

**Prof. dr hab. Lucjan Chmielarz**  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Recenzja Pracy Doktorskiej  
**Pani mgr Małgorzaty Biedulskiej**  
pt.

**Od jednordzeniowych kompleksów do kationowych polimerów  
koordynacyjnych – projektowanie, synteza oraz analiza fizykochemiczna  
połączeń witaminy B<sub>6</sub> z Ni(II) oraz Cu(II) pod kątem zastosowań  
analitycznych i biologicznych**

Wydział Chemii

Witaminy są związkami chemicznymi niezbędnymi do prawidłowego rozwoju oraz funkcjonowania organizmu człowieka. W większości przypadków organizm nie posiada zdolności do samodzielnego wytwarzania witamin, dlatego muszą być dostarczane wraz z pożywieniem lub w postaci preparatów farmaceutycznych. W niewielkich ilościach są produkowane w skórze pod wpływem promieniowania słonecznego (witamina D) lub w przewodzie pokarmowym (witamina K). Witaminy pełnią ważną rolę we wspomaganiu procesów przemiany materii, czy działaniu enzymów, a ich niedobór może skutkować różnego typu schorzeniami. W tej grupie związków chemicznych bardzo ważną rolę odgrywa witamina B<sub>6</sub>, którą stanowią pochodne 3-hydroksy-2-metylopirydyny. Witamina B<sub>6</sub> jest znana od lat 30-tych ubiegłego wieku, a jej rola w organizmie człowieka jest ogromna. Witamina B<sub>6</sub> pełni kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego, ponieważ bierze ona udział w metabolizmie neuroprzekaźników. Witamina B<sub>6</sub> w tym przypadku uczestniczy w syntezie aminokwasów i białek. Przekłada się to na prawidłową pracę mięśni, gdzie witamina B<sub>6</sub> wspomaga przemianę glukozy w glikogen oraz bierze udział w prawidłowym rozkładzie glikogenu. Ponadto, witamina B<sub>6</sub> jest konieczna do wytwarzania czerwonych krwinek, a obok biotyny i witaminy B<sub>12</sub>, usuwa z organizmu nadmiar homocysteiny – substancji odpowiedzialnej, w podobnym stopniu jak cholesterol, za rozwój miażdżycy. Ponadto, witaminie B<sub>6</sub> przypisuje się bardzo ważną rolę w regulacji pracy serca i ciśnienia krwi, wzrostu odporności organizmu poprzez udział w produkcji przeciwciał, a także kondycji fizycznej oraz w prawidłowym funkcjonowaniu mózgu

ul. Gronostajowa 2  
30-387 Kraków  
tel. +48 12 686 26 00  
fax +48 12 686 27 50  
sekretar@chemia.uj.edu.pl  
www.chemia.uj.edu.pl



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

poprzez wspomaganie wytwarzania najważniejszych neurohormonów – w tym serotoniny i adrenaliny.

Badania w zakresie poszukiwania efektywnych oraz wydajnych metod syntezy związków kompleksowych, jonów metali przejściowych, w szczególności do zastosowań biomedycznych, w ostatnich dekadach ulegają wyraźnej intensyfikacji. Nie jest to żadnym zaskoczeniem, ponieważ rozwijanie syntezy nowych leków, czy opracowywanie nowoczesnych metod diagnostycznych bezpośrednio przekłada się na efektywność leczenia różnego typu chorób, a przede wszystkim wydłużenie życia człowieka.

W ten bardzo ważny nurt badawczy wpisuje się rozprawa doktorska przygotowana przez panią mgr Małgorzatę Biedulską w Katedrze Chemii Bionieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką promotorską pana prof. dr hab. Mariusza Makowskiego. Rolę promotora pomocniczego pełniła pani dr Agnieszka Chylewska.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje szczegółowe badania w zakresie syntezy i analizy fizykochemicznej połączeń witaminy B<sub>6</sub> z dwuwartościowymi jonami niklu oraz miedzi pod kątem potencjalnych zastosowań analitycznych i biologicznych. Biorąc pod uwagę niezwykle ważną rolę witaminy B<sub>6</sub> w różnych aspektach funkcjonowania organizmu człowieka, a także istotną rolę jaką odgrywają połączenia jonów metali przejściowych w związkach kompleksowych m.in. w procesach selektywnego chelatowania i usuwania nadmiaru jonów metali z organizmu, metaloenzymów, inhibitorów enzymów, czy leków o szerokim spektrum działania (tj. przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne) uważam, że podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest ważna z punktu widzenia potencjalnych zastosowań w medycynie i analityce medycznej oraz bardzo dobrze wpisuje się w aktualne nurty badawcze w tym zakresie. Tematyka i zakres badań objętych realizacją rozprawy doktorskiej jest dużym wyzwaniem, w szczególności dla młodego badacza, zarówno pod względem ambitnych celów badawczych, złożonej metodyki badawczej, jak i bardzo dużej liczby zaplanowanych i wykonanych eksperymentów.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma klasyczny układ, na który składa się *Przegląd literaturowy*, *Część eksperymentalna oraz Wyniki i ich dyskusja*, poprzedzone krótkim *Wprowadzeniem*. Rozprawę doktorską zamykają *Podsumowanie i wnioski*, *Streszczenia* w języku polskim i angielskim oraz *Spis literatury*. Ponadto, Autorka umieściła dodatkowy rozdział, w którym został zaprezentowany jej *Dorobek naukowy*.

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



*Przegląd literaturowy* stanowi dość obszerne opracowanie wprowadzające Czytelnika w tematykę pracy doktorskiej. Doktorantka omówiła w tej części rozprawy doktorskiej zagadnienia odnoszące się do korelacji pomiędzy czynnikami strukturalnymi i własnościami fizykochemicznymi związków kompleksowych, a ich aktywnością biologiczną koncentrując się przede wszystkim na związkach kompleksowych niklu(II) oraz miedzi(II). W przypadku obu tych metali scharakteryzowano typowe połączenia koordynacyjne głównie pod względem wpływu struktury elektronowej jonu centralnego oraz typu ligandów na liczbę koordynacyjną utworzonego związku kompleksowego, jego geometrię, mechanizm formowania wiązań chemicznych czy stabilność w zależności od warunków otoczenia. Ponadto, Doktorantka przytacza liczne przykłady enzymów zawierających nikiel lub miedź, charakteryzując przede wszystkim ich strukturę, mechanizm działania oraz rolę w organizmie. Przegląd literaturowy, jak już wcześniej wspomniałem jest dość obszerny i obejmuje 59 stron rozprawy doktorskiej. Natomiast to co jest szczególnie istotne to liczba odnośników literaturowych cytowanych w tej części rozprawy doktorskiej (411). Wskazuje to na bardzo szerokie studia literaturowe przeprowadzone przez Doktorantkę. Jest to istotne z punktu widzenia dyskusji uzyskanych przez nią wyników oraz ich odniesienia do aktualnego stanu wiedzy w zakresie prowadzonych badań.

Podsumowując, *Część literaturowa*, stanowiąca bardzo dobre wprowadzenie do tematyki Rozprawy doktorskiej, została przygotowana w sposób prawidłowy pod względem doboru treści i formy. Odnośniki literaturowe w tym rozdziale zostały właściwie wybrane i odnoszą się zarówno do publikacji stanowiących kanon opisywanej tematyki, jak i najnowszych osiągnięć badawczych.

W kolejnej części pani mgr Małgorzata Biedulska definiuje cele swojej pracy doktorskiej w następujący sposób „ [...] *głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej stało się określenie optymalnych warunków tworzenia, stabilności termodynamicznej oraz profilu fizykochemicznego połączeń koordynacyjnych wybranych izomerów witaminy B<sub>6</sub> z jonami Ni(II) i Cu(II), które do tej pory nie zostały opisane w literaturze i stanowią nowość naukową w tej grupie związków. Ponadto, uzyskane wyniki proponowanych badań pozwolą na określenie potencjału aplikacyjnego uzyskanych związków kompleksowych pod kątem ich zastosowań analitycznych i biologicznych.*” Ponadto, Autorka w tym rozdziale opisuje jaki jest stan wiedzy w tym obszarze, wskazując na istotne zagadnienia, które do tej pory nie zostały objęte badaniami naukowymi i stanowią dla niej wyzwanie badawcze. Ten rozdział zamyka lista precyzyjnie zdefiniowanych zadań badawczych (10), koniecznych do osiągnięcia zakładanych celów pracy doktorskiej.



W *Części eksperymentalnej* Doktorantka prezentuje układy eksperymentalne oraz procedury badawcze stosowane w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Opis procedur badawczych jest wystarczająco szczegółowy, aby możliwe było odtworzenie tych eksperymentów w innych laboratoriach. Lektura tego rozdziału, wskazuje na bardzo szeroki zakres prac badawczych z zastosowaniem szerokiej gamy technik eksperymentalnych. W wielu przypadkach wyniki badań były weryfikowane kilkoma niezależnymi technikami eksperymentalnymi. Uważam, że ta część rozprawy doktorskiej została przygotowana w sposób bardzo rzetelny i staranny. Jednakże, pozwolę sobie zwrócić uwagę na drobne niedociągnięcia, które nie obniżają ogólnej wysokiej oceny tej części rozprawy doktorskiej. (i) W *Części eksperymentalnej* przeplatają się podrozdziały odnoszące się do metod charakteryzacyjnych, następnie opisana jest synteza związków kompleksowych, po czym zostały omówione kolejne metody charakteryzacyjne. Moim zdaniem znacznie łatwiejsze dla Czytelnika byłoby umieszczenie na początku rozdziału opisu syntezy, a w dalszej kolejności opisów stosowanych metod charakteryzacyjnych; (ii) Dla równania (1) na stronie 65 nie wyjaśniono znaczenia symboli w nim użytych.

Najobszerniejszą część Rozprawy doktorskiej, co jest w pełni zrozumiałe, stanowi rozdział *Wyniki i ich dyskusja*, w której Autorka prezentuje, analizuje i omawia, w odniesieniu do aktualnych doniesień literaturowych, rezultaty swoich prac badawczych. Pani Biedulska prezentuje i analizuje wyniki badań wartości stałych równowag kwasowo-zasadowych trzech izomerów witaminy B<sub>6</sub> w środowisku wodnym, wykorzystując w tym celu miareczkowania pH-metryczno-spektrofotometryczne oraz potencjometryczne w szerokim zakresie pH. Wartości pK<sub>a</sub>, wyznaczone dwoma niezależnymi metodami są bardzo zbliżone, i pozwalają określić sekwencję reakcji protonacji i deprotonacji w zależności od wartości pH. W dalszej kolejności zostały zaprezentowane wyniki badań równowag kompleksowania witaminy B<sub>6</sub> z jonami Ni(II) oraz Cu(II), uzyskane z zastosowaniem kombinacji trzech niezależnych i wzajemnie komplementarnych metod – miareczkowania spektrofotometrycznego, potencjometrycznego oraz konduktometrycznego. Przeprowadzone badania pozwoliły m.in. na określenie stechiometrii metal-ligand oraz geometrii związków kompleksowych badanych metali, a także zaproponowanie struktury wiązań tworzonych pomiędzy ligandami i jonem centralnym. Ponadto, Doktorantka wykazała, że połączenia koordynacyjne jonu Cu(II) z pochodnymi 3-hydroksypirydyny wykazują wysoką trwałością, o czym świadczą duże wartości stałych tworzenia. Najtrwalsze związki kompleksowe z jonem Cu(II) tworzy pirydoksamina, a połączenia pirydoksalu z tym jonem wykazują najmniejszą trwałością w roztworze wodnym. Odwrotną zależność obserwuje się dla związków



koordynacyjnych jonu Ni(II) z izomerami witaminy B<sub>6</sub>. Ponadto, przeprowadzone badania jednoznacznie wskazują, że kompleksy typu CuL są znacznie mniej stabilne niż połączenia typu CuL<sub>2</sub>, których tworzenie jest uprzywilejowane. Pani Biedulska wykazała mniejszą trwałość związków kompleksowych Ni(II) z pochodnymi 3-hydroksypirydyny w porównaniu z analogicznymi połączeniami Cu(II) w roztworach wodnych, co wyjaśniła tendencją niklu(II) do tworzenia wiązań kowalencyjnych, które wymagają bardziej elektrododatnich ligandów niż wybrane do badań. Dlatego zmodyfikowała proces kompleksowania jonu niklu(II) poprzez zastosowanie rozpuszczalnika niewodnego oraz chlorku litu, jako katalizatora, co doprowadziło do uzyskania jednordzeniowych kompleksów Ni(II) z witaminą B<sub>6</sub>. Dodatkowo, zaproponowano efektywną ścieżkę syntezy kationowych polimerów koordynacyjnych Cu(II) poprzez aktywację liganda mocną zasadą i zastosowanie mieszaniny rozpuszczalników etanol-woda. Uzyskany w ten sposób kationowy polimer koordynacyjny Cu(II) z pirydoksyną nie był wcześniej ujęty w bazach krystalograficznych, co świadczy o nowatorskim charakterze tych badań.

W kolejnych etapach swoich prac badawczych Doktorantka przeprowadziła analizę składu chemicznego uzyskanych związków chemicznych oraz poddała je badaniom spektroskopowym z zastosowaniem metod FT-IR oraz UV-Vis. Na tej podstawie zaproponowała geometrię zniekształconego tetraedru dla uzyskanych związków kompleksowych Ni(II), a także określiła ugrupowania funkcyjne w poszczególnych izomerach 3-hydroksypirydyny zaangażowane w tworzenie wiązań z jonem centralnym. Struktura monokryształów kationowych polimerów koordynacyjnych Cu(II) z witaminą B<sub>6</sub> została określona na podstawie badań rentgenostrukturalnych oraz dodatkowo potwierdzona na podstawie badań składu chemicznego próbek oraz badań spektroskopowych (FT-IR, UV-Vis). Ponadto, przeprowadzono badania stabilności termicznej związków kompleksowych Ni(II) i Cu(II) metodą termogravimetryczną, które wykazały, że nie ulegają one rozkładowi termicznemu poniżej 75°C. Z kolei badania metodą spektroskopii absorpcyjnej w połączeniu z analizą potencjometryczną pozwoliły na określenie wpływu pH środowiska na obserwowane właściwości kwasowo-zasadowe uzyskanych połączeń koordynacyjnych. Uzyskane rezultaty wskazują, że badane związki chemiczne w formie maksymalnie sprotonowanej zachowują się w roztworze jak kwasy Brönsteda, jakkolwiek stałe deprotonowania różnią się dla poszczególnych izomerów 3-hydroksypirydyny. Jak sugeruje Doktorantka, jest to konsekwencją obecności różnych podstawników w pozycji czwartej pierścienia aromatycznego.

Pani mgr Małgorzata Biedulska zastosowała w swoich badaniach metodę woltamperometrii cyklicznej, co pozwoliło jej uzyskać charakterystykę



elektrochemiczną połączeń koordynacyjnych Ni(II) oraz Cu(II) z witaminą B<sub>6</sub>. Badania te wykazały, że ulegają one jednoelektronowym procesom redukcji/utlenienia, oraz że +I stopień utlenienia niklu jest stabilny w woltamperometrycznej skali czasowej, a procesowi przeniesienia elektronu nie towarzyszą znaczące zmiany w wewnętrznej sferze koordynacyjnej. Z kolei, dla kompleksów Cu(II) proces redukcji posiada odwracalny charakter oraz, że w przypadku badanych połączeń koordynacyjnych możliwa jest stabilizacja aż trzech stopni utlenienia centrum metalicznego (+I, +II, +III), ale preferowane są stopnie +II i +I.

Kolejnym etapem badań było określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej uzyskanych związków kompleksowych, które wykazały, m.in. że połączenie jonu Ni(II) z pirydoksaminą wykazuje umiarkowaną aktywność względem testowanych szczepów bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz grzybów. Znacznie lepsze rezultaty uzyskano w przypadku związku kompleksowego Ni(II) z pirydoksalem, który wykazywał aktywność antyproliferacyjną względem Gram-dodatniego szczepu gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*), Gram-ujemnych pałeczek odmieniała pospolitego (*Proteus vulgaris*), pałeczek okrężnicy (*Escherichia coli*) oraz pałeczki ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*). Autorka przypisała te różnice w aktywności przeciwdrobnoustrojowej połączenia koordynacyjnego Ni(II) z pirydoksalem jako związane z jego większą trwałością w roztworze wodnym w odniesieniu do związku kompleksowego z pirydoksaminą.

Bardzo ważnym etapem badań przeprowadzonych przez panią mgr Małgorzatę Biedulską było określenie charakteru oddziaływań związków kompleksowych Ni(II) z CT-DNA. Uzyskane wyniki wskazują, że badane związki koordynacyjne wiążą się z DNA za pośrednictwem niekowalencyjnych oddziaływań w małym rowku, przy czym związek kompleksowy Ni(II) z pirydoksaminą wykazuje jego silniejsze powinowactwo do helisy DNA. Doktorantka, tłumaczy ten efekt obecnością zarówno donorowych atomów azotu, jak i tlenu w strukturze tego związku, oddziałujących z helisą DNA.

Ta krótka prezentacja badań wykonanych przez Doktorantkę pokazuje bardzo szeroki zakres wykonanych przez nią prac badawczych zarówno pod względem ich wieloaspektowego charakteru – synteza związków kompleksowych, analiza ich własności fizykochemicznych, badania ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej i oddziaływań z DNA – jak i bardzo rzetelnej i szczegółowej analizy własności badanych związków chemicznych z zastosowaniem szerokiej gamy różnorodnych metod eksperymentalnych. Na szczególne uznanie zasługuje weryfikacja wyników

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



badania przez niezależne metody badawcze i analiza zgodności rezultatów uzyskanych tymi metodami.

Podsumowując tą część rozprawy doktorskiej uważam, że strategia prac badawczych została bardzo dobrze zaplanowana i zrealizowana. Badania naukowe zawierają wiele elementów nowości naukowej, co jest związane z faktem, że połączenia koordynacyjne jonów Ni(II) oraz Cu(II) z pochodnymi izomerów witaminy B<sub>6</sub> nie były dotychczas opisane w literaturze naukowej. Dlatego uważam, że ich wartość naukowa jest bardzo duża. Wyniki badań są dyskutowane przez Doktorantkę w odniesieniu do aktualnych doniesień literaturowych. Moja ogólna ocena tej części rozprawy doktorskiej jest bardzo wysoka, ale pozwolę sobie zwrócić uwagę na drobne uchybienia, które jednak w żadnym stopniu nie obniżają mojej oceny.

- 1) Tytuł jednego z rozdziałów „3.3. *Analiza termogravimetryczna (TG-IR)*„ sugeruje, że w badaniach użyto techniki termogravimetrycznej sprzężonej z spektroskopią FT-IR, podczas gdy wyniki badań spektroskopowych nie zostały zaprezentowane w tym rozdziale;
- 2) Proponuję również zamiast używać określenia *dekompozycja*, które stanowi kalkę odpowiedniego wyrażania w języku angielskim, stosować określenie *rozkład*.

W dalszej kolejności rozprawy doktorskiej znajduje się kilkustronnicowe *Podsumowanie i Wnioski, Bibliografia* (547 pozycji) oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozprawę doktorską zamyka prezentacja dorobku naukowego pani mgr Małgorzaty Biedulskiej zawierająca listę – publikacji naukowych z listy JCR obejmujących wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej (4 pozycje), publikacji naukowych z listy JCR nie wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (5), rozdziałów w książkach (2), wystąpień ustnych na konferencjach międzynarodowych (6), prezentacji posterowych na konferencjach międzynarodowych (11), prezentacji posterowych na konferencjach krajowych (12) oraz udział w projektach badawczych (3 ze środków pozauczelnianych, w tym jeden jako kierownik oraz 5 ze środków uczelnianych, we wszystkich jako kierownik).

Poszczególne rozdziały rozprawy doktorskiej oceniłem bardzo wysoko, dlatego również ocena końcowa całej rozprawy jest bardzo wysoka. Pozwolę sobie jeszcze raz zwrócić uwagę na bardzo dużą wartość naukową ocenianej rozprawy doktorskiej oraz nowatorski charakter przeprowadzonych prac badawczych, ale

również bardzo dużą stratność w jej przygotowaniu zarówno pod względem struktury pracy, jak i pod względem edytorskim.

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska przygotowana przez panią mgr Małgorzatę Biedulską całkowicie spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane doktorantom (art. 16 i 17 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 ze zm. Dz. U. z 2005 r. Nr 165 poz. 1365) i stawiam wniosek o dopuszczenie pani mgr Małgorzaty Biedulskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy doktorskiej, a także znaczny dorobek publikacyjny pani mgr Małgorzaty Biedulskiej wnioskuję o jej wyróżnienie przez Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Kraków, 29 października 2018 r.

prof. dr hab. Lucjan Chmielarz



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl