

Prof. dr hab. Cyryl Lechosław Latos-Grażyński
Członek rzeczywisty PAN
Wydział Chemii
Uniwersytet Wrocławski
ul. F. Joliot-Curie 14
Wrocław 50 383
e-mail lechoslaw.latos-grazynski@chem.uni.wroc.pl
<http://lq.chem.uni.wroc.pl/>

Wrocław 10. 12. 2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jaqueline Stelli Araujo Badarò

The synthesis and photophysical properties of novel indolizine-based fluorophores

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Jaqueline Stelli Araujo Badarò zatytułowana *The synthesis and photophysical properties of novel indolizine-based fluorophores* mieści się w dynamicznie rozwijającym się nurcie badań, zmierzających do generowania oryginalnych sond fluorescencyjnych, skutecznych w badaniach opartych o techniki bioobrazowanie. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Daniel Gryko.

Rozprawa prezentuje logiczny etap rozwoju tematyki badań, konsekwentnie prowadzonych w zespole badawczym promotora. W swoich długofalowych zamierzeniach prace zmierzają do konstrukcji nowych i skutecznie działających sond fluorescencyjnych. W recenzowanej rozprawie doktorskiej uwaga doktorantki koncentrowała się na konstrukcji oryginalnych sond fluorescencyjnych opartych strukturalnie o indolizynę.

Rozprawę doktorską Jaqueline Stella Araujo Badarò stanowi zbiór trzech oryginalnych, wymienionych poniżej artykułów naukowych¹⁻³ oraz jednego artykułu przeglądowego,⁴ poświęconego postępom w syntezie indolizyn:

- (1) Badaro, J. S. A.; Koszarna, B.; Bousquet, M. H. E.; Ouelle`e, E. T.; Jacquemin, D.; Gryko, D. T.
The Kröhnke synthesis of benzo[a]indolizines revisited: towards small, red light emitters
Org. Chem. Front. **2022**, 9, 1861-1874.
doi.org/10.1039/D2QO00097K
- (2) Badaro, J. S. A.; Wrzosek, A.; Morawski, O.; Szewczyk, A.; Deperasińska, I.; Gryko, D. T.
Strongly fluorescent indolizine-based coumarin analogs
Org. Chem. Front., **2024**, 11, 6627-6641,
doi.org/10.1039/D4QO01216J
- (3) Badaro, J. S. A.; Koszarna, B.; Perkowska, M.; Kandere-Grzybowska, K.; Kolygina, D. V.; Morawski, O.; Park, J.; Grzybowski, B.; Deperasińska, I.; Gryko, D. T.

The Hybrid of Indolizine and Merocyanine - A New Class of Organelle-Specific Dyes
Angew. Chem. Int. Ed **2025**, e202508044.
doi.org/10.1002/ange.202508044

- (4) Badaro, J. S. A.; Godlewski, B.; Gryko, D. T
Advances in the synthesis of indolizines and their pexpanded analogues: update 2016-2024,
Org. Chem. Front., **2025**, 12, 2860-2907.
doi.org/10.1039/D4QO02082K

Do zbioru publikacji doktorantka dołączyła merytoryczny opis, w którym precyzyjnie przedstawiła swoje osiągnięcia naukowe, odpowiednio podkreślając elementy eksploracji, w których jej rola była dominująca. Trafnie odniosła się także do aktualnego stanu wiedzy w obszarze syntezy indolizyn. Ten fragment opisu jest uzupełniony artykułem przeglądowym, włączonym w skład rozprawy.⁴ Przegląd ten bardzo kompetentnie dokumentuje stan aktualnych badań w obszarze syntezy indolizyn i jest dogłębnie udokumentowany 282 odnośnikami literaturowymi.

Po szczegółowej analizie przedstawionych publikacji, wprowadzenia, a także oświadczeń mgr Jaqueline S. A. Badarò oraz wszystkich współautorów stwierdzam, że wkład doktorantki do prowadzonych badań jest jednoznacznie określony. Dotyczy to tak części eksperymentalnej pracy jak i analizy wyników badań, a także ich finalnego przedstawienia w formie publikacji. Z oświadczenia doktorantki wynika również, że uczestniczyła ona w formowaniu koncepcji prac badawczych.

Jej prace eksperymentalne skoncentrowały się na syntezie tak substratów jak i finalnych związków – potencjalnych sond fluorescencyjnych. Dokonała także ich profesjonalnej charakterystyki, zgodnie z wymaganiami klasycznej chemii organicznej. Tę ocenę popieram moją analizą danych, wręcz wzorcowo prezentowanych w materiałach pomocniczych poszczególnych publikacji. Analiza ta pozwoliła także docenić ogrom wysiłku syntetycznego włożonego w realizację projektu doktorskiego. Należy także podkreślić, że trakcie realizacji rozprawy doktorantka uczestniczyła w pomiarach i analizie wyników eksperymentów, określających właściwości fotofizyczne nowych sond fluorescencyjnych. Badała także fotostabilność wybranych barwników.

Lista współautorów we wszystkich pracach jest bardzo dobrze uzasadniona multidyscyplinarnym podejściem, tak koniecznym w eksploracji nowych i nietrywialnych sond fluorescencyjnych. W każdej publikacji nazwisko mgr. Jaqueline S.A. Badarò znajduje się na pierwszym miejscu listy autorów, co zwyczajowo podkreśla jej liderującą rolę w realizacji prezentowanych badań.

W swoim wprowadzeniu doktorantka trafnie zwróciła uwagę na dynamiczny rozwój mikroskopii fluorescencyjnej jako skutecznego narzędzia, służącego do obrazowania żywych komórek. Metoda umożliwia badanie procesów komórkowych wykorzystując znaczniki fluorescencyjne. Stosowane powszechnie barwniki fluorescencyjne — takie jak rodaminy, kumaryny, fluoresceiny, cyjaniny czy BODIPY — pomimo swoich rozlicznych zalet — nie spełniają idealnie wielu wymagań narzucanych przez naturę prowadzonych badań, m.in. pod względem fotostabilności, znacznego przesunięcia Stokesa, wysokiej wydajności kwantowej (szczególnie w zakresie NIR) oraz przenikalności molekuł przez błonę komórkową.

Jaqueline S.A. Badarò stwierdziła, że indolizyny, niewielkie, bogate w elektrony aromatyczne heterocykle stanowią alternatywną platformę do projektowania barwników fluorescencyjnych o korzystnych właściwościach fotofizycznych. Doktorantka dokonała analizy dotychczasowych ograniczeń związanych z ewentualnym stosowaniem sond indolizynowych, jakimi są:

- ograniczenia fotofizyczne (absorpcja i emisja światła w niebieskim obszarze widma UV–Vis, zbyt niskie wydajności kwantowe)
- stabilność chemiczna (wysoka reaktywność obniżająca stabilność w środowisku biologicznym)
- dostępność syntetyczna i możliwości modyfikacji (słabo rozwinięta chemia syntetyczna).

Podstawowym celem rozprawy doktorskiej, jednoznacznie określonym przez doktorantkę, jest pogłębienie wiedzy dotyczącej indolizyn o rozszerzonym układzie sprzężonych wiązań π . W sposób oczywisty nowe związki traktowane były jako potencjalne sondy fluorescencyjne w bioobrazowaniu. Wprowadzone modyfikacje minimalizować muszą wymienione powyżej ograniczenia.

W mojej ocenie zaproponowane cele badawcze rozprawy doktorskiej mgr. Jacqueline Stella Araujo Badarò są ambitne i niewątpliwie charakteryzują się wyraźnie wysokim stopniem trudności. Sprowadzić je można do trzech zasadniczych nurtów badawczych :

Specyficzne cele rozprawy to:

1. Synteza π -rozszerzonych indolizyn poprzez udoskonalenie istniejących metod syntezy i opracowanie nowych ścieżek syntetycznych dla dwóch klas związków: benzo[a]indolizyn (optymalizacja metodologii Kröhnkego) oraz pyrano[2,3-b]indolizyn (optymalizacja metodologii Kakehiego).
2. Opracowanie nowej klasy barwników polimetinowych zawierających indolizynę jako donor elektronów, zastępując klasyczną grupę dialkilaminową, obecną w strukturach typu merocyjanin.

3. Przeprowadzenie kompleksowych badań właściwości absorpcyjnych, emisyjnych i stabilności benzo[a]indolizyn, pyrano[2,3-b]indolizyn oraz indolizyno-merocyjanin.

Zakres badań obejmował zarówno udoskonalanie istniejących ścieżek syntezy znanych rdzeni indolizynowych, jak i opracowanie nowych strategii syntetycznych, prowadzących do oryginalnych motywów strukturalnych. Szczególny nacisk położono na racjonalizację wpływu doboru podstawników na właściwości fotofizyczne otrzymywanych związków. Takie podejście umożliwiło identyfikację struktur o szczególnie obiecujących właściwościach, istotnych dla dalszych zastosowań biologicznych. Przedstawione wyniki stanowią istotny wkład w rozwój chemii indolizyn oraz w projektowanie nowych sond fluorescencyjnych dla celów bioobrazowania

Kryterium sukcesu podjętych badań jest oczywiste. Zaprojektowane pochodne indolizyn winny wykazywać pożądane właściwości fluorescencyjne. W tej ewaluacji istotne jest także wykazanie możliwości skutecznego użycia otrzymanych sond fluorescencyjnych jako barwników w bioobrazowaniu

Jak należało oczekiwać, istotą powodzenia w tak zarysowanym temacie badawczym jest dobre opanowanie metod syntetycznych w bardzo wymagającej syntezie organicznej. Mogę z przekonaniem stwierdzić, biorąc pod uwagę jakość i rozmiar zrealizowanego projektu, iż mgr Jaqueline S. A. Badarò sprostała trudnościom w postawionych jej zadaniach. W tym kontekście należy podkreślić wagę głównego osiągnięcia metodologicznego doktorantki.

Mianowicie trzeci projekt syntetyczny doprowadził do odkrycia zupełnie nowej klasy fluoroforów indolizyno-merocyjanin (IndMers). Swoją oryginalnością zdecydowanie wykraczał poza, bardzo wartościowe dla dziedziny, udoskonalanie i rozwijanie metod Kröhnkego czy Kakehiego, a eksplorowane w dwóch pierwszych zadaniach syntetycznych Mianowicie z sukcesem zastosowano tandemową reakcję : alkilacji Friedla–Craftsa oraz wewnątrzcząsteczkowej nukleofilowej substytucji aromatycznej. Została ona uprzednio odkryta dla reakcji z 2,3,5,6-tetrafluoro-4-hydroksybenzaldehydem z aminofenolami (D.T. Gryko and co-workers, *Chem. Eur. J.* **2023**, 29, e202300979). Modyfikacja polegała na wprowadzeniu 2-hydroxyindolizyny zamiast pochodnej benzenu jako nukleofilowego partnera sprzęgania.

Naturalną konsekwencją rozwoju metod syntezy, zmierzających do generowania nowych sond fluorescencyjnych, jest dobrze zaplanowana eksploracja ich właściwości fizykochemicznych. Kolejny etap badań dotyczył prac nad ich zastosowaniami. Niewątpliwie w tym nurcie poszukiwań mgr Jaqueline S. A. Badarò uzyskała wyniki istotne z punktu widzenia wykorzystania sond fluorescencyjnych. Dla szeregu otrzymanych pochodnych doktorantka przeprowadziła badania fotofizyczne dokumentując wpływ podstawników na widma absorpcyjne oraz emisję fluorescencyjną. Wpływ modyfikacji na widma emisyjne jest

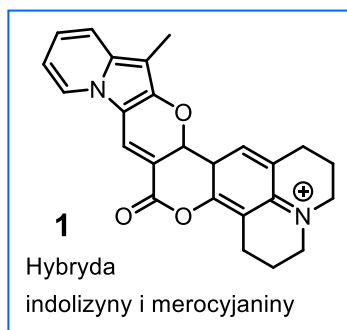
zilustrowany we wprowadzeniu odpowiednio opracowanymi rysunkami dla benzo[a]indolizyn (Rysunek 4), pirano[b]indolizyn (Rysunek 6) oraz wybranych przedstawicieli IndMerow (Rysunek 9), a następnie uzupełnione zestawieniem zbiorczym dla wszystkich wprowadzonych barwników (Rysunek 10). Na rysunkach tych zestawiono położenia pasm emisji fluorescencyjnej dla wybranych pochodnych w zestawieniu z ich wzorami strukturalnym.

Moją uwagę zwróciła również linia badawcza, w której wykorzystano odpowiednio wyselekcjonowane pochodne jako barwniki bioobrazowania. Oczywiście realizacja tych ambitnych i technicznie zaawansowanych celów badawczych była możliwa dzięki ścisłej współpracy z innymi grupami naukowymi, których ekspertyza obejmuje badania fluorescencji oraz bioobrazowanie.

W zastosowaniach biologicznych z użyciem mikroskopii konfokalnej, prowadzonych na komórkach włókniakomięsaka (fibrosarcoma), wykazano, że barwniki wykazują zróżnicowaną lokalizację w organellach komórkowych³:

- obojętne i dodatnio naładowane indolizyno-merocyjaniny lokalizują się w lizosomach
- dodatnio naładowany barwnik typu indolizyno-cyjaniny akumuluje się w mitochondriach
- barwnik kumarynowo-merocyjaninowy lokalizuje się w mitochondriach lub jąderkach bogatych w RNA, zależnie od warunków komórkowych

W tym nurcie badań szczególne nadzieje należy wiązać z hybrydą indolizyny i merocyjaniny



1, która charakteryzuje się wyjątkowo korzystnymi właściwościami, w tym emisją w zakresie NIR, rozpuszczalnością w wodzie, wysoką przenikalnością do komórek HT1080 (fibrosarcoma) oraz MRC5 (normalne ludzkie fibroblasty płucne), a także zależną od otoczenia akumulacją w mitochondriach i jąderkach bogatych w RNA (w porównaniu odpowiednio z MitoTracker™ Green FM i SYTO RNASelect™).

W moim odczuciu ten znakomity wynik determinuje wartość całej rozprawy.

Właściwości te czynią nową rodzinę barwników obiecującymi narzędziami do obrazowania komórkowego, o silnej emisji i regulowanej lokalizacji.

Powyższa, wysoka ocena części merytorycznej rozprawy, stanowi dobry punkt wyjścia dla komentarzy. W trakcie obrony oczekuję od doktorantki wyjaśnień, dotyczących zagadnień przedstawionych poniżej.

1.

Obliczenia metodami DFT (np. publikacja 2 *Org. Chem. Front.*, **2024**, 11, 6627-6641, ESI Table S2) wykazały zadowalające korelacje między obliczonymi i eksperymentalnymi położeniami pasm emisji fluorescencyjnej. W związku z tym, pojawia się możliwość

poprzedzenia syntezy obliczeniami dla szczególnego typu modyfikacji o teoretycznie optymalnych właściwościach emisyjnych hipotetycznej molekuly. Czy rozważano taką opcję?

2.

Badania fotostabilności (np. *Angew. Chem. Int. Ed* **2025**, e202508044, Figure 4) prowadzone były przy naświetlaniu nioselektywnym (lampa ksenonowa) przez arbitralnie wybranym czasem naświetlania. [(„To assess the photostability of compounds **3eMe**, and **5** in aqueous medium, their solutions were irradiated with a Xe lamp for approximately 2 h, while monitoring the absorption maxima over time” (Figure 4 and Figure S4)].

Badania z użyciem mikroskopu konfokalnego prowadzone były przy ściśle dobranej długości fali naświetlania. Czy rozważano prowadzenia fotostabilności z odtworzeniem warunków zbliżonych do generowanych pod mikroskopem. [(SI³, S58 „To assess the photostability of dye **5**, cells were continuously irradiated with a 638 nm diode laser (15 % of 28 mW) for 5 minutes at 1024 x 1024 resolution, no line averaging, 2.4 μs dwell time, and 1 frame every 8 seconds)”]

Można zasugerować przeprowadzenie badań fotostabilności z wykorzystaniem monochromatycznego źródła promieniowania (np. 638 nm). Eksperyment można realizować bezpośrednio w w probówce ¹H NMR, monitorując postęp reakcji za pomocą techniki ¹H NMR i wykonując pomiary w krótkich, regularnych odstępach czasu. Takie podejście umożliwia potencjalną identyfikację produktów pojawiających się na najwcześniejszych etapach degradacji barwnika.

Komentarze redakcyjne

Drobne uwagi – Wprowadzenie do rozprawy

- Schemat 5:
należy odwrócić zmienić zwrot strzałek w reakcji protonowania -deprotonowania
- Schematy 23, 24:
Podstawnik w pozycji 2 soli pirydyniowej powinien być homologiem -R (-CH₂-R) by sekwencja reakcji była prawidłowa.

Powyższe uwagi, wynikające z jednej strony z moich zainteresowań naukowych, a z drugiej strony z moich obowiązków recenzenta, nie wpływają w żadnym stopniu na moją bardzo wysoką ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej.

Recenzowaną rozprawę doktorską mgr Jaqueline Stelli Araujo Badarò, zatytułowaną ***The synthesis and photophysical properties of novel indolizine-based fluorophores*** oceniam bardzo wysoko. Rozprawa prezentuje interesujący i bardzo bogaty materiał doświadczalny, dotyczący sond fluorescencyjnych z wbudowany fragmentem indolizynowym. Szczególne

uznanie budzą przedstawione w rozprawie aspekty syntetyczne zrealizowane z dużą starannością i kreatywnością. Doceniam również konsekwentne dążenie doktorantki do opracowania sondy fluorescencyjnej o optymalnych właściwościach użytkowych. Niewątpliwie na wysoką ocenę wpłynął fakt, że systematyczny wysiłek syntetyczny doprowadził do odkrycia nowej klasy fluoroforów nazwanych przez doktorantkę indolizyno-merocyjaninami (IndMers). Co ważniejsze, wykazano, że działają one skutecznie jako znaczniki fluorescencyjne w bioobrazowaniu

Rozprawa spełnia wszystkie wymagania tak ustawowe (z art. 190 ust. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz 85 z późn. zm).) jak i wynikające z zasad postępowania w sprawie nadawania stopnia doktora w Instytucie Chemii Organicznej PAN (Uchwała Rady Naukowej IChO PAN nr 224RN/07 dn. 3 marca 2023 rr.),). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie jej autorki, mgr Jaqueline Stelli Araujo Badaró do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z racji wysokiej rangi wyników naukowych prezentowanych w rozprawie, udokumentowanych publikacjami w znaczących czasopismach naukowych, wnoszę o jej wyróżnienie.



Prof. dr hab. Lechosław Latos-Grażyński

Prof. dr hab. Cyryl Lechosław Latos-Grażyński
Członek rzeczywisty PAN
Wydział Chemii
Uniwersytet Wrocławski
ul. F. Joliot-Curie 14
Wrocław 50 383
e-mail lechoslaw.latos-grazynski@chem.uni.wroc.pl
<http://lq.chem.uni.wroc.pl/>

Wrocław 10. 12. 2025

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej
mgr Jaqueline Stelli Araujo Badarò

The synthesis and photophysical properties of novel indolizine-based fluorophores

Wnoszę o wyróżnienia rozprawy doktorskiej Jaqueline Stelli Araujo Badarò zatytułowanej *The synthesis and photophysical properties of novel indolizine-based fluorophores*

Rozprawa ta przedstawia **wyjątkowo oryginalne i wysokiej jakości wyniki naukowe**, w tym odkrycie nowej klasy fluoroforów – indolizyno-merocjanin (IndMers). Opracowana przez doktorantkę strategia syntetyczna, oparta na tandemowej reakcji alkilacji Friedla–Craftsa i wewnątrzcząsteczkowej substytucji nukleofilowej, stanowi **znaczący wkład** w rozwój chemii barwników fluorescencyjnych.

Doktorantka wykazała również, że opracowane związki znajdują **praktyczne zastosowanie w bioobrazowaniu komórek**. W tym nurcie badań szczególne nadzieje należy wiązać z hybrydą inindolizyny i merocyjaniny, która charakteryzuje się wyjątkowo korzystnymi właściwościami, w tym emisją w zakresie NIR, rozpuszczalnością w wodzie, wysoką przenikalnością do komórek HT1080 (fibrosarcoma) oraz MRC5 (normalne ludzkie fibroblasty płucne), a także zależną od otoczenia akumulacją w mitochondriach i jąderkach bogatych w RNA (w porównaniu odpowiednio z MitoTracker™ Green FM i SYTO RNASelect™).

Osiągnięcia te stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny, obejmując projektowanie i syntezę innowacyjnych struktur, ich wszechstronną charakterystykę fotofizyczną oraz zaawansowane badania biologiczne, realizowane w ramach szerokiej współpracy międzyzespolowej.

Wyniki zostały opublikowane w **renomowanych czasopismach naukowych** (*Org. Chem. Front*; *Angew. Chem. Int. Ed.*), co dodatkowo podkreśla ich rangę.

Mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną, znaczący wkład oryginalny oraz doniosłość uzyskanych wyników naukowych, zawartych w rozprawie doktorskiej mgr Jaqueline Stelli Araujo Badarò, wnoszę o uhonorowanie jej wyróżnieniem.


Prof. dr hab. Lechosław Latos-Grażyński