

1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Związki selenoorganiczne posiadają unikalną zdolność do eliminacji reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (NOS) poprzez naśladowanie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx). Jako antyoksydacyjny selenoenzym utrzymuje ona homeostazę redoks w organizmie ludzkim poprzez katalityczny rozkład nadmiaru nadtlenków nieorganicznych i organicznych do wody lub alkoholu w obecności glutationu lub innych endogennych tioli. Stres oksydacyjny spowodowany nadprodukcją reaktywnych form tlenu i azotu jest główną przyczyną starzenia się. Prowadzi również do uszkodzenia struktur komórkowych, białek, lipidów i DNA, czego konsekwencją są m.in. procesy prozapalne oraz mutacje inicjujące kancerogenezę. Powszechnie znany ebselen (*N*-fenylo-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on) był pierwszym i jak do tej pory jedynym, zaawansowanym w badaniach klinicznych, związkiem selenoorganicznym, który wykazywał zdolność do naśladowania GPx. Jednakże, działania niepożądane oraz niekiedy niska jego aktywność, sprawiają, że poszukiwanie nowych, nietoksycznych mimetyków GPx o wysokim potencjale antyoksydacyjnym jest obecnie jednym z głównych nurtów badawczych dotyczących biologicznych aplikacji związków selenoorganicznych.

Cel pracy

Celem pracy doktorskiej było:

1. Opracowanie wydajnej metody syntezy *N*-funkcjonalizowanych benzisoselenazol-3(2*H*)-onów i odpowiednich difenyldiselenidów zawierających w pozycji *orto* funkcję amidową; Zaplanowane zadanie badawcze uwzględniło modyfikację struktury ebselenu poprzez:
 - (a) wprowadzenie podstawników elektronoakceptorowych i elektronodonorowych do pierścienia *N*-fenyłowego,
 - (b) zamianę podstawnika fenyłowego na atomie azotu na układy alkilowe lub bardziej rozbudowane układy aromatyczne,
 - (c) funkcjonalizację atomu azotu chiralnymi szkieletami terpenowymi z grupy bornanu,
 - (d) transformację wiązania Se-N w układ diselenidowy Se-Se.

2. Przebadanie właściwości antyoksydacyjnych i cytotoksycznych wszystkich zsyntetyzowanych benzizoselenazonów i diselenidów.

Rezultaty

(Ad. 1) W wyniku prowadzonych badań:

- a) opracowałam wydajną metodę syntezy ebselenu i jego pochodnych opartą na reakcji *N*-funkcjonalizowanego grupami alkilowymi i aryłowymi *o*-jodobenzamidu z diselenkiem dilitu,
- b) zaproponowałam nową procedurę generowania *in situ* diselenku dilitu w oparciu o reakcję selenu i wodorotlenku litu wobec wodzianu hydrazyny,
- c) opracowałam jednoetapową metodę syntezy difenyldiselenidów z funkcją amidową polegającą na reakcji *N*-podstawionych *o*-jodobenzamidów z diselenkiem dilitu wobec 5% wody,
- d) zoptymalizowałam procedurę transformacji benzizoselenazonów w diselenidy poprzez redukcję borowodorkiem sodu i następane utlenianie tlenem z powietrza,
- e) opracowałam nową metodę oksydatywnego tworzenia wiązania Se-N wobec jodanu potasu.
- f) stosując powyższe procedury otrzymałam 38 związków, w tym 25 pochodnych benzizoselenazonu i 13 diselenidów z funkcją amidową.

(Ad. 2) Właściwości przeciwutleniające *in vitro* wszystkich związków zweryfikowałam testem NMR. Aktywność cytotoksyczna wybranych pochodnych została zbadana na liniach komórkowych raka piersi MCF7, wątroby HEP2G, białaczki HL60 i prostaty DU145 oraz linii komórek normalnych prostaty PNT1A stosując dwie różne metody SRB i MTT. W wyniku badań wykazałam, że istotny wpływ na potencjalne właściwości biologiczne w badanych grupach związków mają modyfikacje strukturalne polegające na wprowadzeniu do struktury fragmentów alkilowych w tym przestrzenie rozbudowanych pochodnych terpenowych, jak również wprowadzenie do struktury podstawników metoksylowych. Uzyskane wyniki pozwoliły na selekcję 8 najbardziej aktywnych związków - 4 antyoksydantów i 4 związków posiadających właściwości cytotoksyczne do dalszych badań *in vivo*.

2. SUMMARY IN ENGLISH

The capacity to mimic the activity of glutathione peroxidase provides organoselenium compounds an important biological function – ability to eliminate the excess of reactive oxygen and nitrogen species (ROS, NOS). The antioxidant selenoenzyme GPx in cooperation with glutathione or other endogenic thiols catalytically reduces the excess of inorganic and organic peroxides to water or alcohol, enabling to maintain the body's redox homeostasis. Oxidative stress, initiated by the overproduction of oxygen and nitrogen reactive species, is associated with various cell dysfunctions and the process of aging. The damage of cell structures, proteins, lipids and DNA can lead to several pathologies including inflammation and cancer. Ebselen (*N*-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-one) is one of the first Se-derivative to be discovered as an efficient GPx mimic and till now the only one in phase II clinical trial. However, side effects, and in some cases only moderate activity, leave the search for new, non-toxic and highly effective benzisoselenazolone analogues as one of the main research topics of organoselenium chemistry from the medicinal point of view.

Research objectives

The goal of the project was to:

1. Design a new efficient procedure to synthesize biologically potent *N*-functionalized benzisoselenazolones and corresponding diselenides with amido function. The research plan included the modification of ebselen structure by:
 - (a) attaching an additional electron withdrawing and electron donating groups to the *N*-phenyl ring,
 - (b) changing the substituent on the nitrogen atom to alkyl or more bulky aromatic moieties,
 - (c) functionalization of the nitrogen atom with chiral terpenyl skeletons from bornane group,
 - (d) transformation of the Se-N to the Se-Se bond.
2. Testing the synthesized benzisoselenazolones and corresponding diselenides as antioxidants and cytotoxic agents.

Results

(Ad. 1) As a result of the conducted research:

(a) I have developed an efficient procedure to synthesize selenenyl selenides and its analogues based on the reaction of aliphatic and aromatic *N*-functionalized *o*-iodobenzamides with lithium diselenide,

(b) I have presented a new *in situ* method to generate dilithium diselenide by the reaction of selenium and lithium hydroxide in the presence of hydrazine hydrate

(c) I have designed a one-step reaction to synthesize diselenides with amido function directly from *N*-substituted *o*-iodobenzamides determined by the presence of water (5%),

(d) I have optimized the procedure for the transformation of benzeneselenazones to diselenides through the reduction with sodium borohydride followed by air oxidation,

(e) I have developed a new protocol for the oxidative formation of the Se-N bond with the application of potassium iodate,

(f) applying the developed procedures I have obtained 38 compounds, 25 benzeneselenazon derivatives and 13 diselenides with amido function.

(Ad. 2). All compounds I have tested as antioxidants *in vitro* by an NMR assay. The cytotoxic activity of selected derivatives was evaluated on breast MCF7, liver HEP2G, leukemia HL60 and prostate DU145 cancer cell lines and normal prostate cell line PNT1A using two methods SRB and MTT assay. As a result, I have evaluated that structural modifications based on the introduction of an alkyl moiety, including bulky terpene skeletons, and also methoxy group significantly influence the biological potential of the tested compounds. Collected results enabled to select 8 most active compounds – 4 antioxidants and 4 cytotoxic agents for further *in vivo* tests.