



Politechnika Łódzka

Katedra Fizyki Molekularnej

Dr hab. inż. Gabriela Wiosna-Sałyga

Łódź, 04.05.2026

Katedra Fizyki Molekularnej

Politechnika Łódzka

ul. Żeromskiego 114

90-924 Łódź

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr **Karoliny Koprowskiej**

zatytułowanej:

Nowe metody znakowania związków o znaczeniu biologicznym znacznikami fluorescencyjnymi i metalokarbonyłowymi

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Bogny Rudolf, prof. UŁ i dr hab. Anny Wróny-Piotrowicz, prof. UŁ (opiekun pomocniczy)

Tematyka rozprawy doktorskiej wpisuje się w jeden z najbardziej dynamicznie rozwijających się obszarów współczesnej chemii – chemię bioortogonalną i biokoniugację, ściśle powiązane z rozwojem nowoczesnych metod bioobrazowania. Projektowanie selektywnych znaczników umożliwiających nieinwazyjne śledzenie procesów biologicznych na poziomie molekularnym ma kluczowe znaczenie dla rozwoju diagnostyki molekularnej, terapii celowanych oraz obrazowania komórkowego. Autorka podjęła ambitne i aktualne zagadnienie polegające na opracowaniu dwóch klas znaczników – fluorescencyjnych oraz metalokarbonylowych możliwych do detekcji za pomocą spektroskopii w podczerwieni, kontynuując i rozwijając kierunek badań od wielu lat realizowanych w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Łódzkiego. Zastosowanie pochodnych (di)bromomaleimidu do selektywnej modyfikacji reszt cysteinowych oraz rebridgingu mostków dwusiarczkowych, stanowi nowoczesne podejście o dużym potencjale aplikacyjnym, znajdujące zastosowanie we fluorescencyjnym znakowaniu białek, projektowaniu terapeutycznych koniugatów białkowych oraz w tworzeniu zaawansowanych narzędzi diagnostycznych. Tematykę rozprawy należy zatem uznać za oryginalną, aktualną i istotną z punktu widzenia współczesnych badań nad modyfikacją związków o znaczeniu biologicznym.



Katedra Fizyki Molekularnej

ul. Żeromskiego 114, 90-543 Łódź, budynek A34, IV piętro

tel.: 42 631 32 05

mail: w3k31@adm.p.lodz.pl

Adres do korespondencji:

ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź



Łódzkie
Partnerstwo
Akademickie



Praca doktorska ma układ klasyczny, podzielona została na cztery zasadnicze części: *Część literaturową*, *Część badawczą*, *Podsumowanie* i *Część eksperymentalną*. Praca liczy razem z bibliografią (159 odnośników) i szczegółowym opisem dorobku naukowego Doktorantki 191 stron.

Na wstępie Doktorantka wyjaśnia motywację podjęcia badań i jasno formułuje cel rozprawy, który obejmował:

- opracowanie nowych strategii znakowania biomolekuł z wykorzystaniem pochodnych maleimidu i ich analogów metalokarbonylowych,
- syntezę nowych znaczników fluorescencyjnych zdolnych do reakcji bioortogonalnych typu „click”, które w swej strukturze zawierają pierścień pirenu (fluorofor odpowiedzialny za właściwości fotofizyczne) połączony łącznikiem z układem cyklooktynowym
- syntezę pochodnych maleimidu zawierających pierścień pirenu, jako potencjalnych fluorescencyjnych znaczników biocząsteczek
- charakterystykę właściwości fizykochemicznych i fotofizycznych otrzymanych związków,
- próbę detekcji otrzymanych biokoniugatów przy pomocy nieinwazyjnych metod spektroskopowych: spektroskopii IR oraz spektroskopii emisyjnej.

Część literaturowa licząca 54 strony, została podzielona na trzy główne podrozdziały: *Wybrane metody znakowania biocząsteczek*, *Bioobrazowanie*, oraz *Wybrane znaczniki cząsteczek biologicznie aktywnych*.

W pierwszym podrozdziale części literaturowej Doktorantka omawia aktualny stan wiedzy dotyczący metod znakowania biocząsteczek, ze szczególnym uwzględnieniem biokoniugacji oraz reakcji bioortogonalnych, jako kluczowych narzędzi nowoczesnej chemii biomedycznej. Autorka prezentuje charakterystykę mechanizmów biokoniugacji, ze szczególnym naciskiem na modyfikacje ukierunkowane na reszty cysteiny. Wykazuje przy tym dobrą orientację w literaturze, przywołując klasyczne oraz najnowsze przykłady zastosowań metod typu stapling i rebridging, wraz z ich ograniczeniami i zaletami. Istotną część rozdziału stanowi omówienie chemii bioortogonalnej, w tym reakcji typu „click” z uwzględnieniem kryteriów bioortogonalności, kinetyki reakcji oraz przydatności do zastosowań *in vitro* i *in vivo*.

W kolejnym podrozdziale Autorka omawia bioobrazowanie jako jedną z kluczowych technik badania układów biologicznych, ukazując jej rolę w badaniach podstawowych i klinicznych, zwłaszcza w kontekście diagnostyki i monitorowania chorób nowotworowych, podkreślając przy tym znaczenie technik fluorescencyjnych.

Rozdział trzeci części literaturowej prezentuje wybrane klasy znaczników biologicznie aktywnych cząsteczek, istotnych dla realizowanych przez Autorkę badań, obejmujące pochodne maleimidu, kompleksy metaloorganiczne oraz pochodne pirenu. Omówiono ich reaktywność chemiczną, mechanizmy znakowania biomolekuł (szczególnie reszt cysteinowych) oraz potencjał aplikacyjny w biokoniugacji, terapii i bioobrazowaniu. Rozdział zamyka szczegółowy przegląd pochodnych pirenu jako fluoroforów, obejmujący ich właściwości fotofizyczne i szerokie zastosowanie w biodetekcji i obrazowaniu układów biologicznych.

Cała Część literaturowa jest dobrze ustrukturyzowana, bogato udokumentowana literaturowo i jasno prezentuje naukowy kontekst oraz motywację do dalszych badań własnych, stanowiąc solidną podstawę teoretyczną dla części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej.

Głównym elementem dysertacji są rozdziały dokumentujące przebieg i wyniki badań własnych, zawarte w *Części badawczej*, które pokazują logiczne następstwo kolejnych etapów prac i świadczą o dojrzałości naukowej Autorki. W pierwszym rozdziale Doktorantka opisuje badania, w których wykorzystwała pochodne bromo-, dibromomaleimidu oraz ich metalokarbonyłowe analogi w reakcjach substytucji atomu boru przez grupy tiolowe biologicznie aktywnych związków modelowych (**Cys**, **Gluc**). Uzyskała w ten sposób szereg nowych tiomaleimidów: **TM-Cys**, **DTM-Cys**, **DTM-Gluc**, **Fp-TM-Cys**, **Fp-DTM-Cys**, **Fp-DTM-Gluc**, oraz pochodną sukcyimidową **Fp-DTS-Cys** poprzez substytucję i addycję grupy tiolowej do wiązania podwójnego maleimidu. Wykazała, że obecność metalokarbonyłowych podstawników odpowiada za brak emisji badanych związków, ale poprzez traktowanie światłem widzialnym, można usunąć fragment metalokarbonyłowy i przeprowadzić je w emisyjne analogi. Dodatkowo fotodegradacji fragmentu metalokarbonyłowego towarzyszyć może uwalnianie CO, czego należy się spodziewać na podstawie wcześniejszych badań przeprowadzonych w Katedrze Chemii Organicznej UŁ. Stąd zsyntezowane związki **Fp-TM-Cys**, **Fp-DTM-Cys** i **Fp-DTM-Gluc** mogą być przykładem tzw. „photo-CORMs” czyli cząsteczek uwalniających tlenek węgla (CO) pod wpływem światła w sposób kontrolowany czasowo i przestrzennie.

W kolejnym etapie pracy Doktorantka zamieniła związki modelowe na białka: lizozym i insulinę bydlęcą, uzyskując przez wbudowanie fragmentu maleimidu bądź sukcyimidu w mostek dwusiarczkowy (rebridging), szereg biokoniugatów. Przeprowadziła podobne badania jak w przypadku wcześniej otrzymanych pochodnych, uzyskując te same obserwacje dotyczące wpływu fragmentu metalokarbonyłowego na

właściwości emisyjne biokoniugatów i jego wrażliwości na światło. Podobnie jak w przypadku wcześniej otrzymanych pochodnych (**DTM-Cys**, **DTM-Gluc**) otrzymane biokoniugaty zawierające fragment ditiomaleimidu (**DTM-Ins**, **DTM-Liz**) wykazywały właściwości fluorescencyjne. Natomiast, wbudowanie maleimidowej pochodnej metalokarbonylowej w mostek dwusiarczkowy biomolekuł otwiera drogę do detekcji biokoniugatów **Fp-TM-Ins**, **Fp-DTM-Ins** oraz **Fp-DTM-Liz** poprzez spektroskopię w podczerwieni, dzięki obecności liganów CO.

Następnie Autorka przeprowadziła badania aktywności biologicznej zsyntezowanych pochodnych (**DBM**, **Fp-DBM**, **Fp-BM**, **DTM-Cys**, **DTM-Gluc**, **Fp-DTM-Cys**, **Fp-DTM-Gluc**), z których wynika, że pochodne metalokarbonylowe, wykazują aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek raka piersi MDA-MB-231, podczas gdy ich analogi bez fragmentu metalokarbonylowego nie były toksyczne. Wpływ grupy **Fp** na stabilność i aktywność biologiczną ditiomaleimidów wydaje się ciekawy, ale jak zaznacza Autorka, mechanizm jej działania nie jest oczywisty i wymaga dalszych badań. Badania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej, sugerują, że związki zawierające fragment metalokarbonylowy łatwiej przedostają się do wnętrza komórki niż ich organiczne analogi. Pokazały też, że odłączenie części metalokarbonylowej nie musi być aktywowane światłem. Na szczególne podkreślenie zasługuje uzyskanie nowatorskich znaczników- łączących możliwość detekcji IR i fluorescencyjnej w jednym układzie chemicznym. Wagę tego osiągnięcia podkreśla fakt, że wyniki opublikowano w czasopiśmie naukowym **Dalton Transactions (2025)**.

W ramach pracy doktorskiej Pani mgr Koprowska syntezowała również nowe znaczniki fluorescencyjne oparte na układzie piren-linker-cyklooktyn (**Py-ester-BCN**, **Py-eter-BCN**, **Py-N-BCN**). Przeprowadziła ich skrupulatną analizę fotofizyczną w roztworze i ciele stałym, z której między innymi wynika, że łącznik pomiędzy pirenem, a cyklooktynem ma ogromny wpływ na właściwości fluorescencyjne badanych związków, co jest cenną informacją w projektowaniu tego typu znaczników. Zsyntezowane związki poddała badaniom biologicznym, które ujawniły, że wszystkie pochodne nie wykazują cytotoksyczności wobec komórek nowotworu piersi (MDA-MB-231) jak i komórek prawidłowych BJ, co jest obiecujące w świetle potencjalnych zastosowań farmakologicznych. Badania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej pokazały, że znaczniki zabarwiają błony komórkowe w cytoplazmie, szczególnie w okolicy jądra komórkowego, czyli w obszarze bogatym w retikulum endoplazmatyczne. Ze względu na najciekawsze właściwości luminescencyjne, autorka wybrała **Py-ester-BCN**, jako związek modelowy do znakowania poprzez reakcje bioortogonalne prostych



związków biologicznie aktywnych zawierających grupy SH, leku jak i skomplikowanego układu jakim jest białko **HSA** (albumina surowicy ludzkiej). Wszystkie otrzymane biokoniugaty wykazywały silne właściwości fluorescencyjne, potwierdzone pomiarami fotofizycznymi, co sugeruje, że opracowane znaczniki mogą znaleźć zastosowanie praktyczne. Eksperyment wykonany dla białka **HSA** pokazał, że postęp reakcji znakowania można śledzić poprzez zmianę emisji znacznika: z zielonej pochodzącej od ekscymerów pirenu do niebieskiej typowej dla monomerów pirenu. To wskazuje, że tego typu znacznik można wykorzystać do nieinwazyjnego monitorowania procesów zachodzących w białkach, które da się skorelować z tworzeniem ekscymerów pirenu.

W ostatnim etapie pracy Doktorantka otrzymała pochodne maleimidu zawierające układ pirenowy, jednak ze względu na brak emisji nie poddała ich badaniom biologicznym.

Zaprezentowane w *Części badawczej* wyniki zostały uzyskane we współpracy z kilkoma ośrodkami naukowymi, co świadczy o umiejętności Doktorantki efektywnej pracy w zespołach interdyscyplinarnych oraz nawiązywania wartościowych kontaktów naukowych. Współpraca ta umożliwiła zastosowanie uzupełniających się metod badawczych i dostęp do specjalistycznej aparatury, istotnie podnosząc poziom merytoryczny uzyskanych rezultatów.

Najważniejsze osiągnięcia i najistotniejsze uzyskane wyniki Doktorantka wymienia w zwięzłym *Podsumowaniu*. Na końcu rozprawy znajduje się *Część eksperymentalna*, w której opisane zostały stosowane metody analityczne oraz zebrane opisy wszystkich przeprowadzonych syntez (łącznie 27).

Rozprawa jest napisana jasnym, precyzyjnym i na ogół poprawnym językiem naukowym. Struktura pracy jest logiczna, a ilustracje i wykresy wspierają tok narracji. Wyniki są spójne, poprawnie zinterpretowane, jednak moim zdaniem nie zawsze wystarczająco udokumentowane. Uwaga ta dotyczy głównie widm w podczerwieni, które w wielu miejscach nie zostały pokazane, a czytający musi uwierzyć, że dane pasma w nich występowały bądź nie. Dla przykładu, na stronie 91 czytamy: „Początkowo dla biokoniugatu w widmie IR obecne były pasma drgań walencyjnych karbonylków połączonych z metalem (Rysunek 60). Po zakończeniu eksperymentu i powtórnym zarejestrowaniu widma IR produktu naświetlania pasma drgań walencyjnych karbonylków nie były obecne w widmie co świadczy o degradacji fragmentu **Fp**.” Niestety na rysunku 60 jest pokazane tylko widmo przed naświetlaniem. Mam wrażenie, że w niektórych miejscach brakuje informacji, w jakiej postaci była próbka, którą poddawano badaniu i dla której prezentowane są uzyskane widma.

Podczas lektury pracy nasuwają się pewne pytania, które sformułuję poniżej. Nie mają one charakteru zarzutów, wynikają z zainteresowania poruszaną tematyką i stanowią zaproszenie do dalszej dyskusji naukowej podczas obrony.

- 1) Doktorantka pisze, że w zależności od czasu prowadzenia reakcji **Fp-BM** z **Cys** oraz od użytej ilości równoważników **Cys** otrzymuje produkt monopodstawienia lub produkt podstawienia i addycji do wiązania podwójnego będący mieszaniną diastereoizomerów. Ze schematu 26 wynika, że oprócz czasu i ilości **Cys** obie reakcje różni też użyty rozpuszczalnik, czy to też może mieć wpływ na produkt końcowy tej reakcji?
- 2) Dlaczego w opisie widma IR **TM-Cys** wymienione jest jedno pasmo drgania NH (3312cm^{-1}) a w **DTM-Cys** są dwa pasma przypisane do NH przy 3382 i 3344cm^{-1} ? Czy w obydwu przypadkach nie należałoby oczekiwać dwóch pasm? (strony 68-70)
- 3) Jak należy interpretować widmo emisji **DTM-Cys** w acetonitrylu (rysunek 39), czy związek wykazuje podwójną emisję? Jak to widmo ma się do emisji obserwowanych w innych pochodnych ditiomaleimidowych? Przy jakiej długości fali wzbudzenia było rejestrowane?
- 4) W tekście wskazano, że biokoniugaty **DTM-Ins** oraz **DTM-Liz** wykazują żółtą fluorescencję. Czy określenie to odnosi się do emisji obserwowanej w ciele stałym? W roztworach buforowych związki te wykazywały bowiem odpowiednio emisję zieloną lub niebieską, co zostało zilustrowane na zaprezentowanych widmach fluorescencyjnych.
- 5) Dlaczego po naświetlaniu **Fp-DTM-Liz** i usunięciu fragmentu metalokarbonylowego obserwowana emisja nie jest identyczna jak ta dla **DTM-Liz**?

Pomimo, że praca napisana jest starannie, Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów edytorskich, których wybrane przykłady z obowiązku recenzenta przytaczam poniżej:

- Str. 53: Rysunek 25 - Warto rozważyć niewielkie doprecyzowanie przedstawionego diagramu Jabłońskiego, aby uniknąć potencjalnych niejednoznaczności interpretacyjnych.
- Str. 67, 83: grupa karbonylowa z potrójnym wiązaniem między atomami C i O
- Str.71: „Analiza upakowania cząsteczki w komórce elementarnej (Rysunek 37)” – powinno być Analiza upakowania cząsteczek
- Str. 72: Rysunek 39- w tekście informacja, że jest to widmo **DTM-Cys** a w podpisie **DBM-Cys**. Sformułowanie „..w roztworze acetonitrylu” nie jest poprawne
- Str. 86: Rysunek 53- jest DCM zamiast DBM

- Str. 75: Dla stereoizomerów **Fp-DTS-Cys**- jest informacja o widmie IR tylko dla formy *trans*. Nie ma też wzmianki o charakterystycznych drganiach NH- dlaczego?
- Str. 85: Niepoprawnie zacytowana praca, brak stron (Organometallics, 2021, 40)
- Str. 87: Tabela 3. Wartości λ_{max} oraz molowego współczynnika ekstynkcji ϵ dla zsyntezowanych pochodnych- nie ma informacji w jakim rozpuszczalniku.
- W tabelach 5, 6,7 brak jednostki współczynnika ekstynkcji.
- Str. 96: Rysunek 66 -niepoprawna skala na osi Y.

Powyższe uwagi i pytania mają charakter dyskusyjny i nie wpływają na wysoką ocenę pracy. Przedstawione w rozprawie wyniki badań jak również dorobek naukowy Doktorantki obejmujący samodzielne kierowanie projektem badawczym, liczne staże zagraniczne w renomowanych ośrodkach naukowych, aktywny udział w konferencjach krajowych i międzynarodowych, oraz współautorstwo w dwóch publikacjach w uznanych czasopismach międzynarodowych, jednoznacznie potwierdzają jej dojrzałość naukową oraz wysoki potencjał dalszego rozwoju badawczego.

Oryginalność zaproponowanych rozwiązań, w szczególności integracja detekcji IR i fluorescencyjnej oraz potwierdzony potencjał aplikacyjny otrzymanych związków w bioobrazowaniu, pozwalają uznać rozprawę za wartościowy i istotny wkład do rozwoju nowoczesnych metod bioznakowania. Dlatego, stwierdzam, że rozprawa Pani mgr Karoliny Koprowskiej spełnia wymagania formalne stawiane pracom doktorskim określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. i wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Koprowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gabriela Wiosna-Satyga

Dr dab. inż. Gabriela Wiosna-Satyga