



Prof. dr hab. Maria Nowakowska
Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 2
30-387 Kraków
tel: 48 12 686 2534
email:nowakowsk@chemia.uj.edu.pl

O C E N A

pracy doktorskiej Pana mgr Adama Tillo

pt.; „Podstawione fotosensybilizatory pirazynoporfirazyne i ftalocyjaninowe oraz substraty do ich syntezy - charakterystyka strukturalna i spektroskopowa”.

Praca doktorska Pana mgr Adama Tillo została wykonana w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod opieką promotorską Pani dr hab. n. farm. Ewy Tykarskiej oraz przy wsparciu merytorycznym Pana dr n. farm. Michała Kryjewskiego, pełniącego funkcję promotora pomocniczego. Badania zrealizowano w ramach projektu badawczego SONATA Bis zatytułowanego : „*Synteza i badania fizykochemiczne nowych dendrymerycznych porfirazyn o potencjalnym zastosowaniu w medycynie i bionanotechnologii*”(nr 2012/05/E/NZ7/01204), kierowanego przez Pana Prof. dr hab. Tomasza Goślińskiego, a finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Prace badawcze prowadzono we współpracy z Katedrą i Zakładem Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Wydziałem Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu i Centrum Nanobiomedycznym przy Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Celem pracy doktorskiej Pana mgr Adama Tillo było otrzymanie nowych związków makrocyklicznych oraz określenie ich właściwości fizykochemicznych, spektroskopowych i fotochemicznych istotnych dla oceny przydatności tych połączeń jako fotosensybilizatorów (fotouczulaczy) w terapii fotodynamicznej (PDT).

Atrakcyjność terapii fotodynamicznej wiąże się z niskim stopniem jej inwazyjności i poszerzającym się spektrum możliwych zastosowań. Głównym nurtem badań jest wciąż terapia fotodynamiczna nowotworów, której rozwój jest w istotny sposób determinowany dostępnością optymalnych fotosensybilizatorów. Projektowanie, synteza, badania właściwości fotofizycznych/fotochemicznych i biologicznych nowych fotosensybilizatorów do terapii PDT prowadzone są w wielu światowych laboratoriach badawczych. W ten nurt badań włączył się Pan mgr Tillo i słusznie zauważył, że aby związek mógł pełnić rolę skutecznego fotouczulacza musi posiadać zdolność do selektywnej, możliwie szybkiej i efektywnej akumulacji w tkance nowotworowej, absorbować niskoenergetyczne promieniowanie z zakresu widzialnego/ bliskiej podczerwieni (w tzw. „oknie terapeutycznym”), efektywnie generować reaktywne formy tlenu (w tym tlen sigletowy) i charakteryzować się wystarczającą fotostabilnością i możliwie krótkim okresem retencji w organizmie pacjenta, tak aby ograniczyć okres jego wrażliwości na światło. Jest oczywistym, że fotouczulacz i produkty jego fotodegradacji powinny charakteryzować się możliwie minimalną toksycznością. Wszystkie te oczekiwania zostały zaadresowane przez Doktoranta w Jego badaniach.

Cel pracy został dobrze zdefiniowany a tematyka prowadzonych badań wpisuje się w aktualne trendy badawcze.

Doktorant prowadził syntezę nowych związków, dokonywał racjonalnie zaplanowane ich modyfikacje strukturalne i analizował korelacje pomiędzy strukturą otrzymanych połączeń a ich właściwościami fizykochemicznymi, spektroskopowymi i efektywnością generowania tlenu singletowego. Wyznaczał także wydajność kwantową fluorescencji otrzymanych połączeń, znajomość której może być przydatna w planowaniu teranostycznego zastosowania fotouczulacza. Fluorescencja fotouczulacza wprowadzonego do zmienionej chorobowo tkanki może pozwolić na wizualizację zmian chorobowych i dopasowanie parametrów ekspozycji na światło (zastosowanie teranostyczne). Problematykę podjętych przez Doktoranta badań oceniam jako ważną i aktualną. Nie mam też zastrzeżeń do konstrukcji planu badań.

Rozprawa doktorska Pana mgr Tillo przedstawiona jest w postaci cyklu 3 publikacji uzupełnionych komentarzem, podsumowaniem i wnioskami. Prezentację publikacji własnych poprzedził Doktorant zwartym, liczącym 35 stron, wstępem literaturowym, zdefiniowaniem celu i omówieniem metodyki badań. Całość uzupełnił streszczeniem w języku polskim i angielskim, spisem cytowanej literatury, obejmującym 97 dobrze wyselekcjonowanych pozycji, wykazem stosowanych skrótów i słów kluczowych. W dokumentacji znajduje się także krótka prezentacja sylwetki Doktoranta i podziękowania dla współpracowników.

We wstępie literaturowym Doktorant przedstawił historię rozwoju terapii fotodynamicznej, zarysował jej podstawy teoretyczne i omówił główne grupy fotouczulaczy, ze szczególnym uwzględnieniem tych, które już wykorzystywane są w praktyce terapeutycznej lub znajdują się na różnych etapach prób klinicznych. Ten fragment pracy jest przydatnym wprowadzeniem, świadczącym o dobrej znajomości aktualnego stanu wiedzy w obszarze tematyki badawczej podjętej przez Doktoranta i uzasadnia celowość podjętych badań.

Publikacje stanowiące podstawę doktoratu ukazały się w międzynarodowych, specjalistycznych czasopismach naukowych, dobrze dobranych do przedmiotu badań, takich jak: *Dyes and Pigments*, *Synthetic Metals* i *New Journal of Chemistry*. Wszystkie publikacje są pracami wieloautorskimi. W dokumentacji znajdują się stosowne oświadczenia Doktoranta i współautorów określające ich rolę i zaangażowanie w prace, które zaowocowały powstaniem omawianych publikacji. Analiza tych dokumentów pozwala stwierdzić, że spełnione są warunki formalne umożliwiające Panu mgr Tillo wykorzystanie tego dorobku naukowego jako podstawy do ubiegania się o stopień doktora. Ponieważ prace te zostały zrecenzowane przez specjalistów w ramach procesu publikacyjnego nie mam wątpliwości dotyczących ich wysokiej wartości merytorycznej. Wyniki prezentowane w publikacjach mogą być dodatkowo zweryfikowane przy wykorzystaniu danych eksperymentalnych zawartych w obszernych materiałach uzupełniających stanowiących integralne części publikacji. Materiały te zostały opracowane z zachowaniem niezwyklej staranności. W swym komentarzu odniosę się głównie do istotnych elementów nowości naukowej wyników przeprowadzonych badań i potencjalnej przewagi/ograniczeń otrzymanych połączeń w kontekście ich przydatności jako kandydatów na fotouczulacze w procedurach PDT.

W pierwszej z prezentowanych publikacji: Tillo A, Stolarska M, Kryjewski M, Popenda L, Sobotta L, Jurga S, Mielcarek J, Gośliński T. "*Phthalocyanines with bulky substituents at non-peripheral positions – Synthesis and physico-chemical properties*", *Dyes Pigments*, 2016,127, 110-115 przedstawiono syntezę i określono właściwości serii pochodnych ftalocyjaniny

magnezowej podstawionych rozbudowanymi ugrupowaniami o różnej wielkości w pozycjach nieperyferyjnych α . Celem tych badań było otrzymanie pochodnych ftalocyjaniny charakteryzujących się lepszą niż związek macierzysty rozpuszczalnością i zwiększoną efektywnością generowania tlenu singletowego, głównie poprzez ograniczenie ich agregacji na skutek istnienia zawady sterycznej. Otrzymano, z dobrą wydajnością, trzy nowe pochodne ftalocyjaniny magnezowej posiadające odpowiednio podstawniki 2- propoksyłowe, benzoksyłowe i 3,5-bis(bezyloksyl)benzyloksyłowe (hiperrozgałęziona dendrymerowa struktura G1) i porównano ich właściwości. Szkoda, że Doktorant nie przeprowadził porównania właściwości otrzymanych pochodnych z macierzystą ftalocyjaniną magnezową (MgPc). Można bowiem zaobserwować, że wprowadzenie podstawników doprowadziło do istotnej poprawy szeregu właściwości tej grupy związków, ale warto też podjąć refleksję nad obserwowanymi ograniczeniami. Tak więc maksima pasm Q w elektronowych widmach absorpcyjnych otrzymanych połączeń występowały ok. 750 nm, czyli wykazywały znaczące, pożądane przesunięcie batochromowe w stosunku do widma absorpcyjnego ftalocyjaniny magnezowej. Poprawie uległa także rozpuszczalność ftalocyjanin- otrzymane połączenia wykazywały dobrą rozpuszczalność w DMF a także w DMSO. Co ważne, badania spektroskopowe ($^1\text{H-NMR}$, zależność absorbancji mierzonej w maksimum pasma Q w widmie elektronowym - w funkcji stężenia) wykazały brak agregacji badanych związków w zakresie stężeń $2 \times 10^{-7} \text{ M} - 2 \times 10^{-5} \text{ M}$. Otrzymane połączenia charakteryzowały się wysoką stabilnością fotochemiczną. Niestety wydajność generowania tlenu singletowego przez otrzymane połączenia jest znacząco niższa niż ta wyznaczona dla ftalocyjaniny magnezowej (np. dla MgPc w DMF $\Phi_{\Delta} = 0.48$, a dla najbardziej wydajnej pochodnej benzoksyłowej $\Phi_{\Delta} = 0.14$). Co ciekawe, zaobserwowano, że chociaż wprowadzenie podstawników benzoksyłowych do struktury ftalocyjaniny magnezowej zwiększa trzykrotnie wydajność kwantową generowania tlenu singletowego w stosunku do tej obserwowanej dla pochodnej propoksyłowej to wprowadzenie jeszcze bardziej rozbudowanych strukturalnie podstawników dendrymerycznych nie prowadzi do dalszego zwiększenia tej wielkości. Powstaje zatem pytanie o to czy wyniki przeprowadzonych badań i dane literaturowe umożliwiają Autorowi rozprawy sformułowanie hipotezy wyjaśniającej tę obserwację.

W kolejnym etapie badań, podsumowanym w publikacji: Tillo A, Kryjewski M, Bendzinska-Berus W, Langer D, Rebis T, Popenda L, Jurga S, Mielcarek J, Goslinski T, Tykarska E., "Tetrapyrizinoporphyrazine with eight peripheral adamantanylsulfanyl units -Synthesis and physicochemical study ", Synthetic Metals, 2018, 244, 66-72 przeprowadzono syntezę bardzo ciekawego połączenia makrocyklicznego -tetrapirazinoporfirazyny cynku z ośmioma grupami 1-adamantylsulfanyłowymi (TPyzPzZn) jako podstawnikami peryferyjnymi. Określono także

właściwości spektroskopowe, fizykochemiczne i fotochemiczne tego związku. Ustalono, że TPyzPzZn efektywnie absorbuje promieniowanie w zakresie powyżej 650 nm - w elektronowym widmie absorpcyjnym obok pasma Soreta ($\lambda_{\max} = 392$ nm) obecne jest pasmo Q ($\lambda_{\max} = 662$ nm), dla którego wartość współczynnika ekstynkcji przekracza 10^5 ($\log \epsilon = 5.22$). Co istotne, TPyzPzZn wykazuje rozpuszczalność, rzędu kilku mikromoli, w rozpuszczalnikach różniących się znacznie polarnością (DCM, DMF, pirydyna, THF, toluen). Ponadto, dzięki obecności w układzie makrocyklicznym zawady sterycznej spowodowanej obecnością rozbudowanych podstawników adamantylowych agregacja TPyzPzZn w dobrym rozpuszczalniku jakim jest DMF (w zakresie stężeń – rzędu $10^{-6} - 10^{-5}$ M) jest wyeliminowana. Potwierdzają to zarówno badania zależności absorpcji w funkcji stężenia, wskazujące na spełnienie przez układ prawa Lamberta-Beera, jak i kształt oraz położenie pasm widma wzbudzenia. Konsekwencją zahamowania agregacji jest ograniczenie występowania niepożądanych procesów samowygaszania wzbudzonych stanów elektronowych cząsteczek badanego połączenia i obserwacja relatywnie wysokiej wydajności kwantowej fluorescencji: $\Phi_F = 0.27$ oraz, co ważniejsze, satysfakcjonującej wartości wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego: $\Phi_{\Delta} = 0.37$. Efektywność generowania tlenu singletowego jest także wzmocniona obecnością Zn w rdzeniu makrocyklu skutkującą wystąpieniem wewnętrznego efektu ciężkiego atomu. TPyzPzZn charakteryzuje się wysoką stabilnością fotochemiczną – wydajność kwantowa fotodegradacji powodowanej ekspozycją na działanie promieniowania o długości fali $\lambda > 450$ nm była niska i wynosiła: $\Phi_D = 1.8 \times 10^{-5}$. Bez wątpienia właściwości TPyzPzZn czynią to połączenie dobrym kandydatem w badaniach dotyczących nowych fotouczulaczy dla potrzeb PDT. Komentując wyniki badań przedstawionych w omawianej publikacji skoncentrowałam się na tych dotyczących syntezy i właściwości TPyzPzZn. Należy jednak zauważyć, że otrzymanie tego związku wymagało opracowania metod syntezy i sposobów oczyszczania szeregu związków pośrednich, stanowiących substraty w kolejnych etapach tego procesu. W publikacji i w materiałach uzupełniających oraz w komentarzu zamieszczono informacje niezbędne dla powtórzenia tych syntez. Co ważne, wskazano także na potencjalne problemy w tych syntezach. Na uznanie zasługuje także wysoka staranność z jaką dokonano charakteryzacji produktów pośrednich, a nawet produktów ubocznych. Szczególnie interesujących wyników dostarczyła rentgenowska analiza strukturalna przeprowadzona dla kryształów pochodnych dicyjanopirazyny, która umożliwiła określenie konformacji ich cząsteczek i oceny natury oddziaływań międzycząsteczkowych.

Kontynuując poszukiwania optymalnych fotouczulaczy dla potrzeb PDT otrzymano serię nowych pochodnych tetrapirazynoporfirazy i tribenzopirazynoporfirazy oraz

przeprowadzono badania ich właściwości, w szczególności te o istotnym znaczeniu dla możliwości zastosowania otrzymanych związków w terapii fotodynamicznej. Wyniki znalazły się w publikacji autorstwa Adam Tillo, Dariusz T. Młynarczyk, Lukasz Popenda, Barbara Wicher, Michał Kryjewski, Wojciech Szczolka, Stefan Jurga, Jadwiga Mielcarek, Maria Gdaniec, Tomasz Gośliński, Ewa Tykarska, zatytułowanej: „*Synthesis and singlet oxygen generation of pyrazinoporphyrazines containing dendrimeric aryl substituents*” i opublikowanej w *New Journal of Chemistry*, 2017, 42, 3586-3594. Przeprowadzono syntezę odpowiednich prekursorów i stosując procedurę makrocyclizacji Linstead’a otrzymano dwie symetryczne (A4) magnezowe tetrapirazynoporfirazyny podstawione w pozycjach peryferyjnych grupami metoksyłowymi (6) lub bis(benzyloksy)-benzyloksyłowymi (7) oraz dwie asymetryczne (typ A₃B) magnezowe porfirazyny, odpowiednio z podstawnikami metoksyłowymi (8) i bis(benzyloksy)-benzyloksyłowymi (9). Tożsamość i czystość związków potwierdzono przy użyciu zaawansowanych technik analitycznych i spektroskopowych. Otrzymane związki absorbują promieniowanie w długofalowym zakresie spektralnym (maksima pasm Q obserwowane są w zakresie 658 nm – 677 nm). Obserwowano, że wprowadzenie hiperrozgałęzionych podstawników arylowych, stanowiących zawadę steryczną, powoduje ograniczenie oddziaływań międzycząsteczkowych molekuł pirazynoporfirazyn i ich agregacji, co skutkuje znacznym wzrostem wydajności kwantowej fluorescencji. Niestety, ta zmiana strukturalna nie wpływa na poprawę efektywności generowania tlenu singletowego. W publikacji nie znajduję próby wyjaśnienia tej obserwacji. Jakkolwiek najwyższą wartość wydajności kwantowej tworzenia tlenu singletowego uzyskano dla porfirazyny niesymetrycznej wyposażonej w peryferyjne podstawniki metoksy ($\Phi_{\Delta} = 0.26$) to jej zastosowanie może być ograniczone agregacją. Ciekawych informacji dotyczących organizacji przestrzennej i oddziaływań międzycząsteczkowych dostarczyła analiza rentgenostrukturalna pochodnych 2,3-dicyjanopirazynowych, stanowiących substraty w syntezie pirazynoporfirazyn.

Wnioski końcowe.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pana mgr Adama Tillo stwierdzam, że główny cel pracy został dobrze zdefiniowany, a dobór materiału i metod badawczych pozwolił na jego realizację. Badania, których rezultaty przedstawiono w niniejszej pracy, dotyczą ważnego obszaru badawczego. Prace doświadczalne zostały przeprowadzone starannie i dobrze przedstawione. Doktorant opanował zarówno podstawy syntezy

organicznej jak i fizykochemii. Opracował metody i przeprowadził szereg złożonych syntez nowych, ważnych związków organicznych. Udoskonalił metody oczyszczania uzyskiwanych produktów. W sposób właściwy dokonał doboru technik badawczych, przeprowadził pomiary i zinterpretował uzyskane wyniki.

Pan mgr Adam Tillo jest współautorem **5** publikacji w specjalistycznych czasopismach naukowych oraz **16** prezentacji konferencyjnych.

Biorąc pod uwagę powyższe uważam, że spełnione są warunki ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r (Dz. U. nr 65) i wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr Adama Tillo do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną pracy, fakt opublikowania zawartych w niej wyników w uznanych specjalistycznych czasopismach naukowych wnoszę o jej wyróżnienie.

Kraków 30.04.2019 r.

M. Nowakowska