

Prof. dr hab. Lechosław Latos-Grażyński
Członek rzeczywisty PAN
prof. Uniwersytetu Wrocławskiego
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 24. 01. 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Dinesha Kumara Ganga Reddy'ego

Diketopyrrolopyrrole-based fluorescent probes for cations

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. *G. Dinesha Kumara* zatytułowana ***Diketopyrrolopyrrole-based fluorescent probes for cations*** mieści się w dynamicznie rozwijającym się nurcie badań, zmierzających do generowania oryginalnych sond fluorescencyjnych. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Daniel Gryko.

Rozprawa prezentuje logiczny etap rozwoju tematyki badań prof. dr. hab. Daniela Gryko. Zmierza ona do konstrukcji nowych sond fluorescencyjnych z wbudowanym fragmentem diketopirrololowym. Synteza nowych sond fluorescencyjnych pozostaje ściśle związana z wnikliwą eksploracją ich właściwości fotofizycznych. Kolejnym, dobrze uzasadnionym tematycznie obszarem eksploracji, są badania nad zastosowaniami oryginalnych sond fluorescencyjnych w bioobrazowaniu.

Rozprawę doktorską G. Dinesha Kumara stanowi zbiór trzech podanych poniżej artykułów naukowych:

- D1. **G. Dinesh Kumar**, M. Banasiewicz, D. Jacquemin, D. T. Gryko
Switch-on Diketopyrrolopyrrole-Based Chemosensors for Cations Possessing Lewis Acid Character
Chem. Asian J. 2021, 16, 355–362
- D2. **G. Dinesh Kumar**, M. Banasiewicz, A. Wrzosek, R. P. Kampa, M. H. E. Bousquet, D. Kusy, D. Jacquemin, A. Szewczyk, D. T. Gryko
Probing the flux of mitochondrial potassium using an azacrown-diketopyrrolopyrrole based highly sensitive probe
Chem. Commun., 2022, 58, 4500–4503
- D3. **G. Dinesh Kumar**, M. Banasiewicz, A. Wrzosek, O. O'Mari, M. Zochowska, V. I. Vullev, D. Jacquemin, A. Szewczyk, D. T. Gryko

A sensitive zinc probe operating via enhancement of excited-state intramolecular charge transfer

Org. Biomol. Chem., **2022**, *20*, 7439–7447

Do rozprawy doktorant dołączył merytoryczny opis, w którym zwięźle przedstawił swoje osiągnięcia naukowe. Umiejętnie odniósł się także do aktualnego stanu wiedzy, dokumentując odpowiedni opis aż 192 odnośnikami literaturowymi.

Po analizie wprowadzenia, przedstawionych publikacji a także oświadczeń doktoranta oraz współautorów publikacji stwierdzam, że wkład doktoranta do prowadzonych badań jest jednoznacznie określony. Dotyczy to tak części eksperymentalnej pracy jak i analizy wyników badań, a także ich finalnego zaprezentowania w formie publikacji. Z oświadczenia doktoranta wynika bowiem, że uczestniczył on również w formowaniu koncepcji prac badawczych. Jego prace eksperymentalne skoncentrowały się na syntezie tak substratów jak i finalnych związków – potencjalnych sond fluorescencyjnych. Dokonał on także ich profesjonalnej charakterystyki, zgodnie z wymaganiami klasycznej chemii organicznej.

W trakcie realizacji rozprawy doktorant uczestniczył w analizie wyników eksperymentów określających właściwości fotofizyczne nowych sond fluorescencyjnych. Brał również udział w interpretacji wyników, otrzymanych w trakcie prac nad zastosowaniem syntezowanych przez niego barwników w bioobrazowaniu.

Należy także zauważyć jego aktywny udział w redakcji manuskryptów trzech publikacji stanowiących rozprawę (opracowania pierwszej wersji manuskryptu [D2, D3] i udziałem w finalnej redakcji pracy [D1-3]).

Warto również podkreślić, że lista współautorów we wszystkich pracach jest dobrze uzasadniona multidyscyplinarnym podejściem, tak koniecznym w eksploracji nowych i nietrywialnych sond fluorescencyjnych. W każdej pracy nazwisko mgr. G. Dinesaha Kumara znajduje się na pierwszym miejscu listy autorów, co zwyczajowo podkreśla jego liderującą rolę w realizacji badań, których wyniki prezentuje dana publikacja.

Głównym celem badawczym rozprawy doktorskiej było zaprojektowanie i synteza nowej generacji sond fluorescencyjnych. Sondy takie powinny charakteryzować się szczególnymi właściwościami, takimi jak wysoka czułość, niska cytotoksyczność, nieinwazyjność, co w praktycznym świecie powinno zaowocować ich zastosowaniem w biologii molekularnej i medycynie. Swoją uwagę doktorant postanowił skoncentrować na sondach, których zachowanie fluorescencyjne jest kontrolowane przez koordynację kationów metali (Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) lub protonację. Podstawowym wyróżnikiem strukturalnym projektowanych sond jest obecność w ich szkielecie 4-diketopirolo[4,3-c]pirolu (DPP), posiadającego dwa różne podstawniki C-arylowe. W założeniach projektu podstawniki te determinują właściwości koordynacyjne. Prace syntetyczne uwzględniły rozszerzenie

dotychczasowego zakresu stosowalności metodologii syntezy asymetrycznych diketopirolopiroli, opracowanej uprzednio przez Daniela Gryko i współpracowników.

Kryterium sukcesu podjętych badań jest oczywiste. Zaprojektowane pochodne DPP winny wykazywać pożądane właściwości fluorescencyjne, kontrolowane przez stężenie wybranych jonów metalu lub kwasów Brønsteda. W tej ewaluacji istotne jest także wykazanie możliwości skutecznego użycia otrzymanych sond fluorescencyjnych jako barwników w bioobrazowaniu

Doktorant jako punkt wyjścia w konstrukcji oryginalnych sond fluorescencyjnych, a w konsekwencji eksplorowania ich właściwości, wybrał molekuly o wspólnym rdzeniu, którym jest 4-diketopirolo[4,3-c]pirol (DPP). Fundamentalne dla opracowania skutecznej strategii syntezy było stwierdzenie, że DPP jest podatny na chemiczną dekorację odpowiednio dobranymi elementami o specyficznym zdefiniowanej funkcjonalności. W modyfikacjach musiały być bezwzględnie spełnione dwa warunki dotyczące zachowania strukturalnej integralności 4-diketopirolo[4,3-c]pirolu oraz wprowadzenia elementów zdolnych do koordynacji czy też protonacji. Wprowadzone fragmenty winny wykazywać zdolność elektronowego oddziaływania z DPP. Połączenie cech elektronowych DPP oraz odpowiedniej funkcjonalizacji chemicznej w konsekwencji prowadzić powinno, zdaniem doktoranta, do wygenerowania skutecznie działających sond fluorescencyjnych.

W mojej ocenie zaproponowane cele badawcze rozprawy doktorskiej mgr. G. Dinesha Kumara są ambitne i niewątpliwie charakteryzują się wyraźnym stopniem trudności. Sprowadzić je można do trzech zasadniczych nurtów badawczych zmierzających do:

- konstrukcji sond fluorescencyjnych opartych o rdzeń diketopirolopirolu podstawionych eterem koronowym lub azakoronowym o właściwościach optycznych, determinowanych koordynacją Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} lub Zn^{2+}
- konstrukcji wysoce czułych sond potasowych (K^+) opartych o rdzeń diketopirolopirolu, podstawionego dwoma jednostkami elektrodonorowymi, z których jedna (fenylaza-18-korona-6) jest jednostką rozpoznania molekularnego kationów i to umieszczoną w najbardziej sprzężonej z chromoforem pozycji podstawnika arylowego
- konstrukcji sond fluorescencyjnych opartych o rdzeń diketopirolopirolu podstawionego dipikoloaminą jako jednostką rozpoznawania Zn^{2+} oraz Mg^{2+} , Cd^{2+} i H^+ o właściwościach fluorescencyjnych determinowanych koordynacją lub protonacją.

Ogólnie mogę stwierdzić, że wybór obiektów badań był bardzo trafny z punktu widzenia potencjalnych zastosowań. W mojej opinii powodzenie całego projektu badawczego uzależnione było od fundamentalnego etapu, tj. od skutecznej syntezy oryginalnych sond fluorescencyjnych o właściwościach zdeterminowana fundamentalną rolą chromoforu – diketopirolopirolu (DPP), modulowanych naturą dwóch C- arylowych podstawników.

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 G. Dinesh Kumar sprostał trudnościom w postawionych mu zadaniach. W tym kontekście należy podkreślić wagę głównego osiągnięcia metodologicznego doktoranta. Mianowicie rozszerzył on zakres stosowalności strategii syntezy asymetrycznych diketopirolopiroli, opracowanej uprzednio przez Gryko i współpracowników (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, 59, 7528–7535). Modyfikacja wprowadzona przez doktoranta umożliwia skuteczne wbudowywanie jednostek rozpoznania molekularnego takich jak etery koronowe czy etery azakoronowe (o różnych rozmiarach wnęki), a także di-(2-pikolilo)aminy. Wybór podjednostki funkcyjnej (np. określenie rozmiaru wnęki eteru koronowego) zależy od planowanej specyfiki analitycznej sondy.

W pierwotnym podejściu kondensacja nityli aromatycznych (pochodnych benzonitrylu lub isonikotynonitrylu) i piperolidyn-2-onu prowadzi do 1,4-diketopirolo[4,3-c]piroli (DPP) posiadających dwa różne podstawniki C-arylowe. Opracowana przez doktoranta procedura wykorzystuje także podjednostki benzonitrylu lub isonikotynonitrylu, tak kluczowe w finalnej kondensacji. Zostały one jednak w przemyślany sposób zmodyfikowane. Zawierały bowiem odpowiednio kowalencyjnie związane etery koronowe czy azakoronowe lub di(α -pikolylo)aminę.

Naturalną konsekwencją rozwoju metod syntezy, zmierzających do generowania nowych sond fluorescencyjnych, jest dobrze zaplanowana eksploracja ich właściwości fizykochemicznych. Kolejny etap badań dotyczy prac nad ich zastosowaniami. Niewątpliwie w tym nurcie poszukiwań mgr G. Dinesh Kumar uzyskał wyniki istotne z punktu widzenia wykorzystania sond analitycznych wybranych kationów metali. Moją uwagę zwróciła również linia badawcza, w której wykorzystano odpowiednio sfunkcjonalizowane pochodne DPP jako barwniki bioobrazowania. Oczywiście w realizacji tych ambitnych i technicznie bardzo zaawansowanych celów badawczych istotną była współpraca z innymi grupami naukowymi, których ekspertyza jest ulokowana odpowiednio w badaniach fluorescencji czy też bioobrazowania.

W tym nurcie poszukiwań na podkreślenie zasługują wyniki dotyczące badań nad diketopirolopirolowymi sondami fluorescencyjnymi, zawierającymi di(α -pikolylo)aminę jako jednostkę rozpoznania [D3]. Wykazały one zadowalające właściwości fotofizyczne, w tym silne przesunięcia batochromowe fluorescencji po kompleksowaniu Zn^{2+} oraz wysokie wydajności kwantowe fluorescencji. Metodami bioobrazowania wykazano także, że pokrewne sondy wzbogacone jednostkami PPh_3^+ i morfoliną są selektywnie zlokalizowane odpowiednio w mitochondriach i lizosomach komórek sercowych H9C2.

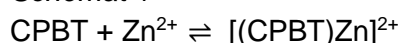
Wykazano, że sondy potasowe, zawierające fluorofory typu D-A-D', charakteryzują się wysoką czułością na obecność kationu K^+ . Demonstrowały one bardzo wysokie wydajności kwantowe fluorescencji i znaczne koordynacyjne przesunięcia fluorescencji w kierunku hipsochromowym [D2]. Natomiast wprowadzenie grupy PPh_3^+ umożliwiło ich selektywną akumulację s w mitochondriach komórek sercowych H9C2 oraz obserwację szybkiego wpływu/napływu mitochondrialnego K^+ po stymulacji nigerycyną.

Powyższa, wysoka ocena części merytorycznej rozprawy stanowi dobry punkt wyjścia dla komentarzy i uwag krytycznych, związanych z analizą i dyskusją wyników. W trakcie obrony oczekuję od doktoranta wyjaśnień dotyczącego zagadnień przedstawionych poniżej.

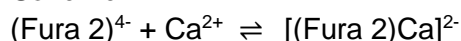
1.

W krótkim wprowadzeniu doktorant prezentuje reprezentatywne struktury sond fluorescencyjnych przed i po wprowadzeniu kationu metalu (Schematy 1-3).

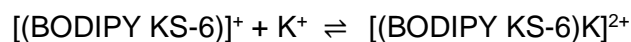
Schemat 1



Scheme 2



Scheme 3



(Dla uproszczenia anion Br^- nie jest uwzględniony w powyższym zapisie, natomiast we wprowadzeniu (Schemat 3) w strukturze ze skoordynowanym K^+ znajduje się zbędny proton, ulokowany na atomie fosforu (str. 25)).

W żadnej z prezentowanych struktur nie zaznaczono wiązań koordynacyjnych. W konsekwencji trudno jest uzasadnić wpływ obecności kationów w układzie na właściwości fluorescencyjne sond. Schematy sugerują, w sposób chyba niezamierzony, brak realnego oddziaływania kation – centrum koordynacji.

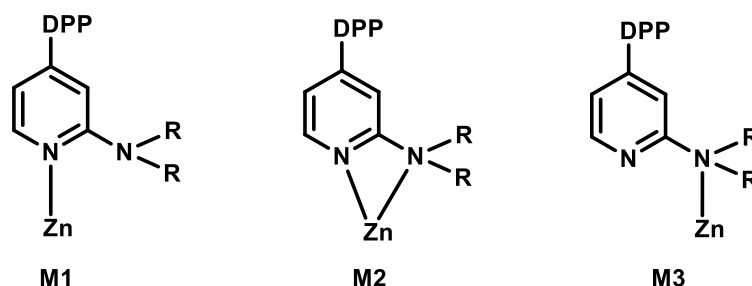
2.

W abstrakcie pracy D1 stwierdzono:

„The strong interaction of the cations possessing Lewis acid character such as Li^+ , Mg^{2+} and Zn^{2+} with 2-aminopyridin-4-yl-DPPs, leading to a bathochromic shift of both emission and absorption, as well as to strong enhancement of fluorescence was rationalized in terms of strong binding of these cations to the $N=C-NR_2$ functionality. The same effect has been observed for protonation.”

Niewątpliwie ta obserwacja jak i wynikająca z niej konkluzja są bardzo interesujące. Zbieżność parametrów fizykochemicznych fluorescencji (D1, Tabele 2 i 3) dla wszystkich pochodnych po przyłączeniu poszczególnych kationów jest wręcz uderzająca. Zaskoczył mnie niewątpliwie fakt, że kationy o tak różnym charakterze jak Li^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} i w granicznym aspekcie H^+ wiązać się mogą efektywnie się z fragmentem 2-aminopirydylowym, w sposób chelatowy, z jednostką $\text{N}=\text{C}-\text{NR}_2$.

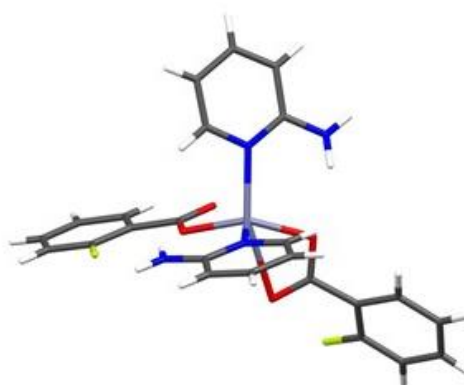
Formalne dla kationów tych można zaproponować trzy alternatywne sposoby koordynacji lub protonacji (M1, M2, M3), zilustrowane na przykładzie koordynacji Zn^{2+} .



Wyniki eksperymentalne, prezentowane w pracy D1 nie dostarczają żadnych twardej przesłanek co do trafności wyboru jednego z trzech przedstawionych motywów strukturalnych koordynacji, w szczególności nie wskazują na szczególną koordynacyjną rolę jednostki $\text{N}=\text{C}-\text{NR}_2$ (M2). Niewątpliwie motyw M2, sugerowany w rozprawie, wymaga utworzenia czteroczłonowego pierścienia chelatowego o dużym destabilizacyjnym naprężeniu. Wprawdzie w przypadku koordynacji Li^+ doktorant przytacza przykłady chelatowej koordynacji Li^+ przez dwa centra azotowe, np. przez fenantrolinę. Nie zauważa jednakże, że w tych związkach mamy do czynienia z pięcioczłonowym pierścieniem minimalizującym naprężenie. Ogranicza to istotnie trafność zastosowanej analogii strukturalnej.

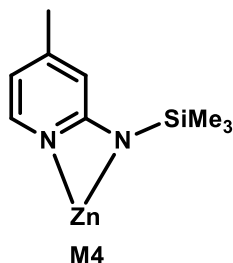


$\text{LiBH}_4(\text{thf})_2(\text{py}-2-\text{NH}_2)$
Ruiz et al
Eur. J. Inorg. Chem. **2008**, 251–266.
DOI: 10.1002/ejic.200700765



$\text{Zn}(\text{C}_7\text{H}_3\text{FO}_2)_2(\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2)_2$,
Yang et al.
Acta Cryst. **2004**,. E60, m1213
DOI 10.1107/S1600536804018884

Z konieczności raczej powierzchowne poszukiwanie konkretnych motywów strukturalnych w bazie danych CCDC skazuje na preferencje dla pierwszego motywu koordynacyjnego (M1), ilustrowane powyżej koordynacją kationów Li^+ oraz Zn^{2+} do 2-aminopirydyny. Fakt ten powinien być uwzględniony w dyskutowanej analizie. Dla pełności



opisu chciałbym także zauważyć że η^2 -koordynacja Zn^{2+} do 4-metylo-2-[(trimetylo)silylo]amino]pirydyny (Glatz *et al.* *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 1385–1392 DOI: 10.1002/ejic.200801094) pozwala na utworzenie czterocząłowego pierścienia chelatowego. Należy podkreślić, że mamy tutaj po do czynienia z ligandem typu amidowego.

Sądzę, że definitywne rozstrzygnięcie zauważonych problemów strukturalnych wymaga dogłębnego zbadania koordynacji omawianych kationów metali w roztworze z zastosowaniem technik NMR. Próba regularnej syntezy kompleksów z szeregiem sond fluorescencyjnych i ewentualne wyznaczenia struktur molekularnych metodami rentgenografii strukturalnej, dostarczyć powinny definitywnych konkluzji dotyczących korelacji między sposobem koordynacji a generowanymi przez koordynację właściwościami fluorescencyjnymi.

Analogiczny komentarz dotyczy sond cynku(II) omówionych w publikacji D3. W dyskusji wyników doktorant właściwie zauważa złożoność równowag koordynacyjnych. W jednym przypadku prezentuje nawet jeden z możliwych modeli strukturalnych, otrzymany na drodze optymalizacji metodą DFT. Również i tutaj korzystne byłoby systematyczne określenie struktur form, tworzonych w trakcie koordynacji Zn^{2+} . Uwzględnić należy również możliwe równowagi kwasowo-zasadowe wynikające z obecności wody w badanych, a wprowadzonej w hydratách soli cynku(II), które były stosowane w badaniach.

3.

W badaniu koordynacji jonów metali stosowano hydraty ich nadchloranów. Fakt ten powinien być jednoznacznie udokumentowany w części eksperymentalnej pracy w opisie stosowanych reagentów.

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 wysoką ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, recenzowana rozprawa doktorska prezentuje interesujący materiał doświadczalny, dotyczący sond fluorescencyjnych z wbudowanym diketopirolopirolem. W szczególności doceniam aspekty syntetyczne rozprawy. Recenzowaną rozprawę doktorską mgr. Dinesha Kumara Ganga Reddy'ego, zatytułowaną ***Diketopyrrolopyrrole-based fluorescent probes for cations*** oceniam wysoko.

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 206RN/18 z dnia 26 kwietnia 2019 r.),). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie jej autora, mgr. Dinesha Kumara Ganga Reddy'ego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Lechosław Latos-Grażyński