



dr hab. Maria Korabik, prof. UWr
Zespół Nanochemii i Dynamiki Stanów Wzbudzonych

**Recenzja rozprawy doktorskiej w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych,
w dyscyplinie nauki chemiczne, pani magister Klaudii Stachowiak,
pt.: "REAKCJE KOMPLEKSOWANIA CUKROWYCH POCHODNYCH
URYDINO-5'-DIFOSFORAN – CHARAKTERYSTYKA SPEKTRALNA
ORAZ BADANIA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ"**

Rozprawa powstała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza, w Zakładzie Chemii Koordynacyjnej, promotorzy: prof. dr hab. Renata Jastrząb i dr Michał Zabiszak.

Podstawą wydania opinii jest pismo prof. dr hab. Macieja Kubickiego, Dziekana Wydziału Chemii, Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, z dnia 18.07.2025 r. (L.dz. WCH/162/AK/2025).

Wprowadzenie

Rozprawa doktorska Pani Mgr Klaudii Stachowiak wpisuje się w tematykę badawczą Zakładu Chemii Koordynacyjnej, w którym praca została wykonana: badania potencjometryczne i spektralne fosforylowanych pochodnych biocząsteczek, ich właściwości koordynujących jony metali. Jest podsumowaniem kilkuletnich badań nad procesami kompleksowania w układach zawierających cukrowe pochodne urydino-5'-difosforanu z jonami metali d-elektronowych o znaczeniu biologicznym. Praca odnosi się do współczesnych problemów naukowych. Jak informuje Autorka we wstępie, „cukrowe pochodne urydino-5'-difosforanu: urydino-5'-difosfoglukozę, urydino-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina czy urydino-5'-difosfogalaktozę odgrywają kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmów żywych. Jako donory jednostek cukrowych, mają istotne znaczenie w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych, dlatego enzymy zaangażowane w syntezę tej grupy u bakterii stanowią potencjalny cel terapeutyczny w procesach projektowania leków przeciwbakteryjnych”. Istotna jest również rola jonów metali przejściowych, głównie: miedzi, cynku, żelaza, kobaltu manganu i niklu w prawidłowej pracy organizmu a zaburzenie ich stężenia występuje w wielu stanach chorobowych. Związki metali przejściowych wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe włącznie z indukowaniem śmierci komórek, w tym komórek nowotworowych. Celowym

wydało się połączenie właściwości pochodnych cukrowych urydyno-5'-difosforanu i właściwości jonów metali d-elektronowych, z których wybrane zostały trzy: Cu(II), Co(II) i Ni(II), utworzenie form kompleksowych oraz zbadanie ich właściwości termodynamicznych i biologicznych. Badania w tym obszarze mogą przyczynić się do rozwoju nowych metod terapeutycznych w leczeniu chorób, w tym nowotworowych i to stało się celem niniejszej dyzertacji.

Struktura i zawartość pracy

Układ pracy jest klasyczny, rozprawa składa się z 10 części i liczy 115 stron, w tym stron wstępu literaturowego. Kolejna część obejmuje cele pracy, materiały, metodologię badań, wyniki i ich dyskusję, podsumowanie, streszczenia, literaturę oraz dorobek naukowy. Ponadto, praca zawiera spis stosowanych skrótów i symboli co było pomocne w trakcie lektury.

Po krótkim wstępie, wprowadzającym czytelnika w zagadnienia związane z tematyką pracy przedstawiono część teoretyczną, w skład której wchodzi podrozdział zawierający najnowsze doniesienia dotyczące: analogów nukleotydów i nukleozydów w ujęciu terapeutycznym, cukrowych pochodnych urydyno-5'-difosforanu i ich znaczenia dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych a także w terapii - chorobach nowotworowych i cukrzycy, która niestety przyczynia się do progresji nowotworów oraz wielu innych chorób.

Celem pracy było zbadanie procesu kompleksowania w układach zawierających ligandy - cukrowe pochodne urydyno-5'-difosforanu i jony metali bloku d o znaczeniu biologicznym. Jako ligandy wybrano: kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy, urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminę oraz urydyno-5'-difosfoglukozę a jony metali: Cu(II), Co(II) i Ni(II). W pracy przewidziane zostały również badania biologiczne uzyskanych form kompleksowych. W części teoretycznej pracy wskazano znaczenie biologiczne wybranych ligandów i jonów metali d w molekułach biologicznych. Scharakteryzowane zostały krótko planowane metody badawcze: miareczkowanie potencjometryczne, spektroskopia UV-Vis, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego NMR i elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR, spektroskopia dichroizmu kołowego oraz badania biologiczne.

W części eksperymentalnej przedstawiono wyniki przeprowadzonych w roztworze badań kompleksowania cukrowych pochodnych urydyno-5'-difosforanu z jonami Cu(II) Co(II) i Ni(II) w stosunkach molowych 1:1 i 1:2.

W stosunku równomolowym zbadano połączenia koordynacyjne: jonów miedzi(II) z kwasem urydyno-5'-difosfoglukuronowym, z urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminą i urydyno-5'-difosfoglukożą. Z jonami Co(II) i Ni(II) badaniom poddane zostały już tylko kompleksy z urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminą i urydyno-5'-difosfoglukożą.

Nie znalazłam w pracy informacji dlaczego nie badano kompleksów kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego z jonami Co^{2+} i Ni^{2+} ? Bardzo proszę o wyjaśnienie.

W stosunku molowym 1:2 (ligand do jon metalu) przeprowadzono badania dla związków wymienionych jonów metali z dwoma ligandami: urydyno-5'-difosfo-N-glukozaminą i urydyno-5'-difosfoglukozą.

Wyniki badań własnych

Zakres badań obejmował przeprowadzenie pełnej charakterystyki termodynamicznej i spektroskopowej wyznaczonych form kompleksowych w roztworze wodnym. Uzupełnieniem metod chemicznych były zaplanowane testy biologiczne oparte na hodowlach komórek (in vitro) w celu oceny cytotoksyczności otrzymanych związków.

Analiza wyników rozpoczyna się od analizy wyników protonacji ligandów, ich stałych protonacji oraz stałych równowag, na podstawie których oszacowano potencjalne miejsca koordynacyjne, w zależności od pH roztworu.

Obecność form kompleksowych z jonami miedzi(II), kobaltu(II) i niklu(II) identyfikowano na podstawie przeprowadzonych badań potencjometrycznych i spektroskopowych w szerokim zakresie pH, od najniższych do pH powyżej 10, gdzie dominują już formy wodorotlenków metali. Przeprowadzono komputerową analizę badań potencjometrycznych, wyniki przedstawiono graficznie w postaci krzywych dystrybucji a stałe trwałości dla poszczególnych form kompleksowych zamieszczono w tabelach. Wyznaczenie stałych trwałości pozwoliło na oszacowanie stabilności poszczególnych form kompleksowych. Dla wszystkich zidentyfikowanych form kompleksowych istniejących w określonym pH roztworu, przypisano pasma absorpcyjne obserwowane w spektroskopii UV-Vis. Najpełniej zostały scharakteryzowane formy kompleksowe, które tworzył jon miedzi(II) z kwasem urydyno-5'-difosfoglukuronowym i to ta część pracy została opublikowana a Doktorantka była pierwszym autorem. Tu wykonano dodatkowo widma CD, wykorzystano metodę elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR i jądrowego rezonansu magnetycznego NMR. Na podstawie obserwowanych przesunięć pasm UV-Vis wnioskowano o zmianach w wewnętrznej sferze koordynacyjnej. Na podstawie analizy pasm CD nie stwierdzono zmian konformacyjnych liganda w badanym zakresie pH=2,5 – 8,0, w roztworach wodnych. Przeprowadzono analizę widm ^{13}C i ^{31}P NMR, przesunięć chemicznych między wolnym ligandem a jego formami kompleksowymi. Zaobserwowano zauważalne zmiany przesunięć chemicznych węgla C6' grupy karboksylowej kwasu oraz fosforu P2 jednej z grup fosforanowych, wnioskując na tej podstawie o zaangażowaniu atomów tlenu związanych z tymi grupami w koordynację do jonu miedzi(II).

Mam pytanie, czy obecność paramagnetycznego jonu miedzi(II) w związku nie była przeszkodą w analizie widm NMR?

Kontynuując, na podstawie wykonanych w temperaturze ciekłego azotu widm EPR dla wszystkich form kompleksowych jonu miedzi(II) z trzema badanymi ligandami, nie

zaobserwowano różnic w wyglądzie pasm jak i w wartościach uzyskanych parametrów, $g_{||}$ i $A_{||}$ dla przedstawionych wartości pH, chociaż na podstawie widm UV-Vis wnioskuje się o zmianach zachodzących w sferze koordynacyjnej jonu.

Kolejne pytanie – w jaki sposób wyznaczano parametry rozszczepienia spektroskopowego g i A ? Metodą symulacji widma?

W pracy proponuje się włączenie do koordynacji atomów azotu pierścienia urydyny wraz ze wzrostem pH. Szkoda, że nie wykonano widm EPR w celu śledzenia tej zmiany. Na pewno na widmach EPR byłoby to widoczne w postaci zmiany kształtu pasma składowej prostopadłej jak i równoległej.

Na podstawie spektroskopii EPR wysunięto inny ważny wniosek, wszystkie formy kompleksowe z jonem miedzi(II) i badanymi trzema ligandami są monomeryczne.

Dla form kompleksowych ligandów: urydyno-5'-difosfo-N acetyloglukozamina i urydyno-5'-difosfoglukozyna z jonami Co(II) i Ni(II) przeprowadzono badania potencjometryczne oraz przeanalizowano widma UV-Vis.

Analiza porównawcza form kompleksowych badanych ligandów z jonami miedzi(II), kobaltu(II) i niklu(II) pozwoliła na wyciągnięcie wniosku, że w układach zawierających jony miedzi(II) i niklu(II) występują sprotonowane formy kompleksowe i hydroksokompleksy. Nie zaobserwowano tego dla kompleksów kobaltu(II), w układach zawierających jony kobaltu(II) potwierdzono obecność form dimerycznych. W przypadku zbadanych form kompleksowych z jonami kobaltu(II) i niklu(II) wykazano jedynie niewielkie efekty przesunięcia pasm na widmach UV-Vis, w porównaniu do form kompleksowych badanych ligandów z jonami miedzi(II).

Dla wybranych kompleksów miedzi(II) z kwasem urydyno-5'-difosfoglukuronowym i urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminą przeprowadzone zostały wstępne badania biologiczne. Testy oparte na hodowlach komórek (in vitro) zostały wykonane we współpracy z Katedrą Onkologii Wydziału Nauk o Zdrowiu, Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy. Wstępne wyniki badań wykazały zwiększoną cytotoksyczność, redukującą aktywność metaboliczną, kompleksu miedzi(II) w kwasem urydyno-5'-difosfoglukuronowym w stosunku do wolnego liganda, względem komórek raka płuc-A549 a efekt był wyraźnie zależny od czasu inkubacji. W przypadku kompleksu miedzi(II) z urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminą przeprowadzono badania względem komórek nowotworowych raka pęcherza moczowego (linii T24). Nie zaobserwowano istotnych różnic cytotoksyczności w porównaniu do wolnego liganda.

Przedstawiona dogłębna analiza rozprawy doktorskiej pozwala na stwierdzenie, że założone cele pracy zostały osiągnięte. Przedstawione wyniki wpisują się we współczesne trendy badań dotyczących kompleksowania jonów metali przez ligandy o znaczeniu biologicznym, uzależnionych wartością pH roztworu wodnego.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam zaobserwowane błędy pisarskie, nieścisłości, z prośbą o wyjaśnienie:

1. W tabelach: 16 – str.67, 21 – str. 96, 23 – str.80, 25 – str.83, 27 – str.89 i 29 – str.92 i 31 – str.95 Autorka miała pewnie na myśli schemat reakcji a nie reakcję równowagową, ponieważ nie zgadza się bilans ładunków.
2. W tabeli 23 brakuje w dwóch pozycjach ładunku jonów kobaltu.
3. W tabeli 9, str.51 przedstawiono formy jonowe ligandów a nie ligandy jak zapisano
4. Str.55, podpunkt c) – jest „odważki HCl”, powinno być „NaOH”
5. Tabela 19, str.73 – przesunięcie chemiczne węgla C6', jest 0,70 powinno być 0,7 – co wynika z załączonej publikacji
6. Rys.25 str.72 powinien mieć numer 24
7. Str. 57 – ($pK_w = -13,78$) ?

Wymienione omyłki nie umniejszają wartości dysertacji.

Podsumowanie

Przedstawione przez Doktorantkę wyniki badań i wnioski świadczą o pomyślnym zrealizowaniu celów rozprawy. Praca doktorska Pani mgr Klaudii Stachowiak stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego a wyniki zostały opublikowane (publikacja w załączeniu). Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną w dyscyplinie i umiejętnością zaplanowania i prowadzenia badań naukowych. Doktorantka jest współautorką trzech publikacji, z których jedna, opublikowana w 2024 r., w *Molecules* jest tematycznie związana z pracą a Doktorantka jest pierwszym autorem pracy. W publikacji zamieszczone zostały wyniki analizy termodynamicznej kompleksów zawierających jony miedzi(II) z kwasem urydyno-5'-difosfo-glukuronowym. Doktorantka jest również współautorką pięciu monografii, które ukazały się każdego roku, poczynając od roku 2021 do 2025, w czasopiśmie *Nauka i Przemysł – lubelskie spotkania studenckie*, nakładem wydawnictwa UMCS.

Oceniając całokształt działalności podkreślić należy również coroczny udział Doktorantki w Sympozjach naukowych „Nauka i Przemysł” od 2021 r., w konferencjach naukowych krajowych i zagranicznych, w tym udział w 44th International Conference on Coordination Chemistry, w Rimini we Włoszech, w 64th Zjeździe Naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Lublinie w 2022 r., w 17th European Biological Inorganic Chemistry Conference w 2024 r., w Münster, w Niemczech, w Natural Science Baltic Conference, w 2025 r., gdzie prezentowała wyniki swoich badań w formie komunikatów ustnych oraz prezentacji posterowych.

Doktorantka odbyła dwie wizyty studyjne w Hiszpanii, w 2019 r i 2024 r. oraz dwa miesięczne staże: w 2019 r. -Browar rzemieślniczy „Nepomucen”, Szkaradowo oraz

Colegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Bardzo pozytywnie oceniam działalność Doktorantki w obszarze popularyzującym wiedzę w środowisku poznańskim w ramach Poznańskiego Festiwalu Nauki, Festiwalu Filmu Chemicznego „Cinema to Chemia” czy Nocy Naukowców.

Wniosek końcowy

Mając na uwadze powyższe stwierdzam, że recenzowana praca w pełni spełnia kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne oraz wymogi stawiane pracom doktorskim wynikające z Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo i szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

Zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Adama Mickiewicza o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Doktorantki, mgr Klaudii Stachowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.