



**WYDZIAŁ
CHEMII**

Uniwersytet Łódzki

Katedra Chemii Organicznej

Łódź, dnia 9 grudnia 2024 r.

RECENZJA ROZPRAWY ZATYTUŁOWANEJ

**„Syntezy chiralnych pochodnych selenoorganicznych o potencjalnej
aktywności antyoksydacyjnej i antynowotworowej”**

**Złożonej przez Panią magister Annę Laskowską w celu uzyskania stopnia
naukowego doktora nauk chemicznych**

Recenzowana rozprawa doktorska Pani magister Anny Laskowskiej została przygotowana w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Promotorem rozprawy jest Pan prof. dr hab. Jacek Ścianowski a Promotorem pomocniczym Pani dr Agata J. Pacuła-Miszewska.

Pan prof. dr hab. Jacek Ścianowski jest specjalistą w dziedzinie chemii selenu. W szczególności jego zainteresowania naukowe dotyczą metodologii otrzymywania i transformacji chemicznych połączeń selenoorganicznych, ich stereochemii oraz aktywności biologicznej.

Recenzowana rozprawa doktorska miała na celu otrzymanie oraz badania aktywności antyoksydacyjnej i przeciwnowotworowej związków selenoorganicznych posiadających stereochemicznie zdefiniowane podstawniki w sąsiedztwie atomu selenu.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie 63 stronicowej dysertacji. Zawiera ona również kopie pięciu opublikowanych prac których Pani magister Anna Laskowska jest współautorką i które stanowią podstawę merytoryczną dysertacji oraz wymagane oświadczenia współautorów określające ich udział ww. publikacjach.

Cała rozprawa została podzielona na 11 części. Są to w kolejności: 1) *Streszczenie w języku polskim*, 2) *Streszczenie w języku angielskim (Summary in English)*, 3) *Wprowadzenie do rozprawy doktorskiej*, 4) *Cel pracy*, 5) *Spis publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej*, 6) *Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (są tu przedstawione publikacje [P1-5])*, 7) *Podsumowanie*, 8) *Literatura*, 9) *Wykształcenie i osiągnięcia naukowe*, 10) *Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej* oraz 11) *Oświadczenia współautorów publikacji*. Lektura powyższych rozdziałów pracy pozwoliła recenzentowi na zapoznanie się z celami i uzasadnieniem podjętych badań, ich znaczeniem w odniesieniu do danych literaturowych, wynikami badań własnych wraz z podsumowaniem oraz bibliografią. W pierwszej części dysertacji (Streszczeniu) autorka w zwięzły sposób przedstawia wyniki swoich badań. Czytelnik dowiaduje się z niej iż, otrzymała ona 70 nowych połączeń selenoorganicznych z czego aż 63 to cząsteczki chiralne. Pierwszą otrzymaną grupą związków były *N*-podstawione benzizoselenazolony z pośród których pewne *N*-2-hydroksy-1-indanylowe pochodne o konfiguracji (*S*) atomu węgla C1 cechowały się znaczącą aktywnością przeciwnowotworową wobec ludzkich komórek nowotworowych raka piersi MCF-7 oraz białaczki promielocytowej HL-60. Inna otrzymana *N*-trans-2-hydroksy-1-indanylowa pochodna oprócz dużej aktywności wobec komórek HL-60 była również nietoksyczna wobec nienowotworowych komórek śródbłónka żyły pępowinowej HUVEC. Doktorantka zwiększyła spektrum aktywności przeciwnowotworowej tego związku poprzez wprowadzenie dodatkowej grupy fenyłowej przy atomie selenu. Szczególnie interesującym aspektem pracy który autorka słusznie podkreśla było otrzymanie nowej grupy β -karbonylofenyloselenidów posiadających grupę estrową w pozycji *orto* do atomu selenu. Reprezentujący te połączenia *O*-(*-*)-mentylo-2-((2-oksopropylo)seleno)benzoesan wykazał aktywność przeciwutleniającą podobną do Troloxu. W omawianym fragmencie pracy znalazłem pewne skróty myślowe i uproszczenia. Pierwszym jest użycie liczby pojedynczej w odniesieniu do peroksydazy glutationowej (GPx). Tak naprawdę

warto pamiętać, iż peroksydazy glutationowe to grupa strukturalnie powiązanych ze sobą enzymów których fizjologiczna rola polega na redukcji nadtlenu wodoru (i innych organicznych nadtlenców) do wody oraz alkoholi. Innym uproszczeniem jest stwierdzenie iż cyt.: „Nadmierna produkcja reaktywnych form tlenu (ROS) powoduje niekontrolowaną proliferację i apoptozę komórek.”. Warto pamiętać, iż nadmierna produkcja ROS nie zawsze prowadzi do niekontrolowanej proliferacji czy apoptozy. Są bowiem inne scenariusze losów komórek o podwyższonym poziomie ROS. Należą do nich min. wejście na drogę ferroptozy lub nekroptozy. Następne dwie części pracy to Wprowadzenie do rozprawy doktorskiej oraz Cel pracy. Dyskutowane są w nich problemy związane z fizjologiczną rolą oraz cyklem katalitycznym GPx, znaczeniu organicznych połączeń selenu jako biomimetyków GPx oraz roli stereoizomerii w chemii medycznej. Schemat 3 oraz informacje ze strony 4 w jednoznaczny sposób pozwalają czytelnikowi na zapoznanie się z celami badań doktorantki oraz rodzajami selenoorganicznych pochodnych nad których otrzymywaniem pracowała. Były to chiralne *N*-podstawione benzisoselenazole (oznaczone symbolem B), diselenidy (oznaczone symbolem C), *N*-podstawione fenyloselenidy (oznaczone symbolem D), chiralne *N*-sfunkcjonalizowane β -karbonyloselenidy (oznaczone symbolem E) oraz β -karbonyloselenidy z grupą estrową (oznaczone symbolem F). Bez wątpienia te pięć typów związków to strukturalnie spójna grupa organicznych połączeń selenu. W pełni zgadzam się z postawioną przez doktorantkę hipotezą, iż są one ciekawymi obiektami dla badań biologicznych w aspekcie aktywności przeciwutleniającej i przeciwnowotworowej. Kolejne 37 stron zawiera streszczenie pięciu publikacji stanowiących podstawę dysertacji doktorskiej. Same publikacje przeszły już ocenę Edytorów oraz Recenzentów. Uważam, że nie ma więc potrzeby ich ponownej recenzji. Jako pierwsze autorka przedstawia streszczenie publikacji przeglądowej z *Arkivoc*. Publikacja podsumowuje ostatnie 12 lat badań nad chemią związków, nanocząstek oraz polimerów selenoorganicznych w aspekcie ich aktywności przeciwutleniającej, aktywności biologicznej, zastosowań medycznych i przemysłowych. Oprócz związków, nanocząstek i polimerów omówione zostały

również metody analityczne stosowane do badania aktywności przeciwtleniającej połączeń selenoorganicznych. Nie mam wątpliwości, iż zgromadzenie prac oryginalnych, zapoznanie się z nimi oraz napisanie na ich podstawie pracy przeglądowej dało doktorantce szerszy pogląd i spojrzenie na jej własne badania i ich wyniki. Uważam, że omawiana praca przeglądowa doskonale uzupełnia i współgra z pracami oryginalnymi doktorantki. Streszczenie pierwszej pracy oryginalnej (z *Materials* z 2022 roku) przedstawia dwu etapową procedurę otrzymywania 13 chiralnych benzizoselenazonów **37a-50a** oraz ich przekształcenia w diselenidy **37b-50b**. Związki **37a-50a** oraz **37b-50b** zostały otrzymane z dobrymi wydajnościami 45-95% i 46-93%. Budowę enancjomerów **43a** oraz **44a** udało się potwierdzić w fazie stałej za pomocą rentgenografii strukturalnej monokryształów. Właściwości przeciwtleniające otrzymanych cząsteczek badała doktorantka z wykorzystaniem techniki NMR metodą Iwaoki („DTT^{red}/DTT^{ox}”). Najwyższą aktywnością cechowały się formy enancjomeryczne benzizoselenazonów **43a** oraz **44a** oraz diselenidów **47b/48b** i **49b/50b**. W przypadku związków **43a** oraz **44a** ich znaczące właściwości przeciwtleniające dobrze korelowały z aktywnością przeciwnowotworową wobec komórek raka piersi MCF-7 oraz leukemicznych HL-60. Nie zaobserwowano dla nich jednak wpływu stereochemii na aktywność (obydwie formy enancjomeryczne wykazywały porównywalne wartości IC₅₀). Najwyższą aktywność przeciwnowotworową w serii benzizoselenazonów wykazały natomiast związki **47a** i **49a** które były tylko nieco bardziej aktywne od diastereoizomerów **48a** i **50a**. Związki **47a/48a** i **49a/50a** ustępowały znacznie aktywnością przeciwtleniającą pochodnym **43a/44a** więc ich aktywność przeciwnowotworowa zdaje się nie być bezpośrednio związana i aktywnością przeciwtleniającą. W przypadku diselenidów **37b-50b** zastanawiającym jest brak ich aktywności (z wyjątkiem **39b**) wobec komórek MCF-7. Być może jest to związane, jak chce doktorantka, z brakiem obecności w cząsteczkach **37b-50b** wiązania Se-N. Biorąc jednak pod uwagę wyjątek dla związku **39b** tłumaczenie to pozostawia pewne wątpliwości. Najważniejszą konkluzją omawianego fragmentu pracy jest stwierdzenie, iż

podstawnik hydroksybutylowy i hydroksyindanylowy przyłączone do atomu azotu szkieletu benzizoselenazonu lub diselenidu to obiecujące farmakofory w aspekcie aktywności przeciwnowotworowej. Mam dwie uwagi dotyczące tego fragmentu pracy. W tabelach 2 i 3 brak jest danych IC_{50} dla ebselenu i jakiegoś szeroko stosowanego leku przeciwnowotworowego (DOX lub cisPt) oraz czasu inkubacji komórek ze związkami. Druga uwaga dotyczy końcówki zdania ze strony 29 cyt.: „... w dalszych modyfikacjach z optymalną interakcją lek-białko/enzym”. O jakie konkretnie „białko/enzym” autorce tu chodzi? Celem następnej publikacji (*RSC Advances*) którą streszcza doktorantka było ustalenie ewentualnych zależności między obecnością w cząsteczkach grupy fenyloselenidowej a aktywnością przeciwutleniającą i przeciwnowotworową. W tym celu otrzymała ona 5 par enancjomerycznych fenyloselenidów (związki o symbolach **53-62**) oraz cztery diastereoizomery **63-66**. Procedura syntezy obejmowała dwa etapy. Pierwszy polegał na otrzymaniu benzizoselenazonów **37a-50a** które następnie na drodze reakcji z bromkiem fenylomagnezowym były przekształcane w fenyloselenidy **53-66**. O ile wydajności pierwszego etapu sięgały nawet 92% (dla związku **62**) o tyle reakcja otwarcia pierścienia przebiegała w najlepszym wypadku z wydajnością 51% (dla diastereoizomeru **63**). Tu pytanie: czy doktorantka zastanawiała się jak stereochemia cyklicznych benzizoselenazonów **37a-50a** wpływa na przebieg reakcji z bromkiem fenylomagnezowym? Taki wpływ jest chyba odzwierciedlony choćby poprzez różnice w wydajności dla produktów **63-66**. Aktywność przeciwutleniającą otrzymanych pochodnych była badana za pomocą testu Iwaoki oraz DPPH. Wykazały one, iż fenyloselenidy *N-trans*-2-hydroksy-1-indanylu **65/66** są najefektywniejszymi przeciwutleniaczami z pośród wszystkich badanych związków. Jednak aktywność ta nie korelowała z aktywnością przeciwnowotworową ponieważ przedstawione w Tabeli 4 wartości IC_{50} dla **65/66** były relatywnie wysokie (83,38 μ M (MCF-7, **65**), 69,50 μ M (HL-60, **65**) 63,75 μ M (MCF-7, **66**), 55,45 μ M (HL-60, **66**)). Znacząco większą aktywność wobec komórek linii MCF-7 wykazał natomiast izomer *cis* **64** (IC_{50} = 16,65 μ M). Co

jeszcze bardziej zastanawiające był on praktycznie nieaktywnym wobec zawiesinowych komórek białaczkowych HL-60 ($IC_{50} > 150 \mu M$). Wszystko to jest bardzo ciekawe i rodzi pytania o mechanizm działania badanych połączeń na poziomie komórkowym a w szczególności ich wpływu na cykl komórkowy i profil proteomiczny. Zgadzam się z doktorantką, iż wprowadzenie fragmentu *N*-indanylowego zwiększa aktywność przeciwutleniającą. Jednocześnie nie zupełnie koreluje się to z aktywnością przeciwnowotworową. Streszczenie kolejnej publikacji (*Materials* z 2024) opisuje otrzymywanie i badania biologiczne chiralnych *N*-sfunekjonalizowanych β -karbonyloselenidów **68-81** zawierających związane z atomem selenu ugrupowanie 2-oksopropylowe. Autorka zoptymalizowała opisaną przez Zhanga i współpracowników metodę syntezy tych połączeń. Kluczowym intermediatem w tych procesach był selenid **67**. Podobnie jak we wcześniej omawianych publikacjach również i w tej autorka podjęła wysiłek oceny aktywności przeciwutleniającej wszystkich otrzymanych połączeń. W tym celu zastosowała ona metodę Iwaoki oraz DPPH. W pierwszej najbardziej efektywnymi okazały się *cis* selenidy **78/79** oraz *trans* selenidy **80/81**. Natomiast w metodzie DPPH to związki **70/71** były najaktywniejsze. Co istotne aktywność ta koreluje się z faktem, iż **70/71** wykazały również największą aktywność przeciwnowotworową wobec komórek linii MCF-7 oraz HL-60. Zbieżność ta nie jest przypadkowa. Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż enancjomer **78** (najaktywniejszy w teście Iwaoki) wykazywał porównywalną ze związkiem **70** i **71** aktywność przeciw komórkom MCF-7 i niższą wobec HL-60. Był on również mniej aktywnym od **70/71** przeciwutleniaczem w teście DPPH ($IC_{50} = 0,89$ mM dla **70/71** i 2,51 dla **78**). W mojej ocenie fakt ten trochę komplikuje pełne zrozumienie mechanizmu aktywności biologicznej omawianych związków. Streszczenie ostatniej pracy (*Molecules* z 2024) dotyczy otrzymywania i badań biologicznych serii 14 β -karbonylowofenylowych selenidów posiadających grupę *o*-estrową z podstawnikami alkilowymi i aryłowymi w tym grupę terpenylową. Wprowadzenie grupy estrowej polegało na reakcji chlorku kwasowego **67** z odpowiednim alkoholem. Z pośród otrzymanych na tej drodze biblioteki związków

achiralny ester **84** wykazał się największą aktywnością w teście Iwaoki. Test DPPH wykazał natomiast, iż to terpenylova pochodna **89** charakteryzuje się największą aktywnością wychwytywania wolnych rodników. Była ona podobna do aktywności wykazywanej przez Trolox. Jest to interesująca obserwacja wskazująca w tym konkretnym kontekście na znaczenie przeciwutleniające wywodzącej się ze źródeł naturalnych grupy terpenylowej. Z pośród pozostałych chiralnych połączeń największą aktywność zmiatania wolnych rodników w teście DPPH wykazały estry z grupą (*sec*)-butylową **90/91**. Niestety aktywność przeciwnowotworowa otrzymanych estrów nie pokrywała się z ich aktywnością w teście DPPH bowiem dwa najaktywniejsze estry **82** i **86** wykazały gorsze aktywności w teście DPPH. Dodatkowo ich aktywność była również wyraźnie mniejsza od oksaliplatyny. W tym aspekcie mam małą uwagę, w tabeli 9 na stronie 42 autorka nie podała błędów statystycznych dla wartości IC₅₀ oksaliplatyny. Po przeanalizowaniu danych biologicznych z tabeli 10 wypada zgodzić się z autorką, iż pochodne z grupą α -metylobenzylową o konfiguracji (*S*) wykazują trochę lepszą aktywność antyproliferacyjną od izomerów o konfiguracji (*R*). Jest to jednak raczej tendencja niż bardzo znaczący efekt. Należy też zgodzić się z autorką, iż komórki linii HL-60 wykazują większą podatność na działanie selenidów niż komórki MCF-7. Można to wytłumaczyć faktem iż te pierwsze są komórkami zawiesinowymi a drugie adherentnymi. W kolejnym podrozdziale dysertacji doktorantka w sześciu punktach wymienia osiągnięcia swoich prac. Nie będę ich wszystkich ponownie tutaj wymieniać. Stwierdzę jednak iż rozwinęła ona chemię połączeń selenoorganicznych, otrzymała znaczącą liczebnie bibliotekę związków oraz zgromadziła dla niej pokaźny zasób danych o znaczeniu biologicznym. To są konkretne, wymierne i nowatorskie rezultaty prac badawczych. Kolejne części rozprawy to *Literatura*, *Wykształcenie i osiągnięcia naukowe*, kopie publikacji oraz *Oświadczenia współautorów publikacji*. Do dysertacji załączono płytę CD z rozprawą.

Po zapoznaniu się z dysertacją doktorską Pani magister Anny Laskowskiej jestem przekonany, że jest ona doświadczonym i wnikliwym eksperymentatorem, zdolnym do samodzielnego prowadzenia badań naukowych w dyscyplinie naukowej nauk chemicznych. Przedstawiony w rozprawie doktorskiej dorobek publikacyjny Pani magister Anny Laskowskiej obejmuje aż 11 publikacji. Wszystkie są z listy Filadelfijskiej. Prace oryginalne w *RSC Advances* **2023**, *13*, 14698 (IF = 3,9), *Materials* **2022**, *15*, 2068 i **2024**, *17*, 899 (IF = 3,1), *Molecules* **2024**, *29*, 2866 (IF = 4,2) oraz przeglądowa w *Arkivoc* **2023**, *v*, 212 (IF = 0,9) są merytoryczną podstawą recenzowanej dysertacji. Pozostałe 6 publikacji, a są to prace w *Proceedings* **2019**, *41*, 22, *Materials* **2020**, *13*, 661, *Symmetry* **2021**, *13*, 502, *New. J. Chem.* **2022**, *46*, 20053, *Phosphorus, sulfur, and silicon* **2023**, *199(1)*, 58 i *Phosphorus, sulfur, and silicon* **2023**, *199(1)*, 2 nawiązują do tej tematyki. Co należy podkreślić doktorantka jest też współautorką zgłoszenia patentowego (*N-alkilowe sole kwasu 2-(karboksyamido)-benzenoseleneniowego oraz sposób ich wytwarzania*. P.431055). Pani magister Anna Laskowska prezentowała wyniki swoich badań w formie komunikatów ustnych na trzech konferencjach. Była współautorką trzech innych komunikatów oraz trzech wykładów wygłoszonych podczas międzynarodowych konferencji naukowych. Jest też współautorką 28 posterów prezentowanych podczas krajowych oraz zagranicznych zjazdów, konferencji i workshopów. Pani magister Anna Laskowska była beneficjentką programu NAWA PROM dzięki któremu odbyła miesięczny staż zagraniczny w zespole prof. C. Santiego (Uniwersytet w Perugii, Włochy). Doktorantka była członkiem Komitetów Organizacyjnych dwóch konferencji (65 Zjazdu PTChm, 2023 i WSeS-11, 2024). Obydwa te wydarzenia miały miejsce w Toruniu. Doktorantka była beneficjentką czterech grantów dla młodych naukowców oraz grantu Grants4NCUSStudents. Jest też ona laureatką nagrody za najlepszy poster naukowy którą otrzymała w 2024 roku podczas WSeS-11 w Toruniu.

Podsumowując, stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku „Prawo o

szkolnictwie wyższym i nauce” [Dz.U. z 2018 r. poz. 1668, z późn. zm.] i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani magister Anny Laskowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Wnioskuję również o wyróżnienie recenzowanej pracy. Wniosek uzasadniam faktem, iż doktorantka wniosła znaczący wkład w rozwój biologicznie-orientowanej chemii selenoorganicznej. Jest ona w chwili obecnej jedną z niewielu specjalistek w tej dziedzinie w naszym kraju.

prof. dr hab. Konrad Kowalski

prof. dr hab. Konrad Kowalski
Katedra Chemii Organicznej,
Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki
ul. Tamka 12, 91-403 Łódź

Wpłynęło dnia 2024 -12- 17

Specjalista
Podpis:
Ingr Dorota Dombrowska