

Jacek Waluk  
Instytut Chemii Fizycznej PAN  
Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

Warszawa, 17.7.2023

### **Recenzja rozprawy doktorskiej Pani magister Kateryny Vygranenko**

Rozprawa doktorska Pani magister Kateryny Vygranenko, zatytułowana *Synteza i właściwości fotofizyczne nowych barwników merocyjaninowych* wykonana została w Instytucie Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk. Promotorem rozprawy był prof. dr hab. Daniel Gryko.

Tematyka rozprawy dotyczy ważnego i bardzo obecnie popularnego obszaru badań – otrzymywania chromoforów, których właściwości pozwoliłyby na ich użycie jako znaczników fluorescencyjnych. Mikroskopia fluorescencyjna to technika powszechnie obecnie stosowana, zwłaszcza w biologii i medycynie, a ogromne postępy w tej dziedzinie pozwalają obecnie na śledzenie nawet pojedynczych cząsteczek z rozdzielczością przestrzenną wielokrotnie przewyższającą tzw. limit dyfrakcyjny. Pomimo dostępności na rynku wielu rozmaitych fluoroforów ciągle trwają poszukiwania nowych substancji dostosowanych do pożądaných warunków pomiaru. Wśród wielu cech wymaganych od „idealnego” fluoroforu wymienić można absorpcję i emisję w odpowiednim obszarze spektralnym, duży współczynnik absorpcji i dużą wydajność kwantową fluorescencji, fotostabilność, biokompatybilność, nietoksyczność, czy wreszcie niskie koszty produkcji. Nic więc dziwnego, że badania w tej dziedzinie są bardzo intensywne, a poza tym muszą one spełniać wymóg interdyscyplinarności – połączenia syntezy chemicznej, spektroskopii i mikroskopii, czy też biologii molekularnej. Praca mgr Vygranenko dobrze wpisuje się w ten nurt. Doktorantka dokonała syntezy nowych fluoroforów opartych na strukturze rodolu –

znanej od końca XIX wieku cząsteczki będącej w pewnym sensie hybrydą rodaminy i fluoresceiny (stąd zresztą nazwa). Otrzymane związki scharakteryzowano następnie pod względem ich właściwości spektralnych i fotofizycznych, co pozwoliło na porównanie ze stosowanymi obecnie znacznikami fluorescencyjnymi.

Rozprawa przedstawiona została jako opatrzony wstępem zbiór czterech publikacji w bardzo dobrych międzynarodowych czasopismach. Jedna z nich to praca przeglądowa w *Chemical Society Reviews*, a trzy pozostałe to prace oryginalne, jedna w *Chemistry – A European Journal* oraz dwie w *Chemical Communications*. W tych dwóch ostatnich Pani Vygranenko jest pierwszym autorem.

Nieklasyczna forma rozprawy to zawsze spore wyzwanie dla recenzenta. Autorka dołączyła do rozprawy oświadczenia trzynastu współautorów, dotyczące ich wkładu w publikacje. Najważniejsza jest jednak deklaracja samej doktorantki, z której jasno wynika, że jej głównym zadaniem była synteza. Tym niemniej, autorka wspomina, że w przypadku dwóch prac (w *Chem. Comm.*) brała udział w pomiarach fotofizycznych i ich późniejszej analizie. To ważne z punktu widzenia recenzenta oświadczenie, ponieważ upoważnia mnie ono do sformułowania kilku komentarzy dotyczących fotofizyki otrzymanych układów, dziedziny, w której czuję się znacznie bardziej kompetentny niż w syntezie. Odnośnie tej ostatniej, już sam fakt opublikowania wyników w znakomitych czasopismach jest dużym sukcesem i dowodem jakości naukowej. Autorka opisała trzy nowe metodologie prowadzące do otrzymania pokaźnej serii nowych rodoli. Dużym atutem procedur syntetycznych jest ich prostota („I developed strikingly simple synthetic strategy to rhodols and ‘rhodols-type’ merocyanines...”), a więc, jak rozumiem, także niski koszt.

Mam pewne uwagi krytyczne odnośnie analizy parametrów fotofizycznych oraz możliwości praktycznych zastosowań nowych fluoroforów. Już na początku wprowadzenia do rozprawy Autorka wymienia, wśród pożądaných z punktu widzenia zastosowań cech

znaczników fluorescencyjnych („These features make them particularly attractive in fluorescence microscopy”) stosunkowo niewielkie przesunięcie Stokesa („relatively small Stokes shifts”). Jest raczej odwrotnie, pożądane jest możliwie duże przesunięcie, co pozwala na oddzielenie wzbudzenia od emisji. Autorka potwierdza to zresztą na następnej stronie wprowadzenia do rozprawy, pisząc „...need for more advanced dyes, which can fulfill principal requirements:....large Stokes shift”).

W pracy z *Chem. Comm.* z r. 2022 stwierdzono, że rodole **4-11** są niespodziewanie („surprisingly”) znacznie mniej fotostabilne w  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  niż w DMSO. Być może nie powinno być to niespodzianką, bo wiadomo z literatury, że naświetlanie chromoforów generujących tlen singletowy prowadzi w dichlorometanie do tworzenia HCl i szybkiego obniżenia pH, co skutkuje protonacją barwnika.

Zgadzam się w pełni z przekonaniem doktorantki, że jednym z najważniejszych, jeśli nie wręcz najważniejszym parametrem decydującym o możliwości praktycznego zastosowania fluoroforu jest jego fotostabilność. Jednak pewne zastrzeżenia budzą uwagi autorki dotyczące fotostabilności nowootrzymanyh barwników. Na stronie 36 czytamy: „Dyes **102a** and **103** display excellent photostability, comparable to that of Rhodamine 6G and Cresyl Violet”. Z kolei w ostatnim akapicie podsumowania rozprawy Autorka pisze: “Photostability of these rhodols and ‘rhodol-like’ merocyanines is not better compared to classical rhodols and other photostable dyes. They are not however markedly less stable either.”

Znacznie ważniejszy niż rozważanie, co uznajemy za doskonałą fotostabilność jest poprawny metodologicznie jej pomiar. Z własnego doświadczenia wiem, że wyznaczenie wydajności kwantowej fotodestrukcji (opisanej prostym wzorem, jako stosunek liczby rozłożonych cząsteczek do liczby zaabsorbowanych fotonów) jest zadaniem niezwykle trudnym. Zastosowana w obu publikacjach w *Chem. Comm.* metodologia nie wydaje mi się

poprawna, ponieważ prowadzi ona do porównania fotostabilności próbek, a nie wydajności kwantowych fotodegradacji różnych chromoforów. Znacznie lepsze metodologicznie podejście zaprezentowano w publikacji z *Chem. Eur. J.* choć też (co sugeruje rysunek S5) jest ono nie całkiem wolne od wad.

Fotostabilność, wyrażona ilościowo poprzez wartość wydajności kwantowej fotodegradacji, zależy może od bardzo wielu czynników: długości fali promieniowania wzbudzającego, rozkładu spektralnego promieniowania i jego mocy, rodzaju rozpuszczalnika, jego lepkości, temperatury, polarności, protyczności, stężenia domieszek (zwłaszcza tlenu). Niezwykle ważnymi parametrami fotofizycznymi są też wydajność tworzenia stanu trypletowego oraz wydajność generowania przez dany fluorofor tlenu singletowego. Dlatego też porównywanie fotostabilności dwóch różnych molekuł (a nawet tej samej, ale w różnych otoczeniach, albo też inaczej wzbudzonej) to zadanie niełatwe. Chętnie posłucham na obronie opinii doktorantki na temat możliwie najbardziej metodologicznie poprawnego protokołu porównania fotostabilności fluoroforów.

Na podobny komentarz zasługuje również stosowanie pojęcia „jasności” (ang. *brightness*), definiowanego jako iloczyn wydajności kwantowej emisji i współczynnika absorpcji. Doktorantka przywołuje to pojęcie kilkakrotnie, nie wspominając jednakże, jakiej długość fali dotyczy. Podejrzewam, że chodzi o maksimum absorpcji, ale w pewnych przypadkach (małe przesunięcie Stokesa) taka wartość jest niepraktyczna. Ponadto, powyższa definicja jasności jest nieprawidłowa w przypadku śledzenia emisji pojedynczych cząsteczek, kiedy decydującym parametrem staje się czas życia stanu trypletowego. Jestem ciekaw, co wiadomo na ten temat w przypadku rodoli, niekoniecznie tylko tych otrzymanych przez Autorkę. Być może ta wiedza pozwoliłaby odpowiedzieć na pytanie, którego zabrakło mi we wprowadzeniu do rozprawy: dlaczego, skoro rodole znane są od stu kilkudziesięciu lat, ich

popularność w stosunku do rodamin i fluoresceiny jest tak mała? Czy powodem są wyłącznie, wspomniane w pracy przeglądowej, trudności syntetyczne?

Z obowiązku recenzenta powinienem dokonać również oceny strony redakcyjnej rozprawy, to znaczy napisanemu po angielsku i liczącemu w sumie 52 strony wprowadzeniu. Jego forma jest poprawna, aczkolwiek zdarzają się usterki, głównie, acz nie tylko, interpunkcyjne. Moim zdaniem zaletą tekstu jest wyraźne zaangażowanie emocjonalne Autorki w opis wykonanej pracy. Znaczna przewaga dyskusji części syntetycznej nad fotofizyczną nie dziwi z uwagi na profil naukowy doktorantki.

Podsumowując: nie mam żadnych wątpliwości, że rozprawa doktorska Pani magister Kateryny Vygranenko spełnia ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Jestem również przekonany, że otrzymane przez nią nowe barwniki mogą stać się w przyszłości obiektami ciekawych badań spektroskopowych, a być może również zastosowane w praktyce. Stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Vygranenko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jacek Waluk

