



Warszawa, 18 listopada 2025

Recenzja pracy doktorskiej mgr. inż. Piotra Tobiasza
*Otrzymywanie, badania spektroskopowe i biologiczne azo-związków, potencjalnych
przełączników molekularnych do zastosowania w fotofarmakologii*

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr. inż. Piotra Tobiasza została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Promotorem rozprawy jest dr hab. inż. Hanna Krawczyk, prof. PW. Jej celem była synteza oraz badania spektroskopowe i biologiczne układów zawierających ugrupowanie azowe ($R-N=N-R'$) zdolne do zmiany konfiguracji na wiązaniu podwójnym pod wpływem światła. Umożliwia to selektywne generowanie aktywnej formy leku w wybranych tkankach przez ich naświetlenie światłem o odpowiedniej długości fali i pozwala na uniknięcie ogólnoustrojowego działania toksycznego leku, koncentrując jego aktywność tylko w miejscach zmienionych chorobowo. Ze względu na własności fotochemiczne związków azowych, poszukiwanie aktywnych biologicznie analogów i próby ich zastosowania w terapii zasługują na uwagę. Autor skupił się w swojej pracy na pochodnych oddziałujących z domeną kolchicynową w tubulinie. Praca została przygotowana w formie tradycyjnej rozprawy. Liczy 289 stron i składa się z trzech głównych części – przeglądu literaturowego, omówienia wyników badań własnych i części eksperymentalnej. Praca zawiera również krótkie streszczenie rozprawy po polsku i angielsku. Rozprawę kończy spis literatury (214 pozycji).

Część literaturową Autor poświęcił omówieniu koncepcji fotofarmakologii (podstawy, projektowanie przełączników molekularnych, najważniejsze pochodne oddziałujące z domeną kolchicynową w tubulinie). Wprowadzenie napisane jest jasnym i klarownym językiem. Omawiane problemy są dobrze zilustrowane rysunkami i schematami. Zaprezentowany przez Doktoranta materiał można uznać za w pełni wystarczający do zrozumienia stojących przed Doktorantem wyzwań badawczych i dobrze uzasadniający podjętą tematykę.

Kolejny rozdział – *Badania własne* – podzielony jest na trzy części poświęcone syntezie i badaniu właściwości pochodnych azowych dibenzo[*b,f*]oksepiny, chalkonu i kolchicyny. Doktorant rozpoczął badania od syntezy pochodnych dibenzooksepiny. Obliczenie współczynników SCS dla szeregu pochodnych pozwoliło na określenie względnej reaktywności atomów węgla w układzie aromatycznym i przewidywanie preferowanej regioselektywności reakcji. Co prawda podawanie wartości przesunięć chemicznych w widmach ^{13}C NMR z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku formalnie nie jest błędem, ale moim zdaniem nie ma wartości analitycznej. Na stronie 92 Autor zapowiada dalszą funkcjonalizację związku **1a** przez wprowadzenie dodatkowych grup nitrowych, ale



brakuje opisu takich syntez. Po zbadaniu reakcji z formaldehydem, Doktorant zbadał reakcje dibenzooksepy z pochodną bifenylu w obecności aldehydów aromatycznych otrzymując szereg interesujących pochodnych. Następnie, Autor otrzymał serię dimerów **9a-h** zawierających grupę azową. Związek **9a** reagował z aldehydami tworząc oligomery. Recenzent podejrzewa, że ich rozpuszczalność była jednak zbyt mała, aby przeprowadzić badania biologiczne. Interesujące wyniki mogła przynieść reakcja sprzęgania związku **9a** z pochodną bifenylu, jednak spodziewanego produktu **13** nie udało się oczyścić. Czy podejmowano próbę forsowania reakcji w celu otrzymania związku dwupodstawionego? Taka symetryczna pochodna mogłaby mieć interesujące właściwości. Na zakończenie części syntetycznej tego podrozdziału mgr Tobiasz przeprowadził syntezę pochodnych zawierających podstawnik fluorowy.

Muszę zaznaczyć, że Autor konsekwentnie unika podawania w tekście odsyłaczy literaturowych do syntezy substratów (m.in. brak informacji o syntezie związków **6** – w części eksperymentalnej opisano tylko pochodne **6a,b,d**). Brakuje również numeracji niektórych substratów, a opisy podstawników na schematach ograniczają się do podania liter alfabetu, bez numeru związku, co w niektórych przypadkach prowadzi do nieporozumień i utrudnia odnalezienie właściwej pochodnej (np. na Schemacie 20 podane są podstawniki dla pochodnej oznaczonej jako **f**, tymczasem związek **3f** nie zawiera podstawników oznaczonych jako **R**; na Schemacie 28 oznaczenia **16a,b** nie są zgodne z opisem w części eksperymentalnej, itp.). Czytelnik ma prawo uznać, że numeracja atomów w cząsteczce dibenzooksepy przedstawiona w Tabeli 2 obowiązuje dla całego tekstu. Tymczasem Autor dość swobodnie ją zmienia – np. związek **1a** jest 6-metoksy-3-nitro-, a związek **1d** 1-metoksy-7-nitrodibenzooksepiną (str. 94).

Wybrane pochodne zostały poddane dokładnej analizie właściwości fotochemicznych. Zbadano ich izomeryzację $E \rightarrow Z$ z wykorzystaniem światła o różnej długości fali, skład w stanie równowagi oraz trwałość izomeru **Z**. Niestety, nie obserwowano rozdzielania pasm przejść elektronowych $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$ w widmach UV-VIS dla izomerów **E** i **Z**. Przeprowadzono również obliczenia dla dokowania molekularnego z tubuliną. Moje wątpliwości budzi określenie składu procentowego mieszaniny w stanie fotostacjonarnym (Tabela 6) z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku. Jest to dość absurdalne, szczególnie dla niskich zawartości izomerów, dla których sygnał w widmie ^{19}F NMR musi być bliski poziomowi szumów.

W następnym podrozdziale, Autor zajął się syntezą pochodnych chalkonu zawierających grupę azową. Można je otrzymać w prostej, kilkietapowej syntezie z akceptowalnymi wydajnościami. Na Schemacie 30, reakcja kondensacji pochodnych **19** z aldehydami **20** prowadzona jest w etanolu wobec KOH. Według opisu w części eksperymentalnej Autor używał metanolu i NaOH. Proszę o wyjaśnienie, która wersja jest poprawna. W Tabeli 9 trochę brakuje mi porównania zdolności izomeryzacji związku niepodstawionego (nie był badany w pracy) z analogami funkcjonalizowanymi. Byłbym również ostrożny z formułowaniem wniosku, że *podstawniki bromowe nie wywoływały istotnych zmian w składzie ... w stanie fotostacjonarnym* (str. 122) – Autor zbadał tylko jedną taką pochodną. Wydaje mi się również, że badanie stabilności fotochemicznej wyłącznie z wykorzystaniem pomiaru absorbancji (Rysunek 36) to trochę za mało, jeśli myślimy o potencjalnym wykorzystaniu takich pochodnych w terapii. Chętnie widziałbym tu pomiar HPLC, który bez wątpliwości pokazałby ewentualne produkty degradacji związków azowych po kilku procesach przełączania. W przypadku pochodnych chalkonu następuje wyraźne



rozdzielenie pasm przejść elektronowych $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$ w widmach UV-VIS dla izomerów *E* i *Z*. Związki te można aktywować bezpiecznym światłem zielonym, a aktywne izomery *Z* wykazują dużą trwałość. Autor przeprowadził również szerokie badania teoretyczne (dokowanie molekularne) i rozszerzone badania biologiczne azowych pochodnych chalkonu, wykazując ich wyraźny wpływ na hamowanie podziału komórek.

Ostatni podrozdział poświęcony jest syntezie i badaniu pochodnych azowych kolchicyny, związku znanego ze zdolności do blokowania tubuliny. Rozpoczyna się od opisu *N*-deacetylowania kolchicyny, procesu znanego z literatury, niestety, nie znalazłem stosownego odsyłacza literaturowego. Jeśli prezentowana metodologia różni się od literaturowej, powinno to być wyraźnie zaznaczone. Otrzymany związek został poddany reakcji z szeregiem azobenzenów, dając pożądane pochodne azowe. Ulegały one izomeryzacji *E*→*Z* pod wpływem naświetlania światłem o długości fali *ca.* 505-535 nm. Podobnie jak pochodne chalkonu, wykazują wyraźne rozdzielenie pasm przejść elektronowych $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$ w widmach UV-VIS, wysoką fotostabilność i trwałość izomeru *Z*. Co istotne, badania biologiczne wykazały, że izomery *Z*, powstające po naświetleniu próbki światłem zielonym, wykazują niską toksyczność wobec komórek zdrowych, przy wyraźnie rosnącej cytotoksyczności.

Do ostatniego rozdziału – *Części eksperymentalnej* – mam najwięcej zastrzeżeń. Błądzenie jest rzeczą ludzką – nie ma tekstu bez błędów – i na ogół w recenzjach nie wspominam o drobnych pomyłkach. W tym przypadku jednak, niektóre – powtarzające się błędy – wpływają negatywnie na odbiór pracy przez czytelnika. Autor stosuje dość dziwny system opisu widm HRMS nie podając typu jonu, dla którego zmierzono wartość HR ($[M]^+$, $[M+H]^+$, itp.), tylko sam wzór sumaryczny, albo z już dodanym atomem wodoru, albo pisząc dodatkowo +H. Rodzi to wiele błędów. Np. wzór sumaryczny dla związku **5b** podano z już dodanym atomem wodoru, a dla związku **6a** błędnie i z dodanym atomem wodoru, i dodatkowo z +H. Takich pomyłek jest dużo. W wielu przypadkach wartości HRMS podane są z dokładnością do pięciu miejsc po przecinku – to kolejny przykład przesady w dokładności. Temperaturę topnienia mierzy się dla związków po krystalizacji i podaje zakres temperatur, a nie jedną wartość. Co ciekawe, Autor podaje temperatury topnienia dla osadów otrzymanych po odparowaniu frakcji z kolumny chromatograficznej (formalnie nie są krystalizowane), a zupełnie pomija jej zmierzenie dla związków **21a-l**, które zostały przekrystalizowane.

Kilka drobnych uwag porządkowych i komentarzy:

- w wielu przypadkach wydajności reakcji były niskie. Czy wynika to z niskiej konwersji, rozkładu substratów / produktów, czy może problemów z oczyszczaniem?
- brak opisu związku **2e**;
- synteza 5.5.4 (str. 192) – w opisie brakuje pochodnej bifenyli. Syntezy analogicznych pochodnych **3** wymagały prowadzenia reakcji nawet przez trzy tygodnie. Czy w tym przypadku (dla związków **4**), wydłużenie czasu reakcji nie spowodowałoby podwyższenia wydajności?
- synteza 5.5.6 (str. 207) – produkty wydzielano przez wytrącanie z ekstraktu. Jak określano ich czystość?
- synteza 5.6 (str. 240) – nie podano ilości użytego aldehydu **20a-d**.



Podsumowując całość pracy stwierdzam, że pod względem merytorycznym nie mam do przedstawionej pracy zastrzeżeń. Uważam, że założone cele zostały osiągnięte. Doktorant opracował syntezę nieznanych wcześniej pochodnych azowych zawierających reszty dibenzo[*b,f*]oksepiny, chalkonu i kolchicyny. Przeprowadził niezbędne badania fotochemiczne, obliczenia dokowania molekularnego i badania biologiczne wybranych pochodnych. Wykazał, że izomeryzacja *E*→*Z* układu azowego może być skuteczną metodą fotoaktywacji substancji aktywnych, z użyciem bezpiecznego światła zielonego. Otrzymane pochodne mają bardzo obiecującą aktywność cytotoksyczną i są bez wątpienia świetną platformą do syntezy potencjalnie użytecznych leków. Znaczna część, jeśli nie wszystkie, uzyskanych wyników zostały już opublikowane, co jest wynikiem godnym podkreślenia. Muszę też podkreślić, że pewne błędy, które udało mi się dostrzec, mają charakter głównie edytorski i nie wpływają na ocenę wartości naukowej pracy. Od strony redakcyjnej błędem jest użycie formy bezosobowej, co w pracy doktorskiej może rozmywać indywidualny wkład Doktoranta w opisywane badania.

W mojej opinii przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Piotra Tobiasza spełnia wymagania zwyczajowe i wymogi obowiązującej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. Dlatego też wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej wniosek o dopuszczenie mgr. inż. Piotra Tobiasza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zbigniew Pakulski