



Dr hab. inż. Renata Siedlecka, prof. uczelni,  
Katedra Chemii Organicznej i Medycznej

Wrocław, 20.01.2025 r.

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Anny Laskowskiej zatytułowanej  
„*Synteza chiralnych pochodnych selenoorganicznych o potencjalnej aktywności  
antyoksydacyjnej i antynowotworowej*”.**

Praca została wykonana w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pod kierownictwem prof. dr hab. Jacka Ścianowskiego.

Zespół, w którym prowadziła swoje badania Pani mgr Anna Laskowska ma ugruntowaną renomę i posiada na swoim koncie znakomity dorobek w dziedzinie chemii monoterpenu oraz istotne osiągnięcia w zagadnieniach otrzymywania i zastosowań związków siarko- i selenoorganicznych. W obszarze zwłaszcza tych ostatnich swoje badania orientowała doktorantka. Zasadniczym celem prac Pani mgr Laskowskiej było zaprojektowanie i synteza związków selenoorganicznych o wysokim potencjale redoks, a jednocześnie niskiej toksyczności dla zdrowych komórek, co otwierałoby perspektywy ich dalszych badań i praktycznych zastosowań. Chyba nie trzeba w tym miejscu przypominać, że selen to pierwiastek śladowy o kluczowym znaczeniu dla zdrowia, a jego organiczne pochodne, selenometionina i selenocysteina (tzw. selen organiczny), charakteryzują się wysoką biodostępnością i działaniem prozdrowotnym. Selen organiczny, jako silny antyoksydant pomaga chronić komórki przed uszkodzeniami spowodowanymi przez wolne rodniki, a więc m. in. opóźnia procesy starzenia, odgrywa istotną rolę w ochronie układu sercowo-naczyniowego, wspiera układ odpornościowy, wpływając na produkcję białych krwinek, odgrywa ogromną rolę w profilaktyce wielu chorób, w tym nowotworowych. Poszukiwania nowych pochodnych organicznych selenu jest więc zagadnieniem bardzo aktualnym, zwłaszcza, że doktorantka podjęła się otrzymywania odpowiednich pochodnych w ich enancjomerycznej postaci oraz zbadania wpływu stereochemii na aktywność otrzymanych związków.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska ma formę spójnego tematycznie zbioru pięciu publikacji w uznanych czasopismach, składającego się z czterech oryginalnych artykułów i jednej pracy przeglądowej:

- *Arkivoc* **2023**, part v, 212-235,
- *Materials* **2022**, 15, 2068,
- *RSC Advances* **2023**, 13, 14698-14702,
- *Materials* **2024**, 17, 899,
- *Molecules* **2024**, 29, 2866,

wymieniając w kolejności zastosowanej przez autorkę. W czterech pracach, poza przeglądową, mgr Laskowska jest wymieniana jako pierwsza autorka. W rozprawie znalazła się również informacja o całkowitym dorobku doktorantki (rozdz. 9.), który obejmuje 6 dodatkowych opublikowanych artykułów, 1 zgłoszenie patentowe oraz szereg komunikatów konferencyjnych, w tym 3 będące ustną prezentacją doktorantki. Jak na ten etap rozwoju młodego naukowca jest to dorobek całkiem okazały.

Na spójność tematyczną artykułów, stanowiących rozprawę, składa się racjonalny plan otrzymywania mimetyków GPx, - selenoenzymu odgrywającego zasadniczą rolę w procesach redoks kluczowych dla funkcjonowania organizmów żywych. Doktorantka w swojej pracy rozważa i stosuje różne modyfikacje strukturalne oraz bada ich wpływ na bioaktywność, co przyczynia się do znalezienia kombinacji cech strukturalnych pozwalających na zmaksymalizowanie biodostępności i efektywności terapeutycznej. Wychodząc z chloroku 2-(chloroseleno)benzoilu doktorantka otrzymywała kolejne grupy chiralnych N-funkcjonalizowanych selenoorganicznych pochodnych w postaci benzizoselenazol-3(2H)-onów, dieselenidów, fenyloselenidów,  $\beta$ -karbonylofenyloselenidów a także O-funkcjonalizowanych  $\beta$ -karbonylo-fenyloselenidów. Wszystkie nowe związki opisane w poszczególnych pracach poddawane były analizie ich własności antyoksydacyjnych z użyciem procedury Iwaoki (z wykorzystaniem  $^1\text{H}$  NMR) lub metody wychwytywania rodników 2,2'-difenylo-1-pikrylhydrazylu (DPPH; z wykorzystaniem spektrofotometrii). Zbadano też ich aktywność cytotoksyczną w stosunku do dwóch linii komórkowych, tj. białaczki HL-60 oraz raka piersi MCF-7, dzięki współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Łodzi.

Załączone w pracy artykuły, wraz ze szczegółowymi materiałami uzupełniającymi, opatrzone wprowadzeniem (rozdz. 3.) dotyczącym znaczenia związków selenoorganicznych, ich zastosowań w syntezie organicznej oraz jako terapeutyków w wielu różnych dolegliwościach i schorzeniach. Przedstawiono jak przebiega mechanizm obniżania poziomu niekorzystnych dla organizmu reaktywnych form tlenu poprzez redukcję z udziałem GPx. Omówiono rolę stereochemii w aktywności biologicznej związków oraz podano przykłady aktywnych mimetyków GPx. Pod koniec autorka zasygnalizowała w kierunku jakich modyfikacji zmierzały jej plany syntetyczne, które skonkretyzowała w rozdziale 4.



W rozdziale 6. dysertacji znalazło się omówienie wyników stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, które były jednocześnie przedmiotem opublikowanych prac. Znajdująca się w zbiorze przedstawionych publikacji praca przeglądowa z *Arkivoc* stanowi rodzaj wprowadzenia, przedstawiając aktualny stan wiedzy o potencjale antyoksydacyjnym m. in. organicznych pochodnych selenu, przybliżając stosowane procedury badania własności antyoksydacyjnych oraz opisując znane i stosowane w medycynie przykłady selenoorganicznych antyoksydantów, w tym ebselen i jego modyfikacje, różne typy diselenidów oraz innych pochodnych selenoorganicznych.

Omówiony w podrozdziale 6.2. artykuł z *Materials* (2022) dotyczy syntezy i badania właściwości serii chiralnie N-podstawionych benzisoselenazol-3(2H)-onów w postaci obu enancjomerów oraz następnie otrzymanych diselenidów. Podstawowa różnica w potencjalnych właściwościach obu tych grup związków wynika z różnicy energii reaktywnego wiązania Se-N (193 kJ/mol) w benzisoselenazonach i Se-Se (172 kJ/mol) w diselenidach. Doktorantka zbadała, jak to wpływa na potencjał antyoksydacyjny obu tych grup i jak można było oczekiwać, nieco większa aktywność wykazały diselenidy, zwłaszcza podstawione objętościową grupą 2- hydroksyindanylową, zwłaszcza odpowiedni diastereomer *trans*. Poza tym przykładem, w przypadku badania potencjału redoks stereochemia związków nie miała znaczenia, natomiast niewątpliwie zaznaczyła ona swój wpływ na właściwości cytotoksyczne związków. Były one oznaczane dla linii komórkowych ludzkiej białaczki promielocytowej HL-60 oraz raka piersi MCF-7. Wartości IC<sub>50</sub> badanych benzisoselenazonów generalnie były niższe dla izomerów o konfiguracji (S) na atomie węgla połączonym z selenem. Największy potencjał antyproliferacyjny wobec obu linii komórkowych wyznaczono dla *N*-[(1*S*,2*R*)-*cis*-2-hydroksy-1-indanylo]-1,2-benzisoselenazonu, aczkolwiek konfiguracja na węglu C2 nie miała aż tak istotnego wpływu. Natomiast diselenidy zasadniczo okazały się dużo mniej aktywne i tylko wobec komórek białaczki HL-60. Najaktywniejsze były te, które posiadały grupę OH na węglu sąsiadującym z C1 ((*S*)-hydroksybutylowy i oba enancjomery *trans*-hydroksyindanylowe). Enancjomer (*R,R*) diselenidu *trans*-hydroksyindanylowego okazał się selektywnym antyproliferantem, nietoksycznym wobec zdrowych komórek.

Przedstawiony w kolejnym podrozdziale pracy pomysł modyfikacji dotychczas otrzymanych pochodnych poprzez wprowadzenie do ich struktury ugrupowania fenyloselenidowego raczej nie spełnił oczekiwań. Procedurę transformacji otrzymanych wcześniej benzisoselenazonów a także wyniki badania aktywności otrzymanej serii chiralnych fenyloselenidów zdokumentowano w artykule do *RCS Advances* (2023). Pewnym uzupełnieniem było w tej publikacji zastosowanie do oznaczania potencjału antyoksydacyjnego testu wychwytywania rodników 2,2'-difenylo-1-pikrylhydrazylu (DPPH), poza używanym już wcześniej testem Iwaoki. Niestety w tej drugiej metodzie wszystkie badane fenyloselenidy okazały się słabymi antyoksydantami w porównaniu z ebselenem. W teście



rodnikowym wyniki były nieco lepsze, a najskuteczniej działał produkt z chiralną grupą 2-hydroksyindanylową na azocie. Szkoda, że nie porównano jego skuteczności z innymi znanymi środkami. Aktywność cytotoksyczna testowanych pochodnych generalnie była niewielka, stosunkowo najlepiej wypadł związek z podstawnikiem 2-hydroksyindanylowym o geometrii *cis*, wobec komórek raka piersi MCF-7.

Kolejną modyfikacją strukturalną zastosowaną przez doktorantkę było wprowadzenie na atom selenu podstawnika z tlenem, a dokładnie 2-oksopropylowego. Uzyskanie zadowalającej wydajności wymagało racjonalnej optymalizacji, w której kluczowe okazały się warunki wytworzenia karboanionu atakującego selen. Odpowiednią procedurę syntezy oraz badania właściwości serii otrzymanych par enancjomerycznych  $\beta$ -karbonyloselenidów przedstawiono w artykule w *Materials* (2024). Aktywność przeciwutleniająca serii otrzymanych produktów w teście Iwaoki była zasadniczo porównywalna i przybliżona do aktywności ebselenu. Okazało się, że w przeciwieństwie do podstawnika fenyloвого, funkcjonalizacja selenu grupą 2-oksopropylową sprzyja aktywności antyutleniającej. Uzyskane wyniki wydają się też podkreślać pozytywny wpływ obecności grupy OH w podstawniku na azocie. Najwyższy potencjał wyznaczono dla acetoselenidu z podstawnikiem *cis*-2-hydroksyindanylowym. W teście z wyłapywaniem rodnika DPPH najbardziej aktywny okazał się produkt z grupą 1-hydroksy-2-butyloową na atomie azotu. Oba enancjomery tego związku wykazały się też najwyższym potencjałem przeciwnowotworowym wobec obu użytych linii komórkowych. W omawianej pracy znalazło się też zbiorcze porównanie aktywności cytotoksycznej wszystkich otrzymanych przez doktorantkę grup selenomimetyków. Wyraźne różnice w aktywności pojawiły się zwłaszcza wobec raka białaczki HL-60 i układały się w szeregu: diselenidy >  $\beta$ -karbonyloselenidy > benzisoselenazolony, przy właściwie braku aktywności fenyloselenidów. Aktywności wobec MCF-7 były porównywalne z Oksaliplatyną (poza fenyloselenidami).

Zachęcona wynikami acetoselenidów doktorantka postanowiła sprawdzić, jak wpłynie wymiana funkcji amidowej na estrową. Opracowana metoda syntezy oraz analiza właściwości otrzymanych została opublikowana w artykule w *Molecules* (2024). Test Iwaoki wykazał niesatysfakcjonującą aktywność antyutleniającą tych produktów, porównywalną z fenyloselenidami. Wyniki testu z wychwytywaniem rodnika DPPH były bardziej obiecujące, zwłaszcza dla odpowiednich estrów mentolu i 2-butanolu. Ogólnie w tym teście pochodne *o*-estrowe działały nieco lepiej niż analogiczne pochodne *o*-amidowe. Badania cytotoksyczności generalnie dały mierne wyniki, nieco tylko lepsze niż odpowiednie fenyloselenidy z grupą amidową.

W rozdziale 7. dysertacji doktorantka dokonuje podsumowania uzyskanych wyników ze wskazaniem najbardziej aktywnych związków w poszczególnych testach. Na podkreślenie zasługuje fakt, że do aktywności przeciwnowotworowej niezbędne okazało się występowanie odpowiedniej funkcji amidowej w cząsteczce oraz, że niezależnie czy mowa o



bezoselenazonach, diselenidach,  $\beta$ -karbonyloselenidach czy jedynym aktywnym fenyloselenidzie, korzystne było występowanie na azocie podstawnika z grupą hydroksylową przy węglu C2.

Wymienione prace stanowią istotny wkład w rozwój chemii związków selenoorganicznych. Uzyskane wyniki mają nie tylko charakter badań podstawowych, ale zawierają również pewien potencjał aplikacyjny. Wszystkie publikacje zostały już poddane kompetentnej analizie recenzentów w czasopiśmie i pozytywnie ocenione, dlatego pod względem merytorycznym rola recenzenta tej rozprawy jest znacząco ułatwiona.

Mam jednak kilka uwag do przygotowanych opisów poszczególnych etapów badań.

- Na str 36, w Tabeli 7. przedstawiono wyniki analizy własności cytotoksycznych selenidów  $\beta$ -karbonylowych. Omawiając wyniki autorka podkreśliła te uzyskane dla pochodnych 1-hydroksy-2-butanowych, ale moim zdaniem te z grupą 2-hydroksyindanylową też nie powinny być pomijane. Tym bardziej, że w innych pracach podkreślano korzystny wpływ tego podstawnika.
- Czy związek **86** był otrzymany i badany jako racemat? Czy nie brała Pani pod uwagę formy enancjomerycznej? Zwłaszcza, że okazał się on jednym z dwóch, które wymieniono, jako aktywne cytotoksycznie.
- W podsumowaniach na str. 45 pkt 3c autorka użyła sformułowania „zależność chiralności od aktywności” – chodzi oczywiście o zależność odwrotną. Natomiast w pkt 4 pisze o otrzymaniu „pochodnych z rusztowaniami alkilochiralnymi i chiralnymi” – a to jakaś różnica?
- Chciałam też zapytać, czy doktorantka potrafi wyjaśnić, dlaczego w badaniach potencjału antyutleniającego wyniki z obu testów się nie pokrywały? Dlaczego różne związki okazywały się aktywne w zależności od użytego testu?

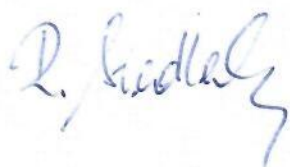
Zauważyłam też kilka niedociągnięć edytorskich w tekście:

- Mechanizm redukcji na str. 26 (Schemat 6) narysowany trochę „niezręcznie” – w opisie DTT<sup>red</sup> utleniany jest za pomocą związku 52, a na rysunku są jakby w „przeciwprądzie”.
- Błędna numeracja związków w tytule Tabeli 2, str. 28, oraz Tabeli 3. str. 29.
- Na str. 35, błędnie odwołano się do danych z Tabeli 8, a powinno być z Tabeli 6.
- Na str. 40 pochodnej *N*-mentylowej benzozoselenazonu przypisano błędnie nr 7.
- Struktury na rys. 7. Nie mają przypisanych konkretnych numerów

Uwagi te nie wpływają na moją jednoznacznie pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Anny Laskowskiej. Podjęty temat jest ważny i aktualny. W pracy wykorzystane zostały odpowiednie narzędzia badawcze. Wkład doktorantki w otrzymanie opisanych rezultatów jest znaczny (pełni rolę pierwszej Współautorki), jasno sprecyzowany. Musiała się ona wykazać

umiejętnością samodzielnego prowadzenia ambitnych badań oraz wnikliwością w analizie i interpretacji uzyskanych wyników eksperymentalnych.

Ze wszystkich tych względów stwierdzam, iż oceniana praca doktorska spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2023 r., poz. 742) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Anny Laskowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk chemicznych, w dyscyplinie nauki ścisłe i przyrodnicze.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'L. Kiedrzycki', is located below the main text. The signature is written in a cursive style with a long, sweeping tail.