

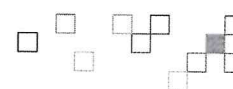


Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Zabiszaka pt. *Badanie reakcji kompleksowania oraz słabych oddziaływań kwasów pochodzenia naturalnego i poliamin*

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Chemii Koordynacyjnej, Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Renaty Jastrząb jako promotora oraz Dr Małgorzaty Kaczmarek jako promotora pomocniczego. Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy aktualnych i ważnych, zarówno w aspekcie poznawczym, jak i praktycznym zagadnień związanych charakterystyką reakcji kompleksowania oraz słabych oddziaływań kwasów pochodzenia naturalnego i poliamin. Szczególnie te ostatnie są bardzo istotne z uwagi na możliwość efektywnej diagnostyki chorób nowotworowych oraz kontrolowania procesu leczenia. Z procesem tym wiąże się także duże nadzieje na opracowanie skutecznych i nowych leków. Stąd temat ten od wielu lat budzi duże zainteresowanie w kręgach naukowych i dlatego też główne cele pracy jakie postawił przed sobą Doktorant obejmowały:

- 1) Wyznaczenie stałych trwałości kompleksów molekularnych w układach podwójnych poliamina/ α -hydroksykwas,
- 2) Wyznaczenie stałych trwałości związków kompleksowych jonów *d*- i *f*-elektronowych w układach podwójnych z aminami biogennymi oraz α -hydroksykwasami;
- 3) Badanie reakcji kompleksowania w układach potrójnych poliamina/ α -hydroksykwas/ion metalu;
- 4) Wyznaczenie stałych trwałości kompleksów powstających w układach potrójnych oraz badania spektroskopowe wpływu bioligandów na otoczenie koordynacyjne atomu centralnego.

Rozprawa zredagowana jest w sposób ogólnie przyjęty, z podziałem na część teoretyczną i doświadczalną. Całość liczy 197 stron, z czego 40 stron zajmuje część literaturowa, 131 część eksperymentalna, na 17 stronach umieszczono literaturę. Doktorant zamieścił w pracy także cel i wykaz stosowanych skrótów. Bibliografia zawiera 225 dobrze dobranych pozycji literaturowych, a także 115 rysunków oraz 27 tabel. Dogodnym z punktu widzenia czytelnika i recenzenta jest



umieszczenie dorobku naukowego Doktoranta w formie kopii publikacji naukowych. Świadczą one o tym, że uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki zostały już opracowane i mogą być przedstawione szerszemu gronu odbiorców.

Część teoretyczną rozpoczyna krótki wstęp (w języku polskim i angielskim), po którym czytelnik, w rozdziale II może zapoznać się z w poliaminami i ich znaczeniem biologicznym (podrozdział 2.1). Doktorant do najważniejszych amin biogennych zalicza putrescynę, spermidynę i sperminę. Występowanie w/w związków w organizmach żywych jest istotne z uwagi na słabe oddziaływania z białkami, kwasami nukleinowymi i fosfolipidami, co przyczynia się do zmiany ich stężenia w stanach chorobowych. Kontrola tego procesu wraz z określeniem rodzaju i stężenia towarzyszących enzymów może stanowić efektywny sposób diagnozowania chorób nowotworowych, głównie płuc, prostaty, piersi i skóry oraz monitorowania procesu leczenia.

Z podrozdziału 2.2 pt. *Poliaminy i ich związki a choroby nowotworowe* dowiadujemy się m.in., że wzrost stężenia poliamin zależy od typu nowotworu i stopnia zaawansowania choroby. Istotnym jest fakt, że biogenne poliaminy i ich pochodne tworzą związki kompleksowe z platyną, której cytostatyczne właściwości wynikają z oddziaływań z donorowymi atomami azotu N(7) i N(1) guanozyny wchodzącej w skład DNA. Nadzieję pokłada się w polirdzeniowych związkach Pt(II) z poliaminą typu BBR3464, kompleksach N1N11-bis(etylo)norsperminy z Pd(II) i to przy uzyskaniu jednocześnie zmniejszonej neuro- i nefrotoksyczności oraz nabytej odporności.

W podrozdziale 2.3 pt. *Kwasy pochodzenia naturalnego oraz ich rola w organizmach żywych* zamieszczone zostały informacje dotyczące podstawowych α -hydroksykwasów – glikolowego, mlekowego, migdałowego, winowego, jabłkowego i cytrynowego. Kwasy te zwane popularnie owocowymi pełnią ważną rolę w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym, spożywczym, tekstylnym i w produkcji detergentów. Są także niezmiernie istotne dla zdrowia organizmów żywych, z uwagi na ich uczestnictwo w cyklach Krebsa, Coricha, w fotooddychaniu, produkcji enzymów i udział w fotosyntezie. Dlatego też bardzo ważne jest poznanie mechanizmów ich oddziaływania z biocząsteczkami. W podrozdziale 2.4 opisane zostały oddziaływania niekonwencjonalne w układach biologicznych. Oddziaływania elektrostatyczne, van der Waalsa, typu *stacking* oraz wiązania wodorowe pełnią istotną rolę w procesach biochemicznych i biologicznych dzięki zwiększeniu trwałości i stabilizacji struktury przestrzennej

i rozpoznaniu molekularnym oraz tworzeniu połączeń kompleksowych. Stanowią także podstawę do projektowania nowych leków. Oddziaływania elektrostatyczne występują pomiędzy ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi DNA oraz sprotonowanymi poliaminami, stabilizują także termicznie DNA. W procesach tych bardzo ważną rolę pełnią jony metali. Dlatego też podrozdział 2.5 poświęcony został roli jonów metali (zarówno *d*- jak i *f*-elektronowych) w procesach biochemicznych i medycynie. Uwzględnione zostały procesy utrzymania równowagi kwasowo-zasadowej, stałego ciśnienia osmotycznego, replikacji i transkrypcji DNA, syntezy białek, obecności w niektórych witaminach (B_{12} tzw. kobalamina), enzymach (ureaza, hydrogenaza, dehydrogenaza, dysmutaza ponadtlenkowa), związkach typu hemoglobina, a także prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego, oddechowego, kostno-szkieletowego, sercowo-naczyniowego oraz procesy odnowy tkanek i utrzymania dobrej kondycji skóry. Szczególną uwagę poświęcono jonom $Co(II)$, $Ni(II)$, $Cu(II)$ oraz $Ln(III)$. Przykładowo miedzioproteiny typu 1, 2 i 3-go odpowiedzialne są za przenoszenie elektronów w procesach fotosyntezy, za odwracalny proces nieenzymatycznego wiązania tlenu z udziałem hemocyjanin, są składnikami oksydazy cytochromowej i dysmutazy ponadtlenkowej, które biorą udział w przemianach aerobowych. Z kolei rola jonów lantanowców opiera się na podobieństwie do jonów $Ca(II)$ (podobna wartość promieni jonowych i podobna trwałość związków kompleksowych). Blokowanie kanałów transportu jonów $Ca(II)$ wykorzystuje się m.in. w projektowaniu sond do badania mitochondriów, czy leczeniu dystrofii mięśniowej w chorobie Duchennego. Jony lantanowców inhibują działanie enzymów zależnych od jonów $Ca(II)$ jak, np. cytochromu P450. Są także, tak jak związki gadolinu, ceru i terbu, kluczowe jeśli chodzi o diagnostykę, monitorowanie i leczenie chorób nowotworowych, obrazowanie zmian chorobowych metodą rezonansu magnetycznego MRI, w szczególności w chorobach serca, nerek, nadnerczy, wątroby, ośrodkowego układu nerwowego i układu mięśniowo-stawowego.

Część literaturowa jest przejrzysta, zawarte w niej są najistotniejsze informacje związane z analizowanym tematem. Ich zestawienie utwierdza czytelnika w przekonaniu, że Doktorant potrafi krytycznie analizować literaturę przedmiotu i dobierać te informacje, które są istotne z punktu widzenia uzyskanych wyników.

Kolejną częścią rozprawy doktorskiej mgr Michała Zabiszaka jest *Cel pracy* (Rozdział III) i *Część doświadczalna* (Rozdział IV). Doktorant stawia przed sobą zadanie zbadania oddziaływań w kompleksach molekularnych w układach podwójnych i potrójnych jonów *d*- oraz *f*-elektronowych tj. Cu(II), Co(II), Ni(II), La(III), Nd(III), Eu(III), Gd(III), Tb(III), Ho(III), Lu(III) z poliaminami biogennymi i α -hydroksykwasami. W grupie badanych związków znalazły się putrescyna (Put), spermidyna (Spd) i spermina (Spm) oraz kwasy – glikolowy (Gly), winowy (Tar) i cytrynowy (Cit), przy czym azotany(V) putrescyny, spermidyny i sperminy zostały syntezowane przez Doktoranta. W ramach przeprowadzonych badań zarejestrowano widma w zakresie widzialnym i nadfiolecie UV-Vis, w podczerwieni FT-IR, widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR oraz widma luminescencyjne. Dla uzyskanych kompleksów przeprowadzono także badania składu metodą analizy elementarnej CHN. Imponująca jest ilość układów wytypowanych do analizy, plan wyznaczenia charakterystycznych parametrów i weryfikacji właściwości badanych połączeń kompleksowych. Dane te zestawione są w rozdziale V - *Dyskusja wyników*. Przedstawiono tu wyznaczone stałe protonowania ligandów – kwasów glikolowego, winowego oraz cytrynowego. Wykorzystane zostały także wcześniej wyznaczone w Zakładzie Chemii Koordynacyjnej Wydziału Chemii UAM stałe protonowania badanych poliamin. Przedstawione zostały krzywe dystrybucji poszczególnych form poliamin i α -hydroksykwasów w zależności od wartości pH tj. tzw. wykresy specyacyjne. Wyznaczono stałe hydrolizy badanych jonów metali, wartości ogólnych stałych trwałości adduktów oraz stałe równowagi reakcji tworzenia adduktów w układach poliamina – α -hydroksykwas tj. putrescyna-kwas glikolowy Put/Gly, putrescyna-kwas winowy Put/Tar i putrescyna-kwas cytrynowy Put/Cit. Doktoran wykazał istnienie adduktów i zasadniczą różnicę pomiędzy ligandami Gly i Tar, a Cit. Analogiczne dane uzyskano dla układów z spermidyną i sperminą. Istotnym jest wykazanie wzrostu udziału bioligandów w tworzeniu adduktów typu (PA) H_x (AHA) z α -hydroksykwasami zawierającymi w swej strukturze dodatkowe, potencjalne ujemne centra oddziaływań, przy czym wzrost efektywności tworzenia poszczególnych adduktów można uszeregować następująco: Gly > Cit > Tar dla Put, Tar > Cit > Gly dla Spd oraz Cit > Tar > Gly dla Spm, przy 1 centrum oddziaływań dla Gly, 2 dla Tar i 3 dla Cit trzy. Stałe równowagi tworzenia adduktów z kwasem glikolowym maleją w szeregu (Put) H_2 (Gly) > (Spm) H_2 (Gly) > (Spd) H_2 (Gly) i dla dwóch ostatnich sugerują podobny typ oddziaływań. Omówiono także reakcje

kompleksowania w układach podwójnych z jonami metali *d*-elektronowych. Wyznaczono ogólne stałe trwałości i stałe równowagi reakcji kompleksów różnego typu. Metodą IR i EPR potwierdzono obecność poszczególnych form, ze zwróceniem uwagi na zmianę sfery koordynacyjnej atomu centralnego oraz zaproponowano otoczenie koordynacyjne dla poszczególnych układów, a w szczególności form dimerycznych. Bardzo istotne są widma emisji zarejestrowane dla jonów Eu(III) i analiza intensywności pasm charakterystycznych podczas wzbudzenia próbek roztworów długością fali λ 394 nm w rejonie przejść ${}^5D_0-{}^7F_j$, gdzie $j=0,1,2,3,4$, a w szczególności ${}^5D_0-{}^7F_1$, ${}^5D_0-{}^7F_2$, która pozwoliła na ocenę wpływu poszczególnych ligandów na wewnętrzną sferę koordynacyjną przy różnych wartościach pH występowania form kompleksowych. Ta część badań zasługuje na szczególne wyróżnienie i wnosi zasadniczą wagę do uzyskanych wyników.

Ponadto wykazano, że największe powinowactwo do α -hydroksykwasów wykazują jony Cu(II), a stopień deprotonacji w/w kwasów wpływa na typ tworzących się związków kompleksowych. W przypadku poliamin wykazano, że kompleksy w układach Co(II) i Ni(II) z Put występują w niewielkich stężeniach, w przeciwieństwie do tych z Spd. W przypadku jonów *f*-elektronowych wzięto pod uwagę jony La(III), Nd(III), Eu(III), Gd(III), Tb(III), Ho(III) i Lu(III). Dla układów z kwasem glikolowym zaobserwowano tworzenie się osadu dla pH powyżej 8,0, a ponadto niewielki stopień udział w/w jonów w procesie kompleksowania. W przypadku kwasu winowego były to kompleksy typu $\text{Ln}(\text{Tar})(\text{OH})$, $\text{Ln}(\text{HTar})_2$, $\text{Ln}(\text{Tar})_2$ i $\text{Ln}(\text{Tar})_2(\text{OH})_x$, dla $x=1, 2$, przy czym dla La(III) obserwuje się jedynie formy zawierające w strukturze jeden ligand w formie anionu winianowego. Ogólnie wyższy jest także procent skompleksowanych jonów lantanowców w porównaniu z kwasem glikolowym. Dla kwasu cytrynowego dominującą formą dla niskich wartości pH jest $\text{Ln}(\text{HCit})$, przy pH 5,5 tworzą się kompleksy typu $\text{Ln}(\text{Cit})$. Ogólnie należy stwierdzić, że w zależności od jonu lantanowca, zakresu pH oraz formy w jakiej występuje dany α -hydroksykwas występują różne typy kompleksów. Dla reakcji kompleksowania w układach potrójnych uwzględniono zarówno jony *d*- jak i *f*-elektronowe. Szczególnie interesujące okazały się wyniki badań dla jonów lantanowców w układach potrójnych, gdzie jedynie dla nielicznych układów zaobserwowano tworzenie się osadów.

Końcowy rozdział *Podsumowanie* poświęcony omówieniu uzyskanych wyników. Mgr Michał Zabiszak trafnie stawia wniosek, że w układach z poliaminami i α -hydroksykwasami dochodzi do oddziaływań niekonwencjonalnych typu jon-dipol oraz tworzą się kompleksy molekularne. Ponadto wraz ze wzrostem długości łańcucha poliaminy w adduktach z α -hydroksykwasami zaobserwowano większą tendencję do oddziaływań z atomami tlenu grup karboksylowych i większą trwałość układu. Wyznaczono metodą miareczkowania potencjometrycznego termodynamiczne stałe trwałości kompleksów metali *d*-elektronowych z poliaminami i α -hydroksykwasami. Określono sposób koordynacji tworzących się związków kompleksowych oraz występowanie w niektórych przypadkach form dimerycznych, zaś w przypadku poliamin potwierdzono tworzenie się związków o wyższych stałych trwałości. Dla metali *f*-elektronowych w sposób analogiczny wyznaczono stałe trwałości z poliaminami i α -hydroksykwasami. Proces kompleksowania lantanowców przez poliaminy biogenne rozpoczyna się przy pH deprotonacji, a typ koordynacji zależy od długości łańcucha węglowego. Dla putrescyny uzyskano kompleksy o znacznie niższych wartościach stałych trwałości. Podobnie wraz ze wzrostem liczby grup karboksylowych w strukturze α -hydroksykwasu wykazano wzrost stałych trwałości. Dla kwasu winowego potwierdzono istnienie form dimerycznych. W układach podwójnych lantanowców – α -hydroksykwasy/poliamina charakterystyczne jest zjawisko tzw. „kontrakcji lantanowej” i „gadolinium break”. Z kolei w układach potrójnych metali *d*-elektronowych nie stwierdzono tworzenia się kompleksów heteroligandowych. Głównymi miejscami koordynacji są atomy tlenu grup karboksylowych α -hydroksykwasów. Dla niskich wartości pH wykazano oddziaływania niekonwencjonalne pomiędzy sprotonowaną poliaminą a grupą karboksylową α -hydroksykwasu. Badania luminescencyjne potwierdziły występowanie tzw. „efektu anteny” w układach Eu(III) – α -hydroksykwasy/poliamina, gdzie poliamina oddziałując niekowalencyjnie z kwasem glikolowym wpływa na wzrost emisji jonów Eu(III).

Biorąc powyższe pod uwagę, stwierdzam, że najważniejsze cele jakie postawił przed sobą Doktorant zostały osiągnięte. Recenzowana rozprawa doktorska zawiera wiele nowych i interesujących wyników. Uznanie i podziw budzi ogrom pracy eksperymentalnej, równoznacznej z ilością nieznaną do tej pory, a obecnie już zbadanych układów. Niezmiernie istotne jest wyznaczenie zawartości poszczególnych form specyjalnych kompleksów metal *d*- i *f*-

elektronowych z poliaminami i α -hydroksykwasami, co może znaleźć znaczenie praktyczne i to nie tylko przy projektowaniu nowoczesnych leków przeciwnowotworowych, produkcji detergentów, ale również w procesach separacji jonów metali, a w szczególności lantanowców. Do tego celu stosuje się już przecież 0,2 M roztwory kwasu cytrynowego o pH 3,5 i 0,5 M cytrynian amonu o pH 3,0 i co ważne stosując cytrynian amonu Y(III) eluuje się między Dy(III) i Tb(III) lub pomiędzy Ho(III) i Dy(III) przy wyższych stężeniach w/w roztworu, a połączenie w/w kwasu z poliaminami może być jeszcze bardziej korzystne. Dlatego temat rozprawy uważam za ważny, zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia, a uzyskane wyniki za znaczące, jeśli chodzi o dorobek naukowy Doktoranta i pełne opanowanie problematyki badań. Rozprawa jest spójna, przemyślana pod względem eksperymentatorskim, zawiera wiele nowych interesujących wyników mających znamiona nowości naukowej.

Część doświadczalna, uzyskane rezultaty i wyciągnięte na ich podstawie wnioski wskazują, że badania przedstawione w pracy zostały bardzo dobrze zaplanowane, skrupulatnie wykonane i wnikliwie przeanalizowane. Praca doktorska została także przygotowana bardzo starannie. Szata graficzna jest estetyczna i czytelna. Doktorant zadbał o przejrzystość wykresów, jasność opisów i wysoką estetykę prezentacji. W trakcie lektury nasuwają się jednak pewne pytania i na tym etapie oceny chciałabym poprosić Doktoranta o dyskusję w następującym zakresie tematycznym:

- 1) Z czego wynika przyczyna zmian właściwości zasadowych kompleksów Gd(III) z α -hydroksykwasami w porównaniu do innych lantanowców. Czy należy jej jedynie upatrywać w tzw. „gadolinium break”?
- 2) Dla których poliamin zaobserwowano największy „efekt anteny” w układach podwójnych i potrójnych. Jak należy wytłumaczyć ten efekt?

Zwyczajowym elementem recenzji rozpraw doktorskich jest wskazanie również drobnych uchybień, czy potknięć językowych związanych najczęściej z żargonem, interpunkcją itp. Przykładowe z nich to:

str. 24, błędny wzór kwasu na rys. 8c (kwas mlekowy);

str. 27 Tabela 1 – stopniowe stałe dysocjacji, a powinny być stałe protonacji;

str. 38 zamiast dwutlenek węgla powinien być ditlenek węgla;

str. 61 w Tabeli 2 w tytule wartości stałych protonacji oznaczono jako $\log\beta$, zaś w nagłówku tabeli jako $\log K$;

str. 63 należałoby uściślić wyrażenia „ogólne wartości stałych protonacji” i „wartości ogólnych stałych protonacji”;

str. podpisy osi Y rysunków 34-36, 38-40, 42-44, 46, 49, 53, 57, 59, 61, 64, 68, 73, 76, 79, 84, 87, 91, 95, 98, 102, 106, 109, 113 zamiast %Put, Spd..., La, Cu... powinno być %;

str. 83 zamiast „wykonano widmo”, raczej „zarejestrowano widmo”,

str. 89 błędny opis rys. 53 „natomiast w układzie z jonami kobaltu w tym samym zakresie pH dominującym kompleksem jest dimeryczny $Ni_2(Cit)_2$ wiążący ok. 80% jonów metali”

str. 91, rys. 56 podobnie opis odnosi się do związku $Co_2(Cit)_2(OH)$, podpis rysunku do układu $Cu(II)/Cit$ zaś podpis krzywych na rysunku do układu $Eu(III)/Cit$;

str. 95 błąd w podpisie rys. 59, zamiast $Co(II)$ powinno być $Co(III)$;

str. 109 lantanowców(III) zamiast lantanowców (III).

str. 135, rys. 88 – podobnie jak rys. 99 powinien on zawierać także widmo IR zarejestrowane dla $Eu(III)/Tar$ - co ułatwiłoby analizę (jest ono już zamieszczone na rys. 65).

Zestawione powyżej potknięcia redaktorskie i edycyjne nie umniejszają w żaden sposób wartości merytorycznej pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Tym bardziej, że jak już wspomniano wcześniej, w dysertacji umieszczony został dorobek naukowy Doktoranta w formie kopii publikacji naukowych, co jest dogodne z punktu widzenia czytelnika i recenzenta. Prace te świadczą o tym, że uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki zostały już opracowane, zrecenzowane i opublikowane w bardzo dobrych czasopismach o obiegu międzynarodowym z tzw. listy filadelfijskiej o wysokim współczynniku oddziaływania. Są to: Coordination Chemistry Reviews (IF=13,324) – 2 prace, Journal of Inorganic Biochemistry (IF= 3,063) – 1 praca, Journal of Coordination Chemistry (IF= 1,795) – 1 praca, Journal of Iranian Chemical Society (IF=1,407) – 2 prace.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr Michała Zabiszaka spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 4 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach

i tytule w zakresie sztuki (Dz. Ustaw nr 65 poz. 595 z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom prezentowanych prac i dużą aktywność naukową Doktoranta zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o jej wyróżnienie stosowaną nagrodą.

Praca ma charakter nowatorski w zakresie podjętej tematyki, a otrzymane wyniki są imponujące, za czym przemawia fakt, że Doktorant opublikował już 6 prac w czasopismach z listy filadelfijskiej o sumarycznym IF 34,32 tj. 5,72 na 1 pracę. Ponadto prezentował na konferencjach krajowych i międzynarodowych szereg komunikatów i wystąpień posterowych. Świadczy to o Jego dużej aktywności w zakresie chemii bionieorganicznej, zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i przede wszystkim aplikacyjnego. Każda z tych publikacji prezentuje bardzo dobry poziom naukowy. Są one interesujące pod względem celów, poprawne z punktu widzenia zastosowanych metod badawczych i uzyskanych rezultatów badań.

Lublin, 31.07.2018

