Dioxygenases*. **Materials** (2021) 14, 3250 [odnośnik 2].

Bazując na tych informacjach, mgr Karolina Kałduńska zaprojektowała cząsteczki nowych ligandów do utworzenia kompleksów zmieniających geometrię 'kieszeni wiążącej'. Opracowała syntezę zarówno ligandów jak i kompleksów, metodykę badania składu i struktury nowych związków oraz procedurę badania degradacji 3,5-di-*tert*-butylo-katecholu (3,5-DTBC). Szczegóły tych badań Doktorantka prezentuje w części eksperymentalnej.

W swoich badaniach użyła Ona dwie symetryczne N₂O₂-donorowe chelatujące pochodne z grupami fenolowymi i iminowymi – otrzymane w zaprzyjaźnionym zespole, a samodzielnie syntezowała 27 zasad Schiffa, które są potencjalnie N₂O-donorowe. Rdzeniem tych cząsteczek był układ fenolu podstawionego w pozycji C2. Otrzymała trzy serie ligandów, które są pochodnymi 3-(dimetyloamino)-1-propyloaminy, 2-(dimetyloamino)etyloaminy i 2-(dietyloamino)-etyloaminy, posiadającymi mniejsze grupy funkcyjne podstawione do pierścienia aromatycznego (-OH, -CH₃, -OCH₃, NEt₂, *t*-Bu, -Cl, -Br). Budowa otrzymanych zasad Schiffa została potwierdzona z wykorzystaniem analizy elementarnej, spektroskopii ¹H i ¹³C NMR, i spektroskopii w podczerwieni. Związki ligandów z pierwszej grupy pochodnych to substancje oleiste, dla drugiej grupy Doktorantka otrzymała 5 monokryształów, a z trzeciej grupy krystaliczny był tylko jeden, pozostałe produkty były olejami. Jednak otrzymane monokryształy też nie były trwałe w temperaturze powyżej 7°C.

Na dalszym etapie prac zostały podjęte próby syntezy kompleksów wszystkich ligandów z jonami żelaza(III) i miedzi(II). Mgr Karolina Kałduńska otrzymała w formie krystalicznej 3 kompleksy Fe(III) (o kodach: S17-Fe, S19-Fe i S29-Fe) oraz 13 kompleksów Cu(II) (S6-Cu, S7-Cu, S8-Cu, S9-Cu, S22-Cu, S26-Cu, S27-Cu, S28-Cu, S29-Cu, S31-Cu, S32-Cu, S33-Cu i S34-Cu). Z kolei syntezy kompleksów z dwoma ligandami – zasadą Schiffa

i katecholem jako substratem – miały być dowodem na możliwość włączenia tego ostatniego w miejsce katalityczne biomimetyków. W tym zadaniu z sukcesem udało się otrzymać Doktorantce 8 kompleksów, a były to jedynie kompleksy z jonem Fe(III) (S7-Fe-CAT, S9-Fe-CAT, S17-Fe-CAT, S18-Fe-CAT, S19-Fe-CAT, S27-Fe-CAT-H₂O, S27-Fe-CAT-MeOH i S28-Fe-CAT). Otrzymanie w tych samych warunkach krystalicznego kompleksu z jonem miedzi(II) zawierającego katechol nie było możliwe. Przeprowadzone procedury krystalizacji ligandów i kompleksów, pozwoliły na uzyskanie kryształów (w liczbie 8 + 24), dla których mogły być wykonane pomiary dyfrakcyjne i pełna charakterystyka strukturalna. Mgr Karolina Kałduńska podkreśla, że nie wszystkie kryształy były stabilne, co stwarzało duże trudności w wykonaniu precyzyjnych pomiarów.

W opisie struktury kryształów poszczególnych związków Doktorantka podała charakterystykę sieci krystalicznej, pełne dane analizy strukturalnej czyli parametry pomiaru i udokładniania struktury. Z kolei dla cząsteczek ligandów i kompleksów wykonana została bardzo szczegółowa analiza geometrii ligandów, wielościanów koordynacyjnych jonów centralnych, a także analiza oddziaływań międzycząsteczkowych, ze szczególnym uwzględnieniem wiązań wodorowych i kontaktów pomiędzy fragmentami aromatycznymi. Jeśli w części symetrycznie niezależnej kryształu występowały dwie jednostki chemiczne, porównywana była ich budowa, co pozwoliło na zasugerowanie tworzenia się form tautomerycznych zasad Schiffa (np. dla ligandu S17). Pokazano, że otrzymane kompleksy w fazie stałej są jedno-, dwu- a nawet trójrdzeniowe. Jednocześnie z prezentacją danych strukturalnych dla poszczególnych kryształów, dokonywane były w wielu wypadkach porównania dwu lub więcej pochodnych. Przykładem tego niech będzie rozdział 20.1 opisujący badania struktury kompleksów Cu(II); zajmuje on 35 stron, co jest równoważne zawartości obszernej publikacji.

W końcowej części pracy mgr Karolina Kałduńska, dla 16 otrzymanych związków miedzi(II) i żelaza(III) potwierdziła aktywność wobec modelowego związku – 3,5-di-*tert*-butylokatecholu (3,5-DTBC) – monitorując przebiegi reakcji z użyciem widm UV-VIS. Pojawienie się pasma z maksimum przy ok. 400 nm potwierdziło, że głównym produktem konwersji 3,5-DTBC przez zastosowane nowe kompleksy jest 3,5-di-*tert*-butylochinon (3,5-DTBQ). Co istotne, udało się Jej potwierdzić obecność 3,5-DTBQ w mieszaninie poreakcyjnej po przeprowadzonej reakcji konwersji, ponieważ otrzymała monokryształy zawierające ten związek. Budowa cząsteczki 3,5-DTBQ w uzyskanych kryształach została jednoznacznie potwierdzona za pomocą badań strukturalnych.

Najlepszą aktywność wśród wszystkich badanych związków wykazywał kompleks S6-Cu, którego ligand zawierał fenol podstawiony w pozycji C4 grupą hydroksylową. Najmniej aktywny był kompleks S28-Cu, z podstawnikami -Br w pozycjach C3 i C5 pierścienia fenolu. Wśród kompleksów żelaza(III) najlepszą aktywność wykazał S19-Fe, w którym ligand ma grupy *tert*-butylowe w pozycjach C3 i C5. W efekcie badań aktywności katalitycznej 16 układów względem 3,5-DTBC nie zaobserwowano zmian spektralnych charakterystycznych dla biomimetyków dioksygenaz katecholowych. To jednoznacznie wskazuje, że wszystkie otrzymane kompleksy żelaza(III) i miedzi(II) z zaprojektowanymi do celów doktoratu ligandami N₂O-donorowymi wykazują aktywność zgodną z mechanizmem oksydazy katecholowej. Natomiast badane na wstępie prac symetryczne czterokleszczowe kompleksy N₂O₂-donorowe nie współkoordynują z katecholem i nie wykazują żadnej aktywności katalitycznej.

Doktorantka wnioskuje też, że: *Analiza otrzymanych wyników wskazuje na korelację aktywności katalitycznej otrzymanych związków z ich budową. Uzyskane wyniki wskazują, że obecność niezwiązanej sprotonowanej grupy aminowej znacząco wpływa na zwiększenie aktywności otrzymanych kompleksów, podczas gdy elektronoakceptorowe właściwości podstawników chlorkowych i bromkowych w pierścieniu aromatycznym obniżają aktywność.*

Badania wykazały, że obecność mostka propylodiaminowego w strukturze liganda powoduje zwiększenie efektywności katalizatora w porównaniu ze związkami zawierającymi mostek etylenodiaminowy.... Wyniki powyższych analiz potwierdzają, że otrzymano ligandy, które po skompleksowaniu zarówno z jonami Cu(II) jak i Fe(III) tworzą selektywne biomimetyki działające zgodnie z mechanizmem analogicznym do mechanizmu oksydaz katecholowych.

Powyższe wnioski bazują na danych eksperymentalnych, wśród których jest 37 analiz strukturalnych monokryształów (w tym 32 nowe) oraz badania aktywności 16 kompleksów (*vide*: załączona tabela). Jak widać, ambitne założenia Doktorantki, aby scharakteryzować otrzymywane związki strukturalnie jako fazy krystaliczne, były ograniczane przez zdolności tych związków do tworzenia periodycznych asocjatów w fazie stałej.

Charakterystyka redakcji tekstu

Istotnych błędów merytorycznych w tekście rozprawy doktorskiej nie znalazłam, jest napisana logicznie i poprawną polszczyzną. Zauważyłam kilka przypadków niedostatków interpunkcyjnych, jakimi są braki przecinków przed wyrazami *który* i *że* oraz w zdaniach złożonych zawierających imiesłowowy równoważnik zdania (np. „...*wiąże się z jonami Fe(III), tworząc izomer..*”, str. 45).

W części literaturowej, gdzie omawiane są znane już ligandy, ich kompleksy oraz własności, związki numerowane są w dość przypadkowy nieciągły sposób, co sugeruje, że Doktorantka zebrała większą ilość informacji a potem analizowała je i prowadziła selekcję, nie mając czasu na usystematyzowanie tej numeracji. Podobnie w części eksperymentalnej widoczne jest, że wstępne badania obejmowały większą ilość prób syntezy ligandów a w pracy znajdują się tylko te, które zakończyły się pozytywnym wynikiem. Zapewne brak czasu spowodował niedokończenie ujednolicania nazewnictwa danych, co nie umniejsza wartości zamieszczonych wyników.

Doktoratka wymienia metody analityczne jakie były zastosowane w pomiarach wykonanych w laboratorium wydziałowym (analiza elementarna, rezonans magnetyczny, spektroskopia FT-IR; str. 84), natomiast używa formy bezosobowej, opisując metodykę analizy rentgenografii strukturalnej i spektrometrii UV-Vis. Przypuszczam, że te eksperymenty Doktorantka wykonywała samodzielnie.

Na kilku stronach tekstu pojawiają się niezbyt precyzyjne wyrażenia lub braki, np.:

- Str. 30 – *ma pięciokoordynacyjną sferę koordynacyjną w kształcie ...*
- Str. 37 (60, 67, 73) – *ligandy ... zostały związane w kompleksy (w kation kompleksowy)...*
- Str. 54 – *możliwość koordynacji katecholi z dwoma metalami jednocześnie ...*
- Str. 86 – jednocześnie wymieniane są nazwy *katechol* i *benzeno-1,2-diol*
- Str. 86, 87 – *efekty wizualne pozostały takie same jak w przypadku ...* (może: zmiana barwy, zabarwienia?)
- Str. 165 – *w części asymetrycznej znajdują się dwie połówki kationu ...*
- Str. 176 – *przewodzone reakcje mogą być bardzo długie*
- Str. 205 – *zawierają one pierwszą grupę otrzymanych kompleksów o ogólnym wzorze ...*
- Str. 207 – *w części asymetrycznej znajduje się cała trójjądrowa molekula ...*
- Str. 208 – *Długość wiązania pomiędzy aminowym atomem azotu a centrum koordynacji jest mniejsza niż długość wiązania z azotem aminowym.*
- Str. 135 – brak odnośników do cytowanych analiz strukturalnych o REFCOD-ach BOXVAL i BOXVEP
- Str. 197-8 – brak odniesienia w tekście do bardzo istotnego Rysunku 67
- Str. 213 – zły podpis pod Rysunkiem 74

Str. 229 – niejasne odniesienie do rysunku ?

Uwagi i pytania

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Kałduńskiej jest wyjątkowo obszerna (290 stron). Może to być oceniane całkowicie rozbieżnie, w zależności od punktu widzenia. Albo niezbyt pozytywnie – jako wyraz nieumiejętności syntetycznego opisu obszernych badań. Lub też jako całościowe ujęcie zagadnienia, poczynając od przedstawienia motywacji i celu badań, przez szczegółowy opis syntezy i analityki wybranych związków, po dyskusję wyników i przedstawienie udokumentowanych konkluzji. Ja wybieram tę drugą wersję, tym bardziej, że badania własne Doktorantki nie zostały jeszcze opublikowane, zapewne z powodu obowiązujących terminów przedłożenia przed Radą pracy doktorskiej.

Doktorantka porównuje struktury kryształów S19, S19-Fe, S27-Cu i M1/M2 z odpowiednimi danymi z bazy CSD: WEVDEH, UKICUM, XICHAT oraz MIPYES, pisząc, że „jest to struktura analogiczna”, a są to identyczne związki. Różne były jedynie temperatury pomiarów dyfrakcyjnych, co skutkuje spodziewaną zmianą objętości komórek elementarnych. W związku z tym szczegółowe porównania geometrii cząsteczek są absolutnie zbędne w kontekście głównego celu tej pracy.

Str. 215 – może porównanie sfer koordynacyjnych kationu Cu1 z Cu2 wykazałoby lepsze podobieństwo struktur S7-Cu i S8-Cu, niż to na Rysunku 75, gdzie są zestawienia Cu1/Cu1 i Cu2/Cu2?

Str 218 – pomyłony jest kod kompleksu porównywanego ze strukturą BUDHAK; zamiast S7-Cu podany jest S27-Cu. A oprócz tego wytłumaczenie różnic strukturalnych jest niezbyt precyzyjne. Czy mogę prosić o wyjaśnienie?

Doktorantka podała informację, że kryształy ligandów były nietrwałe w temperaturze powyżej 7° C. Jak były one przygotowywane do pomiaru na dyfraktometrze po wyjęciu z chłodziarki?

Wnioski końcowe. Dobór bardzo obfitego i jednocześnie jednolitego materiału chemicznego oraz odpowiednia metodyka badań umożliwiły uzyskanie jednoznacznych wyników i ich spójną dyskusję. Efektem pracy mgr Karoliny Kałduńskiej jest otrzymanie 27 nowych zasad Schiffa oraz próby użycia ich jako ligandów do syntezy biomimetycznych kompleksów z kationami Fe(III) i Cu(II). Następnie, dobranie warunków krystalizacji, aby określić strukturę cząsteczek organicznych i sfer koordynacyjnych jonów. Docelowym eksperymentem było zbadanie zdolności tych kompleksów do utleniania katecholu oraz określenie produktu, co dało odpowiedź na pytanie o mechanizm konwersji. Powyższe wyniki badań stanowią znaczący wkład w osiągnięcia nauki, a w szczególności chemii strukturalnej i biochemii. Doktorantka w swoich badaniach udowodniła aktywność katalityczną nowych kompleksów żelaza i miedzi z zasadami Schiffa jako biomimetyków oksydazy katecholowej. Powiązała zależność tej aktywności z budową chemiczną ligandów. Jest to istotny element nowości naukowej. Badania strukturalne tych faz krystalicznych i wynikające z nich wnioski mogą posłużyć do prac aplikacyjnych jak i dalszych projektów w zakresie celowych modyfikacji budowy tej grupy ligandów i kompleksów.

Posumowanie opinii. Należy podkreślić, że prezentowana dysertacja mgr Karoliny Kałduńskiej ukazuje ją jako osobę naukowo twórczą i gwarantującą wykonanie rzetelnych badań na wysokim poziomie. Zrealizowała Ona zaplanowane zadania swojego doktoratu przedstawionego w celu uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplina nauki chemiczne.

Jej rozprawa doktorska zatytułowana „*Synteza i badania strukturalne biomimetycznych kompleksów żelaza(III) i miedzi(II)*”, którą Rada Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przedstawiła mi do oceny, spełnia wszelkie wymogi określone w *Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym* (art. 13 ust. 1) z dnia 14 marca 2003 r. (tekst jednolity: Dz.U. poz. 1789, z dnia 27 września 2017 r.) oraz w *ustawie Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (art. 179; Dz.U. poz. 1669; z dnia 3 lipca 2018 r.).

Na tej podstawie wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Karoliny Doroty Kałduńskiej do publicznej obrony.

/Anna E. Koziół/

Zbadane fazy krystaliczne (mgr Karolina D. Kałduńska)

37 analiz – w tym 32 nowe badania strukturalne

	ligand	Cu	badana aktywność	Fe	Fe CAT	uwagi
MB1				+ / + DI		
MB2				+ / + DI		
S6		+	+			
S7		+	+		+	
S8		+	+			
S9		+	+		+	
S10						
S11						
S12						
S13						
S14						
S16						
S17	+			+ +	+	
S18	+				+	
S19	+ WEVDEH			+ + UKICUM		powtórzone
S20						
S21						
S22		+	+			
S23	+					
S24	+					
S26		+	+			
S27	+	+ XICHAT powtórzone	+		+ / +	H ₂ O / MeOH solwaty
S28	+	+	+		+	
S29		+	+	+ +		
S30						
S31		+	+			
S32		+	+			
S33		+	+			
S34		+	+			
M1	+ MIPYES					M1 ≡ M2
M2	+ MIPYES					powtórzone
M3	+					