



prof. dr hab. Alina Dudkowiak
Zakład Fizyki Molekularnej
Instytut Fizyki

Poznań, dnia 8 maja 2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Eweliny Wieczorek

pt. ***“Synteza i charakterystyka fizykochemiczna podstawionych aminoporfirazyn i diazepinoporfirazyn o potencjalnej aktywności biologicznej”***

wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Tomasza Goślińskiego (promotora) i dr. Jarosława Piskorza (promotora pomocniczego) w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Praca doktorska pani Eweliny Wieczorek dotyczy syntezy i charakterystyki fizykochemicznej fotouczulaczy o potencjalnej aktywności biologicznej. Historia badań związanych z aktywnością biologiczną fotouczulających związków stosowanych w fotodynamicznej terapii datuje się od początku XX wieku, kiedy Hausmann i Hasselbach zauważyli, że chlorofil i światło w obecności tlenu wywołują hemolizę erytrocytów. Rozwój wiedzy, metod syntezy i technik eksperymentalnych sprawia, że poszukiwanie idealnych fotouczulaczy (trzeciej generacji) jest nadal niezwykle interesującym i aktualnym wyzwaniem podejmowanym przez wiele interdyscyplinarnych zespołów badawczych w kraju i na świecie, w tym między innymi w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych na Wydziale Farmaceutycznym pod kierunkiem prof. dr. hab. Tomasza Goślińskiego. Prowadzone badania w ramach pracy doktorskiej koncentrują się na poszukiwaniu odpowiednich fotouczulających związków nie tylko dla fotodynamicznej terapii stosowanej w leczeniu nowotworów, ale także fotodynamicznej terapii skierowanej przeciw mikroorganizmom (PACT).

Przedłożona przez panią Ewelinę Wieczorek rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór czterech publikacji opatrzonej 46 stronicowym komentarzem. W rozprawie zawarto następujące rozdziały: (i) wykaz stosowanych skrótów, (ii) sylwetkę naukową

doktorantki, (iii) wstęp teoretyczny, (iv) przedmiot badań i zastosowaną metodykę, (v) cel pracy, (vi) omówienie wyników stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, (vii) podsumowanie wyników i wnioski, (viii) literaturę, (ix) streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, (x) przedruki publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe oraz oświadczenia współautorów. Rozprawa została napisana poprawnym językiem naukowym, logicznie zostały ułożone rozdziały i przedstawione dane, jak również w komentarzu odpowiednio dobrana literatura, która liczy 49 pozycji.

We wstępie teoretycznym pani Ewelina Wieczorek wprowadziła pojęcie fotouczulacza, przedstawiła mechanizmy reakcji fotodynamicznej, jak również wymagania stawiane potencjalnym barwnikom-fotouczulaczom oraz podała przykłady związków wykorzystywanych w medycynie. Następnie w przejrzysty sposób omówiła możliwości modyfikacji cząsteczki porfirazyny prowadzące do uzyskania barwników o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych, w tym amino- i diazepinoporfirazyn będącym przedmiotem badań pracy doktorskiej. Doktorantka szczególną uwagę poświęciła pochodnym diazepinoporfirazyn, opisała chronologicznie rozwój badań oraz stan wiedzy na podstawie dostępnych doniesień literaturowych oraz doświadczeń i osiągnięć Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Lecznicznych oraz Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej. W dalszej części Doktorantka przedstawiła zastosowaną metodykę badań obejmującą procedurę syntezy i charakterystykę fizykochemiczną badanych związków z uwzględnieniem badań prowadzonych przez współautorów publikacji, które wchodzi w skład Jej rozprawy doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje, biorąc pod uwagę oświadczenia pani Eweliny Wieczorek, że wykonała ona samodzielnie syntezę: trzech pochodnych diazepinowych, diazepinoporfirazyny z rozgałęzionymi ugrupowaniami dendrymerycznymi w peryferium, prekursorów tribenzodiazepinoporfirazyny i diazepinoporfirazyny symetrycznej, aminoporfirazyny wraz z substratami do jej syntezy oraz, że w pełni je scharakteryzowała. Zastosowane przez Doktorantkę metody eksperymentalne to: chromatografia cienkowarstwowa i kolumnowa, w tym HPLC, spektroskopia absorpcyjna w zakresie Uv-vis i IR, spektroskopia fluorescencyjna, magnetycznego rezonansu jądrowego oraz spektroskopia mas. Na potrzeby badań mikrobiologicznych Doktorantka opracowała formułacje liposomalne zawierające fotouczulacze, a ich wielkość określiła wykorzystując metodę dynamicznego rozpraszania światła. Ponadto, w ramach współpracy, uzupełniono charakterystykę zsyntezowanych związków wykorzystując dodatkowe badania fluorescencyjne metodą EEM (*excitation emission matrix*) oraz oceniono ich fotocytotoksyczności na linii komórkowej nowotworu prostaty.

Przeprowadzone przez panią Ewelinę Wieczorek badania miały na celu zsyntetyzowanie nowych pochodnych amino- i diazepinoporfirazyn charakteryzujących się fotocytotoksycznością w odniesieniu do bakterii lub komórek nowotworowych. Ze względu na złożoność problemu oraz konieczność sprostania wymaganiom stawianym fotouczulaczom badania podzielono na poszczególne etapy, podczas których konsekwentnie realizowano postawiony cel pracy. Niewątpliwie zaprojektowanie przemyślanej struktury i efektywna synteza związku o określonej budowie i czystości była najbardziej czasochłonnym etapem, stanowiącym punkt wyjścia do badań pozwalających na określenie pożądanych właściwości fizykochemicznych fotouczulacza (brak tendencji do agregacji, fotostabilność, wydajność generowania tlenu singletowego, ect.) oraz jego fotocytotoksyczności w zależności od formy związku (wolna lub po enkapsulacji w liposomy). Zaplanowanie badań, sposób ich realizacji, przedstawienia i interpretacji wyników wskazują, że założony cel został zrealizowany, a wyniki zostały opublikowane w oryginalnych pracach w specjalistycznych czasopismach.

Szczegółowe badania i ich wyniki znajdujące się w poddanych ocenie pracach dotyczą:

1. *Journal of Molecular Structure* 1110, 2016, 208-214 – Przedmiotem badań były styrylowe pochodne 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli, które zsyntezowano oraz scharakteryzowano za pomocą spektroskopii absorpcyjnej i fluorescencyjnej (w tym EEM) oraz badań krystalograficznych i metodą jądrowego rezonansu magnetycznego. Pokazano, że pierścień diazepinowy w otrzymanych związkach wykazuje formę tautomeryczną 6H, a dla podstawników styrylowych zaobserwowano *trans*-izomeryzację, jednakże badane prekursorzy diazepinoporfirazyny nie wykazywały reaktywności w reakcji makrocyclizacji. Natomiast badania fotofizyczne tych związków w różnych rozpuszczalnikach organicznych (acetonitryl, chloroform, metanol, etanol, dichlorometan) pozwoliły określić dwa charakterystyczne pasma absorpcji oraz oszacować wydajności kwantowe fluorescencji rzędu 10^{-5} - 10^{-4} .
2. *Tetrahedron Letters* 58, 2017, 758-761 – W pracy badana była dendrymeryczna diazepinoporfirazyna magnezowa typu G1, którą zsyntezowano wykorzystując prekursorzy z podstawnikami fenyłowymi. Właściwości nowego związku, będącego pierwszym przykładem rozbudowanej diazepinoporfirazyny o dużej masie cząsteczkowej, scharakteryzowano metodą jądrowego rezonansu magnetycznego, spektroskopii mas i spektroskopii absorpcyjnej. Oceniono tendencje nowego związku do agregacji, przypisano pasmo przy 675 nm do formy monomerycznej, jak również oszacowano wydajność generowania tlenu singletowego dla formy monomerycznej ($0,295 \pm 0,024$) i zagregowanej ($0,090 \pm 0,007$).

3. *European Journal of Medicinal Chemistry* 150, 2018, 64-73 - Przedmiotem badań były trzy diazepinoporfirazyne magnezowe (z ugrupowaniami dendrymerycznymi, symetryczna oraz niesymetryczna z podstawnikami metoksyfenylowymi). Przeprowadzono syntezę barwników z podstawnikami metoksyfenylowymi i scharakteryzowano je wykorzystując spektroskopię absorpcyjną, jądrowego rezonansu magnetycznego i spektrometrię mas. Oceniono tendencje do agregacji i generowania tlenu singletowego nowo zsyntezowanych związków i porównano z tą uzyskaną dla dendrymerycznej pochodnej. Sprawdzone także ich fototoksyczność w odniesieniu do komórek nowotworowych i bakterii stosując dwie formy związku (wolną i enkapsulowaną w dodatnio lub ujemnie naładowanych liposomach). Wykazano, że tribenzodiazepinoporfirazyne enkapsulowana w liposomach efektywnie działa na komórki nowotworowe w warunkach hipoksji oraz w dodatnio naładowanych liposomach na bakterie Gram-dodatnie.
4. *Heterocyclic Communications* 25, 2019, 1-24 – W kolejnej pracy badano aminoporfirazyne (porfirazyne magnezową z peryferyjnie przyłączonymi grupami metylo(3,5-dibromofenylometylo)aminowymi), którą zsyntezowano i scharakteryzowano wykorzystując spektroskopię absorpcyjną Uv-vis i IR oraz emisyjną i spektroskopię mas oraz jądrowego rezonansu magnetycznego. Badania spektroskopowe otrzymanego związku pokazały niską wydajność do generowania tlenu singletowego i brak emisji fluorescencji, co sugeruje możliwość występowania innych, konkurencyjnych procesów dezaktywacyjnych.

Wyniki i ich interpretacja przedstawione przez panią Ewelinę Wieczorek w cyklu publikacji naukowych stanowiących jej rozprawę doktorską w pełni pokazują, że cele pracy zostały zrealizowane. Praca ma logiczny układ wytyczony przez możliwości syntezy poszczególnych związków oraz wnioski, które krok po kroku wynikają z niepowodzeń i sukcesów w uzyskiwaniu coraz to lepszych struktur o określonych właściwościach fizykochemicznych. Uważam, że do głównych osiągnięć będących wynikiem realizacji ocenianej rozprawy można zaliczyć (i) zsyntezowanie diazepinoporfirazyne, która powstała dzięki weryfikacji strategii syntezy i zmianie podstawników styrylowych na fenylowe, co po raz pierwszy umożliwiło syntezę dendrymerycznej diazepinoporfirazyne (typu G1) oraz otworzyło możliwości syntezy nowych związków, (ii) pokazanie możliwości modulowania wydajności tlenu singletowego dla symetrycznych diazepinoporfirazyne stosując fluorek tetrametyloamoniowy jako czynnik dezagregujący, (iii) wykazanie, że fotocytotoksyczność niesymetrycznej tribenzodiazepinoporfirazyne zależy od zastosowanej formułacji, składu lipidów oraz stężenia tlenu. Badania te pokazują, jak szerokie jest spektrum zmiennych, które należy brać pod uwagę poszukując idealnego fotouczulacza oraz jak wiele wyzwań eksperymentalnych jest jeszcze

przed naukowcami. Należy też podkreślić, że kompleksowe podejście do badań zaprezentowane w pracy *European Journal of Medicinal Chemistry* potwierdza wysoki poziom przeprowadzonych interdyscyplinarnych badań, znakomity warsztat eksperymentalny i umiejętność komplementarnego potraktowania problemu, jak również zdolność zaplanowania badań od syntezy poprzez badania podstawowe do badań biologicznych oraz konsekwentnego rozwiązywania problemów i interpretacji wyników przez panią Ewelinę Wieczorek.

Z obowiązku recenzenta, chciałabym zwrócić uwagę na pewne kwestie, które pojawiły się podczas czytania pracy i poproszę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony: (i) na rys. 1 wydaje się, że odpowiednim podpisem byłby – Uproszczony diagram Jabłońskiego, oraz należałoby dodać opis – wzbudzony stan trypletowy, natomiast jako uwaga merytoryczna – przejście międzysystemowe powinno być, tak jak pozostałe, przejściem pionowym; (ii) na str. 22 i w publikacji 1 podano dwa różne wzory stosowane do wyznaczenia wydajności kwantowej fluorescencji – proszę o skomentowanie różnic; (iii) jak można wyjaśnić przedstawione w publikacji 3 nieznaczące różnice w wydajności generowania tlenu singletowego w DMSO dla symetrycznej diazepinoporfirazy z podstawnikami metoksyfenyłowymi bez i z dodatkiem fluorku tetrametyloamoniowego zmniejszającego agregację, w odniesieniu do różnic uzyskanych w DMF? (iv) proszę zaproponować eksperymenty, które pozwoliłyby określić, jakie drogi dezaktywacji energii są aktywne w aminoporfirazynie będącej przedmiotem badań w publikacji 4?

Podjęta w pracy doktorskiej pani mgr Eweliny Wieczorek tematyka była realizowana w ramach projektu badawczego Sonata Bis finansowanego przez Narodowego Centrum Nauki i w ramach owocnej współpracy pomiędzy różnymi Katedrami i Zakładami Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Centrum NanoBioMedycznym przy Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Na dorobek naukowy Doktorantki składają się 4 oryginalne prace opublikowane w specjalistycznych czasopismach z bazy JCR o sumarycznym wskaźniku *impact factor* 9,394. Warto dodać, że wyniki badań z współautorstwem Doktorantki były prezentowane na 22 konferencjach międzynarodowych (w tym osobiście: 2-krotnie jako prezentacje ustne i 10-krotnie w formie posteru) oraz na 5 konferencjach krajowych (w tym 3-krotnie osobiście jako prezentacje posterowe). Jako wykonawca brała również udział w realizacji dwóch projektów Sonata finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, odbyła dwa staże naukowe w Instytucie Chemii Organicznej PAN i w Laboratorium Chemii Polimerów w Center for Biomaterials, State University of New Jersey.

Reasumując, pani mgr Ewelina Wieczorek w bardzo przejrzysty sposób przedstawiła cel podjętych badań, który potrafiła z sukcesem zrealizować. Wykazała się znajomością zagadnień

teoretycznych i bardzo dobrym przygotowaniem eksperymentalnym. Rozprawa doktorska oraz sformułowanie na podstawie badań wnioski wnoszą cenne z naukowego punktu widzenia informacje i pokazują dobre przygotowanie pani Eweliny Wieczorek oraz dojrzałość do samodzielnego prowadzenia interdyscyplinarnych badań naukowych.

Biorąc pod uwagę powyższą ocenę stwierdzam, że przekazana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 „Ustawy o stopniach naukowych i tytule...” z 14 marca 2003 r. (z późn. zm.), dlatego też przedkładam Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wniosek o przyjęcie mojej rekomendacji i dopuszczenie pani mgr Eweliny Wieczorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.

Alina Dmochowska