

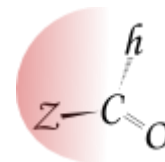


Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

Zakład Chemii Organicznej

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

tel.: +48 22 234 7572; e-mail: stan@ch.pw.edu.pl



Warszawa, 23 marca, 2019 r.

Stanisław Ostrowski  
Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska  
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Justyny ŚNIECHOWSKIEJ,  
z tytułowanej  
"Synteza i badania strukturalne modyfikowanych porfirynoidów"**

Rozprawa doktorska **mgr inż. Justyny Śniechowskiej** dotyczy syntezy, badań strukturalnych i biologicznych porfirynoidów. Ze względu na właściwości spektroskopowe oraz obecność porfiryn i porfirynoidów w przyrodzie, stanowią one ważną grupę związków i budzą zainteresowanie badaczy z różnych dziedzin. Dotyczy to także wszelkich pochodnych syntetycznych i analogów. Należy dodać, że sama Natura wybrała niektóre układy tego typu (np. hem i chlorofil) do pełnienia kluczowej roli w ważnych dla życia procesach na poziomie molekularnym.

Praca jest serią pięciu publikacji, w których Doktorantka pojawia się jako współautorka. Została wykonana w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, a promotorem rozprawy jest prof. dr. hab. Marek Potrzebowski. Mieści się ona w szerokim spektrum zainteresowań promotora. Praca plasuje się w trzech obszarach: syntetycznym, badań strukturalnych i badań biologicznych. Tak zresztą zadeklarowała Autorka na początku rozprawy. Zamieszczone w dysertacji publikacje poprzedza między innymi wprowadzenie do tematyki, opis niektórych technik badawczych, sformułowany cel i zakres pracy oraz omówienie wyników, stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Jest jeszcze streszczenie pracy (w języku polskim i angielskim) i *Przedmowa*, która nie doczekała się już miejsca w *Spisie treści*, zamieszczonym na str. 4. Na końcu są oświadczenia współautorów, dotyczące ich udziałów w publikacjach. Zdaniem recenzenta, w takich przypadkach powinien być uzgodniony i określony procentowy udział wszystkich autorów. A tak nie jest; spośród 11 współautorów tylko jeden podał to w ten sposób.

Objektami badawczymi wybranymi przez Doktorantkę były trzy rodzaje w/w porfirynoidów, a dokładniej: (a) 5,10,15-tris(pentafluorofenylo)korol, (b) fluorowane chloryny oraz (c) okso-spirochloryny. Związki były otrzymane przez Autorkę, która następnie poddała je szczegółowej analizie strukturalnej. Głównym narzędziem badawczym była spektroskopia NMR w cieczy i ciele stałym. Wybór tematyki, a także narzędzi badawczych uważam za właściwy, trafny i wystarczający na pracę doktorską. Wachlarz metod eksperymentalnych, dodatkowo wsparty w niektórych miejscach obliczeniami teoretycznymi, jest bardzo szeroki.

W *Rozdziale 3* Autorka przybliżyła Czytelnikowi obszar rozpatrywanych w pracy zagadnień, tzn. omówiła wybrane najciekawsze metody syntezy koroli i chloryn. Należy podkreślić, że swobodnie porusza się w tematyce porfirynowej. Dalej poświęciła kilka stron spektroskopii NMR ciała stałego jako technice badawczej, bardzo istotnej z punktu widzenia tej rozprawy. Ta technika instrumentalna jest powszechnie stosowana przez Doktorantkę do prowadzenia badań strukturalnych.

To fakt znaczący, bo jeszcze jakiś czas temu można było łatwo policzyć struktury tego typu rozwiązane i opisane w literaturze. Działo się tak ze względu na trudności w otrzymaniu odpowiedniej jakości kryształów. I tak pozostało do dzisiaj. Stosunkowo późno Autorka sformułowała cele i zakres pracy (na str. 28).

A główne cele pracy koncentrowały się na:

- po pierwsze, zaprojektowaniu, syntezie i funkcjonalizacji trzech rodzajów makrocyclicznych związków tetrapirolowych (praktycznie wszystkie to fluoropochodne);
- po drugie, szczegółowej analizie strukturalnej otrzymanych związków, w tym zbadaniu procesów dynamicznych (tzn. rotacji pierścieni w pozycjach *mezo*);
- po trzecie, analizie właściwości spektralnych i fotochemicznych fluorowanych chloryn w kontekście aktywności biologicznej.

Muszę jednak stwierdzić, że Autorka nie sformułowała ich w sposób zwięzły. Niepotrzebnie zaopatrzyła objaśnieniami i dodatkowymi informacjami, które i tak pojawiają się w innych częściach pracy. A tu spowodowały w pewnym sensie rozmycie tych zamierzeń w tekście.

Badania otwierają studia nad 5,10,15-tris(pentafluorofenylo)korolem. Doktorantka zaobserwowała tworzenie się kompleksów supramolekularnych gość–gospodarz dla w/w korolu z różnymi cząsteczkami rozpuszczalnika. Odpowiedni dobór układu gość–gospodarz (korol–rozpuszczalnik) okazał się być bardzo dobrą metodą otrzymywania chiralnych kryształów dla tego typu związków (które charakteryzują się małą wartością energii racemizacji). Chiralność potwierdziła za pomocą dichroizmu kołowego. Jest to bardzo efektowny fragment badań, zwłaszcza że dla porfirynoidów odnotowano tylko nieliczne przykłady tworzenia chiralnych kryształów z achiralnych związków.

Najbardziej obszerny (i obfitujący w wyniki) fragment pracy dotyczy chloryn. Były to niesymetryczne fluorowane chloryny – z dobudowanym pierścieniem *N*-metylopirolidyny. *Gros* materiału została opublikowana w *RSC Advances*. Autorka otrzymała najpierw fluorowane w *mezo*-pierścieniach porfiryny, które następnie poddała reakcji cykloaddycji z ylidem azometinowym, generowanym z odpowiedniej iminy (otrzymanej z *N*-metyloglicyny i paraformaldehydu). Substrat był podstawiony w pozycji  $\beta$ - grupą nitrową. Docelowo pozwalało to (1) aktywować układ na cykloaddycję oraz (2) zwiększyć stabilność produktu, który się nie utleniał. Z tym różnie bywa, bo stosunkowo łatwo zamiast utleniania zachodzi eliminacja  $\text{HNO}_2$ .

Otrzymane chloryny zostały poddane szczegółowej analizie. Autorka różnymi metodami zidentyfikowała produkty, a w widmach NMR dokonała kompletnego przypisania przesunięć chemicznych. Badaniom towarzyszyły ciekawe obserwacje. Na przykład, za interesujące trzeba uznać pojawienie się sygnałów korelacyjnych  $^1\text{H}$ – $^{19}\text{F}$  przez siedem wiązań. Doktorantka wyjaśnia ten fakt, wskazując, że rozpatrywane atomy znajdują się bardzo blisko siebie w przestrzeni (odległość rzędu 2.50-3.20 Å; jak wynika z obliczeń DFT). A pik korelacyjny jest konsekwencją nakładania się orbitali niewiązanych tych atomów.

II część publikacji poświęcona jest dynamice pierścieni arylowych, znajdujących się w pozycji *mezo* pierścienia rdzeniowego. Pierścienie te ulegają rotacji i jest to najlepiej poznany proces dynamiczny w porfirynoidach, zaobserwowany jeszcze przed pięćdziesięciu laty. Mimo tych lat, literatura, dotycząca powyższego zjawiska, w odniesieniu do chloryn, nie jest bogata. Tak więc sam pomysł zbadania dynamiki (czyż zajęła się Autorka) i jego realizacja są godne pochwały.

Doktorantka stwierdziła, że we wszystkich chlorynach rotacja *mezo*-pierścieni sąsiadujących z pierścieniem skondensowanej pirolidyny jest zahamowana. Jeśli pierścienie okalające pierścień *N*-metylopirolidyny mają podstawniki fluorowe w pozycji *orto*, to rotacja pozostałych dwóch pierścieni arylowych też jest zahamowana (chloryny **2**, **4**; str. 37). W chlorynach **3** i **5** – nie jest; i odpowiednie pierścienie ulegają rotacji.

Dynamika była badana w przedziale temperatur 233-353 K i 283-353 K w toluenie. Wychodząc z równania Arrheniusa, Autorka obliczyła energię aktywacji rotacji dla pierścieni arylowych w wybranej chlorynie. Wartość tej energii wyniosła około 18 kcal/mol. Wyznaczenie  $E_a$  było możliwe dla fluoro-podstawionych chloryn. Kiedy tego wewnętrznego wzorca w postaci atomów fluoru nie było, Autorka oszacowała tylko entalpię swobodną ( $\Delta G$ ). Następnie wyznaczyła temperatury, w których można selektywnie włączać lub wyłączać rotację poszczególnych pierścieni w chlorynach. Jest to zdaniem recenzenta szczególnie ciekawy fragment badań. Podsumowując, Doktorantka zademonstrowała, że niewielkie modyfikacje strukturalne mają wpływ na rotację pierścieni arylowych; i udowodniła, że ich dynamikę można kontrolować za pomocą temperatury.

Dalej Autorka skupiła się na poszerzeniu stosowalności reakcji Dielsa-Aldera, tzn. poszukiwaniu nowych dienów. Zsyntezowała w tym celu kilka ciekawych dienów jakimi są tetrazyny. Są to dieny inne niż dotychczas stosowane, mające odwrotne wymagania elektronowe (iEDD-A). W badaniach wykorzystwała tylko jedną pochodną, tj. 3,6-*bis*(2-pirydylo)-1,2,4,5-tetrazynę. Dienofilami były wzbogacone elektronowo 2-amino-5,10,15,20-tetraaryloporfiryny, które łatwo można otrzymać z odpowiednich nitropochodnych. Ale reakcje cykloaddycji nie przebiegały w/g zakładanego schematu.

Jest to rozdział bardzo frapujący, ponieważ wychodząc z podstawionej 1,2,4,5-tetrazyny Autorka, zupełnie 'niechcący', opracowała metodę syntezy okso-spirochloryn z pierścieniem dihydrotriazyny. Powiązała wydajność reakcji ze strukturą substratów – pozycją i charakterem elektronowym podstawników w pierścieniach *mezo*-arylowych, ale także z zawadą steryczną powodowaną przez te pierścienie. Niewątpliwie wszystkie wymienione czynniki odgrywają ważną rolę. Jednak mechanizm reakcji, według recenzenta, jest chyba ciągle kwestią otwartą.

Dostrzegam nieścisłości w zapisanym mechanizmie – przejście od struktury **B** do **C** (str. 76): (1) migracja protonu ma miejsce pomiędzy atomami azotu N(4) → N(2), (2) struktura **C** powinna być inna. I od razu jeszcze uwaga. Okso-spirochloryny nie są analogami chloryn. To pochodne chlorynowe o określonej strukturze. Podobnie jest z bakteriochlorynami i izobakteriochlorynami (Rysunek 6, str. 20).

Ciekawie mogłoby wypaść porównanie tej reakcji z cykloaddycją, w której rolę dienu będzie pełnić triazyna. Może jest tu także szansa na potwierdzenie któregoś z mechanizmów.

Badania zsyntezowanych chloryn obejmowały ocenę stabilności fotochemicznej, wyznaczenie wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego oraz szczegółowe przebadanie właściwości spektroskopowych. Pojawiły się także badania biologiczne. Grupy elektronoakceptorowe w cząsteczce, np. atomy fluoru, powodują spadek wydajności kwantowej fluorescencji. Pomimo obecności tych atomów odpowiednie chloryny miały dużą wydajność kwantową. Co więcej, zaobserwowano, że zwiększanie ilości atomów fluoru powoduje wzrost tej wydajności.

Chloryny absorbują mocniej w tzw. oknie terapeutycznym (650 – 800 nm); niż np. porfiryny. Jeśli chodzi o właściwości fotodynamiczne badanych układów, stwierdzono, że mogą mieć potencjalne zastosowanie. Wykazywały one bardzo

dobrą aktywność fotodynamiczną skierowaną przeciwko bakteriom *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus* oraz słabszą wobec *Escherichia coli*. Wobec dwóch wybranych i przebadanych grzybów były nieaktywne.

Na stronach 50-54 Autorka podaje swój dorobek. Jest to więcej niż materiał stanowiący treść rozprawy, który został opisany w pięciu oryginalnych publikacjach naukowych w renomowanych czasopismach o cyrkulacji międzynarodowej. Są tam także zestawione komunikaty konferencyjne, przyznane stypendia i nagrody. Zdaniem recenzenta wszystko co nie dotyczy doktoratu nie powinno być zamieszczone w pracy. Przy publikacjach są jeszcze podane wskaźniki *impact factor* i tzw. punkty ministerialne. To też są informacje 'nadmiarowe'.

I część oceny odnosząca się do samego tekstu, jego strony redakcyjnej, prezentacji danych, wszelkich potknięć literowych i innych błędów. Niektóre uwagi przesłałem bezpośrednio Autorce. W recenzji podaję tylko kilka przykładów, które wymagają komentarza lub dyskusji:

- 1) str. 5; wykaz skrótów: niektóre skróty odnoszą się do terminologii powszechnie stosowanej (np. NMR, MS, IR, DMF) – można było pominąć;
- 2) w nazwie *N*-metylopirolidyna: *N* należało zapisywać kursywą (w całej pracy);
- 3) str. 20: 'opracowanie nowych podejść do syntezy' – prościej byłoby 'nowych metod';
- 4) str. 21: nazwa fotouczulacza *werteporfiny* powinna być podana po polsku (nie *Visudyne*);
- 5) str. 47: 'przesunięcia chemiczne dla węgla' (żargon); powinno być 'dla atomów węgla';
- 6) str. 70 (synteza porfiry **6**): metoda do której odwołuje się praca to metoda Adlera-Longo, tak więc zapis Alder *et al.* jest niepoprawny; ale na etapie przygotowywania rozprawy doktorskiej Autorka już nie miała na to żadnego wpływu;
- 7) str. 71: Dokładność przy podawaniu położenia sygnałów w widmach <sup>13</sup>C NMR do 0.1 ppm jest wystarczająca. Chociaż w tym przypadku rozumiem Autorkę (podała z dokładnością do 0.01 ppm) – dla niektórych fluoropochodnych chloryn wszystkie sygnały były widoczne (np. związek **1** na str. 71); a ponieważ przesunięcia chemiczne dla atomów węgla różniły się nieznacznie, był to sposób na przypisanie im niezależnych wartości.
- 8) Stałe sprzężenia *J* powinny być uśrednione (np. związek **1**, str. 71; także związek **3** na tej samej stronie). Powinny być również podawane z tą samą dokładnością, a nie zawsze tak jest (np. dla związku **4**, str. 71).
- 9) Z niewiadomych przyczyn porządek podawania sygnałów w widmie <sup>13</sup>C NMR dla związku **3** (str. 71) został zaburzony. Podobny los spotkał wartość *m/z* w widmie MS (MALDI) dla związku **4** (na tej samej stronie); tym razem została ona 'ukryta'.
- 10) str. 80: wydajności związków **6a-d** są źle obliczone.
- 11) str. 80: Trudno jest mi uwierzyć w multiplet pochodzący od jednego protonu ciągnący się w przedziale 7.07-7.48 ppm (związek **6c**). Oczekiwałbym też krótkiej dyskusji w trakcie obrony dotyczącej pojawienia się bardzo dużej stałej *J* w związku **6b**; *J* = 27.9 Hz.
- 12) Wiele potknięć w spisie literatury jest wynikiem działań 'copy-paste'. W odsyłaczach [99] i [100] zaskutkowało to nawet zmianą nazwiska samej Autorki.

Reasumując, zawarte w recenzji uwagi krytyczne nie zmieniają mojej pozytywnej oceny pracy doktorskiej. Wyznaczone na początku cele zostały osiągnięte. Autorka wykorzystwała duże spektrum metod spektroskopowych przy ustalaniu struk-

tury związków, wykazując przy tym biegłość w posługiwaniu różnymi metodami i technikami badawczymi. Podana jest możliwie pełna charakterystyka spektroskopowa tych układów.

Przedstawiona przez Panią mgr inż. Justynę Śniechowską rozprawa spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi o dopuszczenie jej autorki do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. Śniechowska', written in a cursive style.