



POLITECHNIKA WARSZAWSKA  
WYDZIAŁ CHEMICZNY  
**dr hab. inż. Piotr Bujak**

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa  
Tel./fax: +48-222345584/ +48-22-2347271;  
e-mail: pbujak@ch.pw.edu.pl



Warszawa, 9 sierpnia 2019

## RECENZJA

pracy doktorskiej **mgr Barbary Czaplińskiej**

**„Analiza właściwości spektroskopowych w projektowaniu sond/sensorów komórkowych”**

Współczesną *chemię materiałów*, pomimo olbrzymiego zakresu prowadzonych badań, za każdym razem można sprowadzić do połączenia trzech etapów: syntezy i dokładnej analizy strukturalnej, badań właściwości fizykochemicznych i typowych testów materiałowych związanych z określonym wykorzystaniem. Kierując się powyższą regułą, pracę doktorską Pani mgr Barbary Czaplińskiej: *Analiza właściwości spektroskopowych w projektowaniu sond/sensorów komórkowych* można w pełni zakwalifikować do chemii materiałów, co ważne, każdy z prowadzonych etapów został właściwie wyważony. Właściwa równowaga pomiędzy kolejnymi etapami jest szczególnie istotna ze względu na fakt, że większość realizowanych prac doktorskich określanych jako typowo materiałowe w przeważającej części dotyczą syntezy nowych związków chemicznych bez przeprowadzenia kolejnych etapów.

Celem przedstawionej pracy doktorskiej było otrzymanie nowych fluoroforów jako potencjalnych sensorów komórkowych oraz dokonanie pełnej charakterystyki fizykochemicznej wiążącej strukturę związku z jego właściwościami. Cel pracy został jasno sformułowany i wpisuje się w najnowsze trendy badawcze dotyczące poszukiwania nowych organicznych i nieorganicznych fluoroforów jako materiałów aktywnych dla typowo biologicznych zastosowań. Jako punkt wyjścia w projektowaniu nowych fluoroforów wybrano rdzeń popularnego układu heteroaromatycznego – chinoliny. Wybór tego typu rdzenia, nie był przypadkowy, co podkreśla doktorantka, został zainspirowany współpracą z Panią dr Anetą Słodek pracującą w Zakładzie Chemii Nieorganicznej, Metaloorganicznej i Katalizy zajmującą się syntezą pochodnych chinoliny jako materiałów luminescencyjnych dla elektroniki organicznej. Według mnie, to doskonały przykład najlepszej strategii projektowania nowych materiałów polegającej na modyfikacji znanych struktur, wykorzystywanych wcześniej w skrajnie różnych, tak jak w tym przypadku, zastosowaniach, natomiast wykazujących pożądane

właściwości. Alternatywą dla tego podejścia jest synteza całkowicie nowych struktur, co zawsze obarczone jest dużym ryzykiem, zwiększa koszty a przede wszystkim wiąże się z wielogodzinną pracą w laboratorium, co w perspektywie realizowanej pracy doktorskiej ogranicza czas niezbędny do właściwego scharakteryzowania materiału oraz przeprowadzenia typowych materiałowych badań.

Wstęp pracy można podzielić na dwa rozdziały. W pierwszym rozdziale zostały omówione najważniejsze zagadnienia związane z właściwościami luminescencyjnymi materiałów oraz ich wykorzystaniem jako sondy i sensory. Drugi rozdział został poświęcony omówieniu możliwości badania procesów zachodzących w poszczególnych elementach komórki przy wykorzystaniu typowo organicznych sond i sensorów. Oba rozdziały stanowią spójną całość, co pozwala czytelnikowi w przystępny sposób zapoznać się z najważniejszymi zagadnieniami dotyczącymi realizowanej pracy doktorskiej. Wysoko oceniając przygotowany wstęp chciałbym wskazać zagadnienia, które nie zostały omówione. Po pierwsze brakuje omówienia kilku przykładów pokazujących jak struktura związku organicznego wpływa na właściwości luminescencyjne, przede wszystkim na kolor luminescencji. Po drugie nie zostało omówione pojęcie *okna biologicznego* określającego zakres emisji pozwalający uzyskać najlepszą rozdzielczość, istotnego parametru dla obrazowania komórkowego. Po trzecie na końcu wstępu brakuje podsumowania wskazującego najważniejsze wymagania stawiane typowym organicznym materiałom wykorzystywanym jako sondy i sensory.

Wstępny etap badań dotyczył analizy właściwości luminescencyjnych 11 pochodnych chinoliny otrzymanych przez Panią dr Anetę Słodek. Otrzymane pochodne charakteryzowały się emisją w zakresie 410-606 nm, przy wydajnościach kwantowych luminescencji w przedziale od 48 do 70%. Na podstawie przeprowadzonych badań wyselekcjonowano dwa związki, które zastosowano do wybarwienia struktur komórkowych nowotworu jelita grubego (HCT 116) techniką współbarwienia i mikroskopii fluorescencyjnej. Analizując ten rozdział pracy doktorantka nie sprecyzowała jaki parametr okazał się kluczowy w wyborze związków 6e i 6k zastosowanych do badań biologicznych.

W następnym etapie badań doktorantka otrzymała 7 zasad Schiffa zawierających strukturę styrylochinoliny. Struktura otrzymanych związków została potwierdzona na podstawie zarejestrowanych widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR oraz widm HR-MS. Ponadto została określona stereochemia wiązania C=N oraz przypisano poszczególne sygnały odpowiednim protonom przy zastosowaniu technik 2D NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY i NOESY. Otrzymane pochodne zostały scharakteryzowane spektroskopowo, zarejestrowano widma absorpcyjne, emisji w

różnych rozpuszczalnikach, określono przesunięcie Stokesa oraz wydajność kwantową luminescencji. Uzyskane związki charakteryzowały się emisją w zakresie od 400 do 600 nm, przy relatywnie niskich wydajnościach kwantowych luminescencji od 3,4 do 7,9%. Ważnym uzupełnieniem przeprowadzonych badań spektroskopowych była analiza wyników obliczeń teoretycznych z wykorzystaniem teorii funkcjonału gęstości DFT. Natomiast na etapie testów biologicznych określono cytotoksyczność dla wszystkich pochodnych oraz przeprowadzono wybarwienia komórek nowotworowych jelita grubego (HCT166) dla dwóch wybranych pochodnych. Miejsce kumulacji zastosowanych fluoroforów określono porównując uzyskane zdjęcia z zdjęciami zarejestrowanymi przy wykorzystaniu wzorców specyficznych dla poszczególnych organelli, takich jak mitochondria, lizosomy oraz siateczka śródplazmatyczna. Przeprowadzona analiza zdjęć pozwoliła określić, że zastosowane pochodne charakteryzują się tendencją do gromadzenia w strukturach błonistych komórek.

Ostatni etap badań w całości został poświęcony dokładnej charakterystyce związku 6s, który wobec wody ulega hydrolizie kwasowej do związku SC2. Wykorzystując ten związek do wybarwienia komórek nowotworu jelita grubego (HCT166) obserwujemy zieloną luminescencję w obszarach błon komórkowych i organelli z nimi powiązanych, natomiast produkt rozkładu związku powoduje wybarwienie organelli o odczynie kwaśnym (pomarańczowa luminescencja). Ponadto związek 6s przetestowano jako sensor jonów cynku. Wobec jonów cynku zaobserwowano hipsokromowe przesunięcie piku emisji oraz wyraźny wzrost wydajności kwantowej luminescencji. Testowany sensor charakteryzuje się wysoką selektywnością, oprócz jonów kadmu, przy czym obecność szeregu kationów nie wpływa na zarejestrowane widma emisji. Warto podkreślić, że związek 6s nie wykazuje aktywności wobec jonów miedzi(II) powodujących najczęściej wygaszenie luminescencji organicznych fluoroforów.

Analizując cały zakres przeprowadzonych badań, przede wszystkim struktury otrzymanych związków, chciałbym poruszyć w trakcie obrony pracy doktorskiej interesujący mnie osobiście aspekt wymagań dotyczący rozpuszczalności projektowanych fluoroforów dla tego typu zastosowań biologicznych.

Podsumowując przedstawiona praca doktorska zasługuje na wysoką ocenę ze względu na starannie przygotowany wstęp literaturowy oraz obszerny zakres badań związany z projektowaniem i wykorzystaniem nowych fluoroforów zawierających rdzeń, styrylochinoliny. Oprócz syntezy i charakterystyki strukturalnej, 9 otrzymanych związków w tym 7 nowych struktur, przeprowadzono wyczerpującą charakterystykę spektroskopową. W

kolejnym etapie wybrane związki wykorzystano do testów biologicznych polegających na wybarwieniu komórek nowotworowych jelita grubego określając miejsca kumulacji związków przy wykorzystaniu wzorcowych fluoroforów.

Pani Barbara Czaplńska jest współautorem 6 publikacji (w tym w dwóch pracach jest pierwszym autorem), jednego patentu oraz 4 zgłoszeń patentowych. Warto podkreślić, że większość zgromadzonego dorobku związana jest bezpośrednio z wynikami przedstawionymi w pracy doktorskiej.

Praca doktorska Pani mgr Barbary Czaplńskiej wnosi duży wkład do wiedzy dotyczącej projektowania i otrzymywania fluoroforów jako sensorów komórkowych. Przedstawiona praca stanowi spójną całość łączącą wstęp z prezentowanymi wynikami badań. Na wyróżnienie zasługuje zakres prowadzonych badań pokazujący krok po kroku wszystkie etapy związane z projektowaniem i otrzymywaniem nowych fluoroforów wykorzystujących rdzeń chinoliny, następnie ich charakterystyką strukturalną i spektroskopową, kończąc na typowych aplikacyjnych badaniach.

Stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Barbary Czaplńskiej do dalszych etapów przewodu mającego na celu przyznanie stopnia naukowego doktora. Biorąc pod uwagę wysoką jakość pracy doktorskiej oraz zgromadzony dorobek naukowy, na który składają się publikacje naukowe w uznanych czasopismach naukowych między innymi w *Scientific Reports* i *European Journal of Medicinal Chemistry*, patent oraz zgłoszenia patentowe, stawiam również wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Piotr Bujak