



UNIwersYTET  
IM. ADAMA MICKIEWICZA  
W POZNANIU

Prof. dr hab. Adam Huczynski  
Zakład Chemii Medycznej, Wydział Chemii  
Uniwersytet Im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań  
e-mail: [adam.huczynski@amu.edu.pl](mailto:adam.huczynski@amu.edu.pl)  
<https://adhucz.home.amu.edu.pl/>

Poznań, 6 czerwca 2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Bartłomieja Bazana  
"Poszukiwanie bioortogonalnych reakcji hetero-Dielsa-Aldera 1-oksa-1,3-butadienów i alkenów  
jako nowych narzędzi w tworzeniu bioortogonalnej ligacji pomiędzy badanym obiektem i  
znacznikiem"  
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Pałasz  
w Zespole Stereokontrolowanej Syntezy Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu  
Jagiellońskiego.**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska ma klasyczną formę i nie jest tzw. zszywką publikacji. Ta druga forma prezentacji wyników badań własnych prowadzonych przez Doktoranta nie byłaby jednak możliwa, gdyż do chwili obecnej Autor rozprawy mgr Bartłomiej Bazan jest autorem tylko jednej publikacji związanej tematycznie z przedstawianą rozprawą (Bartłomiej Bazan, Aleksandra Pałasz, Łukasz Skalniak, Dariusz Cież, Szymon Buda, Katarzyna Jędrzejowska, Sonia Głomb, Daniel Kamzol, Kinga Czarnota, Krystian Latos, Krzysztof Koziół, Bogdan Musielak, *Application of bioorthogonal hetero-Diels–Alder cycloaddition of 5-arylidene derivatives of 1,3-dimethylbarbituric acid and vinyl thioether for imaging inside living cells*, *Organic & Biomolecular Chemistry*, Vol. 19(27) 2021, 6045-6058). Publikacja ta jest wieloautorska (12 autorów), a Doktorant pełnił w niej rolę pierwszego autora. Pozwoliłem sobie już na wstępie recenzji zacytować tę publikację, gdyż podczas mojej recenzji musiałem skonfrontować z sobą treści zawarte w doktoracie i w tej publikacji.

Zatytułowanie rozprawy doktorskiej „Poszukiwanie bioortogonalnych reakcji hetero-Dielsa-Aldera 1-oksa-1,3-butadienów i alkenów.....” jest moim zdaniem doskonałą ilustracją tematyki realizowanej przez doktoranta, a zarazem ilustracją zakresu tejże rozprawy. Trudno bowiem byłoby w tytule napisać synteza czy badania spektroskopowe, gdyż synteza organiczna ewidentnie autorowi nie szła, choć finalnie (a to najważniejsze) otrzymał On prawdopodobnie oczekiwany produkt, jednak nie wszystkie produkty reakcji zaprezentowanych w rozprawie scharakteryzowano, a badania spektroskopowe potraktowano niezwykle zdawkowo.

Już w tym momencie recenzji pozwolę sobie na konkluzję o tym, iż moim zdaniem doktorat spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim, gdyż prezentuje on ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta oraz ukazuje jego umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Niemniej w

mojej ocenie nie jest to doktorat na wysokim poziomie i mam wrażenie, że mógłby być o wiele lepszy, bo widzę taki potencjał. Jak te dwie z pozoru sprzeczne konkluzje da się pogodzić w jednej pracy? O tym postaram się napisać poniżej.

Na wysokim poziomie merytorycznym jest niewątpliwie wstęp teoretyczny doktoratu - część literaturowa (39 stron), omawiająca precyzyjnie i przystępnie idę chemii bioortogonalnej, bardzo istotnej dziedziny współczesnej chemii, nagrodzonej nagrodą Nobla w 2022 roku.

Zadaniem stawianym obecnie chemii bioortogonalnej jest skuteczne prowadzenie reakcji chemicznych w układach komórkowych. Synteza bioortogonalna musi zatem mieć odpowiednią szybkość w żywych komórkach, tkankach czy narządach, być zarazem wydajna i selektywna, a nowopowstałe wiązania kowalencyjne powinny być stabilne w warunkach fizjologicznych.

Opis współczesnej i specjalistycznej wiedzy na temat bioortogonalnych reakcji chemicznych, sond fluorescencyjnych oraz opis przedmiotu swoich dalszych badań tj. reakcji hetero-Dielsa-Aldera (HDA) z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym 1-oks-1,3-butadienów i alkenów, prowadzonych wcześniej m.in. przez promotorkę doktoratu Panią dr hab. Aleksandrę Pałasz, którego dokonał Doktorant w części literaturowej, dowodzi dużej wiedzy w tym temacie. Ten fragment rozprawy czytało mi się bardzo dobrze, nie tylko z powodu klarowności opisu współczesnej wiedzy, ale również dzięki niewątpliwie dobrej narracji. W części tej nie znalazłem większych błędów, choć z obowiązku recenzenta pragnę zauważyć błędną nazwę związku nr 43 (str. 26), a zwłaszcza błędny opis brzmiący: *"... imid kwasu bursztynowego 43, który z łatwością reaguje z różnymi dienami"* oraz *"imid kwasu bursztynowego może ulegać niepożądanym reakcjom addycji Michaela takich nukleofilii, jak np. cysteina czy lizyna. Ograniczenie to dotyczy także wszystkich innych dienofili, które posiadają układ  $\alpha,\beta$ -nienasyconego związku karbonylowego a są stosowane w reakcjach Dielsa-Aldera z normalnym zapotrzebowaniem elektronowym"*. Otóż kwas bursztynowy, to nasycony kwas dikarboksylowy (kwas butanodiowy), a związek przedstawiony na Rys. 19 i we wspomnianych opisach to imid kwasu maleinowego (imid kwasu kwas *cis*-butenodiowego, maleimid).

Tak dobrego zdania nie mam niestety na temat badań własnych i ich opisu zawartego w ocenianej rozprawie. Aby jednak przejść do opisu tej części doktoratu należy wspomnieć o celach, które przyświecały Doktorantowi podczas prowadzeniu badań. Głównymi celami według Autora było zastosowanie 5-arylidenopochodnych kwasu 1,3-dimetylobarbiturowego (jako układów 1-oks-1,3-butadienowych) i odpowiednich winylo-tioeterów (alkenów) do wytworzenia bioortogonalnej ligacji przy wykorzystaniu reakcji HDA. W tym celu Doktorant zamierzał przeprowadzić syntezę substratów do reakcji cykloaddycji, tj. dienu z przyłączonym znacznikiem fluorescencyjnym oraz dienofila z przyłączonym obiektem badanym, przetestować reakcję HDA w próbówce i w układach *in vitro*, oraz wyznaczyć stałą szybkości drugiego rzędu  $k_2$  tej reakcji, głównie dzięki metodzie pośredniej i

bezpośredniej opartej na badaniach  $^1\text{H}$  NMR. To dobrze określony cel badawczy, możliwy do rozliczenia i zrealizowania podczas kilku lat badań. Cel ten nie był jednak osiągnięty wprost, od razu i bez przeszkód. Wynikało to z kapryśności chemii organicznej, ale niesyły również z błędnego podejścia do niektórych syntez i niewłaściwej metodologii badań.

Mgr Bartłomiej Bazan z wielką pieczołowitością opisał w części dotyczącej badań własnych wiele udanych i jeszcze więcej nieudanych syntez. To swoista spowiedź chemika organika, z sukcesów i porażek. Pytanie, które musi sobie zadać recenzent brzmi, czy wszystkie porażki były przypadkowe, czy wyniknęły one jednak z braku odpowiedniej wiedzy i warsztatu? Tu odpowiedź nie jest jednoznaczna, ale jako chemik syntetyk nad pewnymi aspektami nie mogę przejść bez odpowiedniego komentarza. Pozwoliłem sobie wypisać z doktoratu tylko wybrane fragmenty, w których Doktorant uczciwie opisuje swoje nieudane próby syntetyczne i skomentować je lub prosić o wyjaśnienie Autora dysertacji. W mojej ocenie opisu porażek jest więcej niż opisu sukcesów, a to dziwna forma doktoratu, gdyż doktoraty raczej opisują sukcesy, a nie przedstawiają porażki aplikujących o stopień naukowy.

Str. 55: „*Pierwszy etap polegał na reakcji substytucji pomiędzy 2-merkaptetanołem 125 i bromkiem winylu, w wyniku której otrzymano tioeter winylowy 81. Przeprowadzając tę reakcję po raz pierwszy zgodnie ze wspomnianą metodologią, tzn. przez 4 godziny w 105 °C oraz stosując odczynniki w odpowiednich proporcjach, uzyskano wydajność zaledwie 12%.*” – Moje pytania do tego fragmentu: **Co stanowiło pozostałość po reakcji, czy powstawały produkty uboczne? Dlaczego optymalizowano reakcję bez ustalenia czy powstawały produkty uboczne i jakie? Jaka była wydajność destylacji? W części eksperymentalnej (str. 103) Doktorant napisał, że do wytworzenia etanolanu sodu używał etanolu (powinien być to etanol bezwodny), proszę o komentarz.**

Str. 59. „*Następny etap obejmował przekształcenie pochodnej 130 w chlorek kwasowy 131 (Rys. 52.). Zastosowano tu metodologię opisaną w patencie.<sup>57</sup> Przeprowadzono reakcję z udziałem chlorku tionylu w temperaturze pokojowej. Niestety w pierwszej próbie nie udało się uzyskać pożądanego produktu 131, co stwierdzono na podstawie wykonanego widma IR. Reakcję więc powtórzono, wydłużając jej czas z 8 godzin na 24 godziny. Zmiana ta jednak nie doprowadziła do otrzymania związku 131.*” - Moje pytania do tego fragmentu: **Dlaczego nie podgrzano reakcji? Wystarczyło zajrzeć do preparatyki Vogel'a i tam reakcje kwasów karboksylowych z  $\text{SOCl}_2$  są zawsze podgrzewane, aby zaszyły. Wystarczyło również użyć kilku kropel DMF lub przeprowadzić reakcję z dichlorem oksalilu w obecności DMF. Jak reakcja chemiczna nie zachodzi, to poza zwiększeniem czasu reakcji, należy ją zwyczajnie ogrzać. Synteza chlorku acylowego z kwasu karboksylowego to chemiczne abecadło i z wielkim zdziwieniem przyjąłem porażkę Doktoranta w tak elementarnej reakcji.**

Na stronach 60-63 Doktorant opisał szereg nieudanych prób syntezy aktywnego linkera przyłączonego do układu 5-arylidenopochodnej kwasu 1,3-dimetylobarbiturowego. Reaktywnymi grupami miał być grupa karboksylowa (rys. 53), grupa fenolowa OH (rys. 54), OH w alkoholu benzylovym (rys. 56-59). Z uporem wartym lepszej sprawy do aktywacji wymienionych grup Doktorant używał wciąż węglanu *N,N'*-disukcynoimidylu, a przecież karbaminiany można otrzymać prościej przez odpowiednie chloromrówczany, czy z użyciem trifosgeny. **Dlaczego proste i sprawdzone reakcje Doktorant pominął nie mam pojęcia?**

Nie mogę również bez komentarza pozostawić kolejnej porażki **opisanej i to błędnie na Rys. 60** ( str. 63). Rzeczywisty produkt **147** nie ma wiązania podwójnego, zatem albo strzałka prowadząca do niego powinna być przekreślona, albo podpis pod rysunkiem powinien brzmieć: planowana ścieżka syntezy. Wspominanego końcowego produktu **147** nie uzyskano, gdyż w końcowym etapie Doktorant postanowił odbezpieczyć grupę aminową w atmosferze wodoru i przy obecności katalizatora palladowego, zatem zamiast (lub obok) właściwej reakcji dokonał on przewidywalnej reakcji uwodornienia wiązania podwójnego. Odkrył zatem znaną reakcję niestety na ostatnim etapie zaplanowanej ścieżki syntezy.

Nie oznacza to oczywiście, że syntezy zaplanowane przez Doktoranta kończyły się tylko porażkami, jednak alternatywne syntezy, które musiał On wykonywać, wynikały niejednokrotnie z braku wiedzy lub dobrego planowania syntezy. Musiał więc mgr Bartłomiej Bazan uczyć się w najgorszy sposób, bo na własnych błędach. Być może seminaria Zakładowe albo częstsza dyskusja z promotorem czy bardziej doświadczonymi syntetykami oszczędziłyby mu zbędnej pracy i przyspieszyły pracę.

Nim przejdę do pochwał i przedstawienia zalet części badawczej doktoratu mam jeszcze dwie uwagi. Pierwsza z nich ma charakter fundamentalny i **jest ona moim sprzeciwem wobec takiego zapisu struktury kluczowego produktu reakcji (produkt 155, str. 67 i późniejsze).**

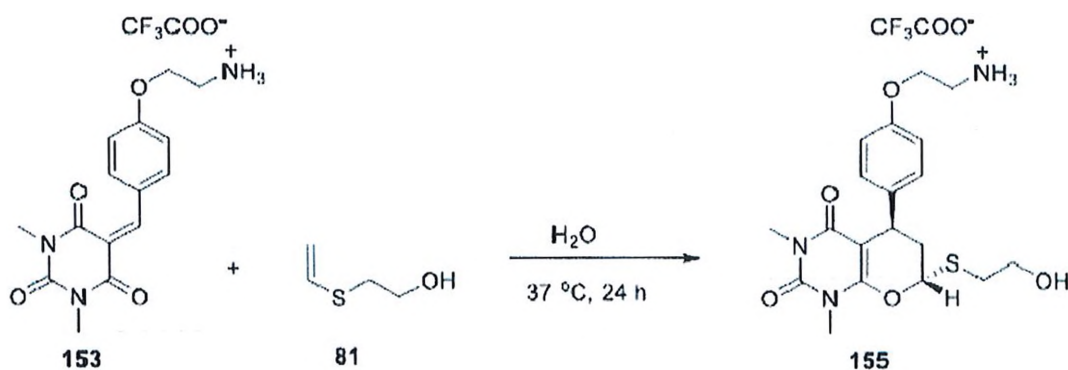
Otrzymane przez Doktoranta, w żmudnych i często modyfikowanych ścieżkach syntezy, dwa najważniejsze substraty heterodien **153** oraz tioeter winylowy **81** poddał On **kluczowej z punktu widzenia celów doktoratu reakcji** cykloaddycji HDA, która została przeprowadzona w wodzie w temp. 37 °C. Reakcja zaszła, z dobrą wydajnością i jest to sukces (nieoczywisty i stanowiący najistotniejsze dokonanie tego doktoratu).

Niestety opis tej reakcji, tak na schemacie jak i w tekście **budzi mój głęboki sprzeciw. Opis ten jest nienaukowy, zbyt lakoniczny i niepoparty dowodami ani dyskusją** i brzmi: *"W wyniku cykloaddycji otrzymano z wydajnością 53% tylko jeden diastereoizomer 155. Oznacza to, że reakcja jest całkowicie diastereo selektywna. Na podstawie wykonanego widma <sup>1</sup>H NMR udało się określić konfigurację względną podstawników w diastereoizomerze cykloadduktu. Ustalono, że jest to konfiguracja trans"*.

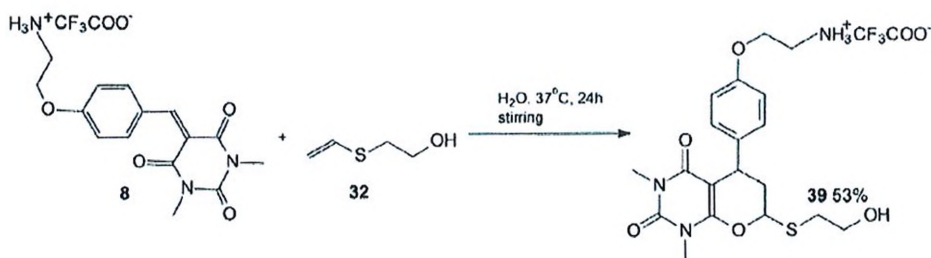
Doktorant nie pokazał w doktoracie, żadnego widma czystego produktu, w odpowiednich rozszerzeniach i z przypisaniem sygnałów do ponumerowanych atomów w strukturze związku. Bez dowodów spektroskopowych lub/i krystalograficznych, mechanizmu reakcji nie uznaje takiego wyjaśnienia i nie akceptuje tego opisu kluczowego produktu.

Zaintrygowany takim przedstawieniem problemu naukowego, postanowiłem sprawdzić w jaki sposób opisano ten związek w publikacji Doktoranta, o której pisałem na wstępie. I jakież było moje zdziwienie, kiedy odkryłem, że w publikacji autorzy nie określają tak jednoznacznie stereochemii produktu. **Jak zatem wytłumaczyć takie nieakceptowalne rozbieżności między treścią publikacji, a doktoratem?** Zestawienie obu schematów (z doktoratu i publikacji doktoranta pokazano poniżej). Podobny brak określenia stereochemii pokazuje suplement owej publikacji (S88). **Ten problem wymaga od mgr Bartłomieja Bazana jednoznacznego wyjaśnienia podczas dyskusji nad doktoratem lub/i korekty doktoratu lub publikacji.**

Gdyby Doktorant przeprowadził jakąkolwiek dyskusję wyników badań spektroskopowych być może powyższe uwagi trafiłyby na moc. Jednak w doktoracie nie przeprowadzono absolutnie żadnej dyskusji uzyskanych wyników spektroskopowych. **Wyniki pomiarów  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, IR i HRMS to tylko wypisane dane, bez przypisania (pasm, sygnałów) i bez jakiegokolwiek dyskusji.**



Rys. 64. Reakcja HDA heterodienu 153 i tioetenu winylowego 81



Scheme 11 Hetero-Diels-Alder reaction of 1-oxa-1,3-butadiene 8 and vinyl thioether 32 in aqueous medium at physiological conditions.

Całkowicie zgadzam się z podsumowaniem Doktoranta, iż opracowana przez niego kilkietapowa metoda syntezy heterodienu **153** (1-oksa-1,3-butadienu) została **znakomicie opracowania i zoptymalizowana**, chociaż droga do uzyskania była wyboista o czym pisał sam Doktorant. Sama zaś reakcja cykloaddycji przebiega w wodzie szybko, czego dowodzą przeprowadzone badania kinetyczne, zatem spełniała ona wstępne wymagania reakcji bioortogonalnych. Należało „jedynie” dowieść, że reakcja zajdzie w układach biologicznych, a przynajmniej modelach opartych na hodowli komórkowej. W tym celu, we współpracy z dr. hab. Łukaszem Skalniakiem z Zespołu Chemii Bioorganicznej i Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego dowiedziono, że otrzymany heterodien z przyłączonym znacznikiem fluorescencyjnym (**związek 154**) cyklizuje z tioeterem winylowym taksolu **94** (związek literaturowy, otrzymany w wieloetapowej syntezie przez Doktoranta). Jako układów komórkowych użyto komórek raka szyjki macicy HeLa oraz komórek kostniakomięsaka U-2 OS. Fluorescencja mikrotubuli, na które działa taksol połączony przez reakcję klik z barwnikiem dowodzi zarówno tego, iż tak zmodyfikowany taksol nadal wiąże się do mikrotubul, jaki i tego, że pożądana reakcja zaszła w układzie komórkowym. **To w rzeczy samej wspomniały wynik, dowodzący zarazem słuszności założonych celów rozprawy doktorskiej oraz udowadniający, że warto było stoczyć syntetyczną walkę o substraty tej reakcji.**

Doktorant poszukiwał również innych reakcji hetero-Dielsa-Aldera z wykorzystaniem pochodnej norbornenu oraz pochodnych cyklopropenu. Badania te nie zakończyły się powodzeniem, ponieważ oczekiwana reakcja HDA nie zaszła. W świetle tych okoliczności i wyjaśnień Doktoranta w brzmieniu: *„Można przypuszczać, że pożądanego produktu reakcji HDA 165 nie udało się uzyskać ze względu na oddziaływanie steryczne pomiędzy pierścieniem aromatycznym i mostkiem metylenowym w cząsteczce pochodnej 164”* mam pytanie czy próbowano modelować przebieg reakcji HDA lub strukturę poświadczonych produktów przy użyciu metod obliczeniowych i czy takie podejście nie byłoby bardziej racjonalne od prób syntezy na ślepo?

W końcowym etapie swojego doktoratu mgr Bartłomiej Bazan podjął się jeszcze udanej próby przeprowadzania kilku reakcji kondensacji Knoevenagela w warunkach „on water” z kwasem 1,3-dimetylobarbiturowym, które z sukcesem doprowadziły go do ciekawej biblioteki jego – arylidenopochodnych (związki **174,175, 176, 177, 178, 181**). Otrzymane związki następnie wykorzystał Doktorant w badaniach kinetycznych w reakcji z modelowym tioeterem winylowym.

**Niestety, produktów tych reakcji nie wyodrębniono oraz nie scharakteryzowano ich spektralnie.** Nie znamy zatem wydajności reakcji, a jej przebieg nie do końca jednak określono, skoro nie przedstawiano struktury produktu (produktów). Nie jest to zatem pełen wkład do opisu syntezy i charakterystyki nowych związków organicznych. Szkoda, bo otrzymane wyniki badań nie miałyby szcążkowego charakteru, a stanowiłyby wtedy naukową całość. W chemii organicznej bez danych spektroskopowych nie można opublikować struktury związku.

W części eksperymentalnej oraz we wspomnianej publikacji nie znalazłem również danych na temat wydajności najważniejszej reakcji HDA. Brakuje widm produktu reakcji pomiędzy związkami 94 i 154 – czyli charakterystyki tego produktu, który powstaje podczas syntezy bioortogonalnej w warunkach *in vitro*. Czy nie przeprowadzono tej reakcji w laboratorium? Proszę przedstawić logiczne uzasadnienie braku charakterystyki tej reakcji w „próbówce” oraz braku widm potwierdzających strukturę uzyskanej pochodnej taksolu.

Mimo kilku krytycznych uwag, które wymagają jednoznacznej i pełnej odpowiedzi Doktoranta, w podsumowaniu mojej recenzji mogę napisać, że przedstawiona przez mgr Bartłomieja Bazana rozprawa wyczerpuje wymagania stawiane rozprawom doktorskim, tak ustawowe (ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) jak i zwyczajowe, i zakładając, iż podczas obrony doktoratu i dyskusji otrzymam odpowiedzi do moich uwag, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczanie mgr Bartłomieja Bazana do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Kierownik  
Zakładu Chemii Medycznej  
  
prof. dr hab. Adam Huczyński