



Politechnika Wroclawska

Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Elżbieta Wojaczyńska, prof. uczelni
Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50 370 Wrocław
tel. 71 320 2410
e-mail: elzbieta.wojaczynska@pwr.edu.pl

Wrocław, 29 grudnia 2020 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Obieziurskiej-Fabisiak
zatytułowanej „Syntezy i reakcje pochodnych selenoorganicznych
o potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych i biologicznych”,
wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Magdaleny Obieziurskiej-Fabisiak wykonana została w Katedrze Chemii Organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, a jej promotorem był prof. dr. hab. Jacek Ścianowski. Jest on uznanym w świecie specjalistą w zakresie chemii związków selenoorganicznych, ale także związków terpenowych; opisane w rozprawie badania koncentrują się głównie na pierwszej grupie związków, jednak w wybranych modyfikacjach, prowadzących do chiralnych pochodnych ebselenu, wykorzystane zostały również aminy otrzymane z mentanu, karanu i pinanu. Tematyka poruszana w rozprawie jest niezwykle aktualna. Selen znany jest już od ponad dwustu lat, jednak dopiero w połowie XX wieku poznano jego znaczenie dla metabolizmu. Zwrócono także baczniejszą uwagę na to, że syntetyczne połączenia zawierające ten pierwiastek niekoniecznie muszą mieć działanie toksyczne. Wśród nich znajduje się ebseien, związek bicykliczny otrzymany po raz pierwszy w 1924 roku; pierwsze doniesienia o jego możliwej aktywności biologicznej ukazały się blisko 60 lat później. Ostatnie lata przynoszą kolejne doniesienia o kolejnych obszarach medycyny, w których może on znaleźć zastosowanie, a w tym roku można było przeczytać o jego możliwym wykorzystaniu do opracowania leku przeciwko koronawirusowi.

Praca mgr Magdaleny Obieziurskiej-Fabisiak ma formę cyklu złożonego z czterech powiązanych tematycznie publikacji naukowych w języku angielskim, które ukazały się w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym: *Materials* (2 artykuły), *Catalysts* i *Molecules*. Dwa zgłoszenia patentowe, wymienione jako uzupełnienie cyklu, nie zostały do niego dołączone, są one

ściśle powiązane z pracami P2 i P3. Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich czterech artykułów. Oświadczenia ich współautorów (a także samej zainteresowanej) wyraźnie wyznaczają dominujący wkład mgr M. Obieziurskiej-Fabisiak w powstanie materiału eksperymentalnego (synteza i oczyszczanie zdecydowanej większości badanych związków selenoorganicznych, ich charakterystyka fizykochemiczna oraz badania aktywności antyoksydacyjnej), a także istotny udział w powstawaniu tekstów manuskryptów, co nie jest powszechne na tym etapie rozwoju kariery naukowej.

Swoją recenzję zacznę od przygotowanego przez Doktorantkę liczącego około 30 stron przewodnika – autoreferatu, który zawiera najistotniejsze elementy tradycyjnej rozprawy: wstęp teoretyczny, cel pracy, omówienie badań własnych i spis literatury. Wprowadzenie stanowi zwięzłe przedstawienie tematyki pracy. Podstawowym zagadnieniem, wokół którego koncentrowały się badania mgr Magdaleny Obieziurskiej-Fabisiak, była synteza analogów peroksydazy glutationowej, nie zatem dziwnego, że tekst dotyczy przede wszystkim mechanizmu działania tego selenoenzymu oraz najbardziej znanego syntetycznego związku selenoorganicznego, wykazującego aktywność biologiczną – ebselenu. Jest to dość skrótowe, syntetyczne ujęcie, zawierające jednak najistotniejsze informacje istotne dla lektury publikacji stanowiących podstawę pracy, a poglądowe schematy oddają aktualny stan wiedzy na temat postulowanych lub zaobserwowanych form pośrednich/aktywnych (które rzeczywiście wykryto?).

Warto może byłoby wspomnieć, poza GPx w ochronę komórki przed niepożądanym działaniem utleniaczy zaangażowane są też inne enzymy (inne peroksydazy, katalazy, dysmutazy) a także witaminy C i E. Pewne wątpliwości może budzić wymienienie wśród chorób „starzenia się” (str. 5). Schemat 1 przedstawia oczywiście jedynie fragment struktury krystalicznej peroksydazy glutationowej; szkoda, że atom selenu nie jest dobrze widoczny.

W dalszej części tekstu Autorka opisuje wybrane tendencje w poszukiwaniu innych preparatów, mogących zastąpić ebselen, który ma bardzo szerokie spektrum działania (co niektórzy wiążą z jego oddziaływaniem z resztami cysteinowymi nie tylko glutationu, ale również białek). Ma jednak szereg ograniczeń – autorka wspomina na stronie 8 o jego słabej rozpuszczalności (należałoby dodać, że w wodzie). Stąd prowadzi się różnego rodzaju modyfikacje wyjściowej struktury lub syntezuje związki zawierające podobne motywy strukturalne, co właśnie było przedmiotem badań Doktorantki: synteza pochodnych tiokarbonylowych, wprowadzanie chiralnych fragmentów monoterpenu i transformacja wiązania Se-N. Autorka w zwięzły sposób uzasadnia podjęcie każdego z tych działań. Mam dwie uwagi dotyczące opisu Schematu 4: numeracja pokazanych chronologicznie związków jest przedstawiona, a pochodną 16 trudno nazwać monosacharydem. Swoją drogą, w oryginalnej publikacji znajdziemy serię związków (również

pochodnych monocukrowych); Zhang (nie Zhong) to nazwisko jednego z autorów pracy, ale ani pierwszego, ani też korespondencyjnego.

Cel pracy przedstawiła Doktorantka w punktach, wyraźnie wskazując, jakiego rodzaju modyfikacje strukturalne planowała przeprowadzić, a także jak zamierzała weryfikować ich celowość (określenie aktywności antyoksydacyjnej i cytotoksyczności). W dalszej części tekstu omówione zostały najistotniejsze wyniki zawarte w poszczególnych publikacjach. Istotą pracy P1 była synteza tiokarbonylowych, *N*-alkilopodstawionych pochodnych ebselenu z odpowiednich *ortho*-jodobenzamidów na dwóch drogach, różniących sekwencją użycia diselenku dilitu i odczynnika Lawessonna. W większości przypadków korzystniejsze było przekształcenie w pierwszej kolejności amidu w tioamid, gdyż możliwe okazało się wykonanie tego etapu w reaktorze mikrofalowym, co znacznie skróciło czas reakcji i poprawiło jej wydajność. Na nasuwające się pytanie o możliwość zastosowania podobnej modyfikacji w przypadku odwrotnej sekwencji odpowiedź znajdziemy już w samej publikacji P1. Zastąpienie w strukturze ebselenu atomu tlenu atomem siarki okazało się znacząco zwiększać aktywność antyoksydacyjną dwóch pochodnych. Jedną z nich, z podstawnikiem 3-metylobutylovym, wykazywała też istotną cytotoksyczność względem komórek raka prostaty, choć większą aktywność i selektywność stwierdzono dla jej tlenowego analogu. W omawianej części w omówieniu badań antyoksydacyjnych na stronie 16 pojawia się skrótowiec DDT, który w Schemacie 8 ma postać DTT. Tabela 1 ma błędny nagłówek, bo pokazuje pozostałość ditiolu, nie jego ubytek (w kolejnych tabelach już jest poprawnie, w oryginalnej publikacji też). Ebselen oznaczono numerem 5, nie 1.

Artykuł P2 dotyczy pochodnych ebselenu zawierających chiralne podstawniki, pochodzące od stereo- lub regioizomerycznych amin, otrzymanych w kilkuetapowej syntezie z terpenów: mentanu, pinanu i karanu. Celem było określenie wpływu chiralnej grupy na aktywność antyoksydacyjną (oczywiście w tym przypadku chiralność nie jest istotna, natomiast widoczne były różnice między diastereomerami i między regioizomerami) oraz zdolność do hamowania proliferacji wybranych linii komórkowych (tym razem również enancjomery różniły się wyraźnie). Nawiasem mówiąc, epimery traktowane są w tekście jako izomery odrębne w stosunku do diastereoizomerów, podczas gdy również należą do tej grupy.

Otwarte, utlenione pochodne ebselenu, kwasy seleninowe oraz ich sole potasowe zostały zsyntezowane po raz pierwszy przez Doktorantkę jako amfifilowe, potencjalne prekursory aktywnych form tego związku (publikacja P3). Wykazały one (w szczególności sole) działanie przeciwutleniające znacznie silniejsze od ebselenu, co umożliwiło zmniejszenie ilości katalizatorów w testach (prowadzonych zarówno w metanolu, jak i w wodzie). Aktywność antyproliferacyjna okazała się jednak umiarkowana. Końcowy wniosek dotyczący cytotoksyczności względem linii HL-60 jest błędnie przedstawiony – w większości przypadków to kwasy seleninowe wykazywały

większą aktywność niż odpowiednie sole. W oryginalnej publikacji podsumowanie jest poprawne. Ponadto w Schemacie 13 należałoby różnicować podstawniki R.

Kolejną grupą syntezowanych i badanych pochodnych ebselenu były fenyloselenidy, zawierające zróżnicowane podstawniki na atomie azotu (arylowe i alkilowe, w tym chiralne otrzymane z terpenów, łącznie 17 selenidów, publikacja P4). Autorka otrzymała je z odpowiednich *orto*-jodoamidów w reakcji nukleofilowego podstawienia katalizowanej fenantrolinowym kompleksem miedzi. Tym razem jedynie pochodna *n*-butylowa przewyższała ebselen pod względem aktywności antyoksydacyjnej. Choć cytotoksyczność badanych selenidów nie była najwyższa, zaobserwowano znaczącą poprawę aktywności w stosunku do linii komórek HL-60 w porównaniu z odpowiednimi związkami bicyklicznymi.

W podsumowaniu mgr Magdalena Obieziurska-Fabisiak wymienia najważniejsze osiągnięcia, zaliczając do nich opracowanie metodologii syntezy szeregu połączeń selenoorganicznych oraz określenie korelacji między przeprowadzonymi modyfikacjami strukturalnymi i aktywnością antyoksydacyjną oraz cytotoksycznością badanych związków. Przewodnik kończy spis literatury, zasadniczo poprawny, aczkolwiek w kilku przypadkach tytuły czasopism podane są w pełnym brzmieniu.

Poza tym tekst napisany generalnie poprawnym językiem, nieczęsto zdarzają się mniej zręczne sformułowania („...pierścienie aromatyczne (...) są dobrym sposobem...”, str. 10) i drobne niedokładności interpunkcyjne. Zauważyłam też przesunięcie tekstu na stronach 9-10. W przypadku organicznych kwasów selenu pojawił się problem z nazwami, spowodowany tym, że rdzeń „selen” ma końcówkę „-en”. Ulega ona podwojeniu w nazwie kwasu selenenowego RSeOH, jednak formy bardziej utlenione to odpowiednio kwas seleninowy, RSe(O)OH oraz selenonowy RSeO₃H. Ten ostatni w rozprawie się nie pojawia, natomiast drugi z wymienionych ma w tekście przewodnika nadmiarowe “-en-” i występuje na ogół jako kwas seleneninowy czy (str. 12) benzenoseleneniowy. Notabene w publikacji P3 te same kwasy są nazywane zarówno seleninic acids (tytuł, dyskusja), jak i selenenic acids (część eksperymentalna). Błędnie przetłumaczona została też nazwa chlorku kwasu (2-chloroseleno)benzoesowego 34 na stronie 20.

Centralną część rozprawy stanowią pełne teksty oryginalnych publikacji P1-P4, a końcową - bardzo obszerne materiały uzupełniające (kopie widm NMR, pełne wyniki badań antyoksydacyjnych i antyproliferacyjnych z publikacji P4). Artykuły te przeszły proces oceny edytorskiej, recenzji, i korekt, co oznacza uznanie celowości podjęcia tematu, zaplanowania i przeprowadzenia eksperymentów oraz prezentacji wyników.

Moim zdaniem jednak, obraz aktywności antyproliferacyjnej badanych związków mógłby być pełniejszy. Tylko w publikacji P1 użyto do badań linii referencyjnej (komórki chorobowo niezmiennione), co pozwala ocenić selektywność działania badanych związków, z kolei tylko w

publikacji P3 zastosowany został związek referencyjny (karboplatyna). Brak również porównawczych pomiarów dla ebselenu. W publikacji P1 wyniki podane zostały bez odchyłeń standardowych, za to z bardzo dużą liczbą cyfr znaczących. To oczywiście nie jest zarzut pod adresem doktorantki, która nie wykonywała tych badań sama, dziwi nieco natomiast, że recenzenci i edytorzy czasopism nie zwrócili na to uwagi. Moim zdaniem, sam temat jest wart kontynuacji, dla najbardziej aktywnych pochodnych warto byłoby poznać mechanizm działania.

Do przemyśleń skłaniają wyniki badań aktywności antyoksydacyjnej. W przeprowadzonych testach wykazały ją, w mniejszym lub większym stopniu, wszystkie badane związki selenoorganiczne zawierające ten pierwiastek na różnym stopniu utlenienia. Ich mechanizm działania jest oczywiście różny, czego test Iwaoki nie pokazuje. Warto zwrócić uwagę na to, że dla niektórych związków spadek stężenie DTT jest równomierny, w innych przypadkach wyraźnie przyspiesza lub zwalnia. Innym ograniczeniem testu jest sama stosowana technika pomiarowa: konieczność dostrojenia spektrometru z próbką przed rozpoczęciem właściwego pomiaru, ograniczona czułość wymagająca rejestracji co najmniej kilku-kilkunastu skanów (ile stosowano?), czyli de facto obserwujemy obraz uśredniony dla pewnego przedziału czasu. Zmierzam do pytania: czy rozważane były inne metody określania aktywności antyoksydacyjnej?

Zastanawia też obserwowana różnica aktywności wynikająca ze zmiany rozpuszczalnika z metanolu na wodę (praca P3). Wbrew twierdzeniu autorów artykułu, pochodna butylowa 18 (w przewodniku 46c) w metanolu jest wyraźnie mniej aktywna od pozostałych soli, a w wodzie najbardziej aktywna, z kolei pochodna 3-metylobutyłowa 20 (46e) – na odwrót, jak można spróbować to wyjaśnić?

Warto byłoby zadać bardziej ogólne pytanie: czy poszukiwany jest związek o możliwie największej aktywności antyoksydacyjnej? Warto zauważyć, że stosowanie antyoksydantów budzi pewne kontrowersje; jak pisze sama Autorka, obecność reaktywnych form tlenu jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania komórek, a nadmierne hamowanie ich apoptozy może wywołać niepożądane efekty. Rodzi się zatem pytanie, czy związki bardziej aktywne i lepiej biodostępne będą bezpieczne w użyciu?

Trudno oczywiście oczekiwać jednoznacznej odpowiedzi na tak postawione pytania, które zrodziły się w trakcie lektury pracy. Mogą one raczej stanowić punkt wyjścia do dyskusji w trakcie publicznej obrony.

Z przedstawionych prac wynika, że mgr Magdalena Obieziurska-Fabisiak otrzymała i scharakteryzowała szereg nieopisanych wcześniej związków selenoorganicznych, w części przypadków opracowując nowe drogi syntetyczne. Wskazuje to na bardzo dobre opanowanie procedur eksperymentalnych stosowanych w chemii organicznej, obejmujących prowadzenie reakcji w różnych warunkach, wydzielanie i oczyszczanie związków, głównie na drodze

chromatografii. Z własnego doświadczenia wiem, że praca ze związkami selenoorganicznymi potrafi być żmudna i niewdzięczna. Doktorantka posiadała również umiejętność stosowania technik analitycznych używanych do charakterystyki otrzymanych związków (m.in. polarymetria, spektroskopia ^1H , ^{13}C i ^{77}Se NMR) i określenia ich aktywności antyoksydacyjnej.

Mgr Magdalena Obieziurska-Fabisiak jest współautorką łącznie ośmiu artykułów z lat 2018-2020 w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Zwraca uwagę duża aktywność konferencyjna: jest współautorką 3 wykładów, 8 komunikatów i 25 posterów, z czego znaczną część prezentowała osobiście. Odbyła także dwumiesięczny staż w grupie prof. Claudia Santiago na Uniwersytecie w Perugii.

Podsumowując, uważam, że zaprezentowany cykl złożony z czterech publikacji stanowi rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego, jakim było opracowanie metodologii syntezy pochodnych ebselenu i określenie wpływu zastosowanych modyfikacji na aktywność otrzymanych związków. Powoła to na pozytywną ocenę rozprawy, której Autorka uzyskała wiele wartościowych wyników, spośród których chciałabym wyróżnić otrzymanie serii chiralnych pochodnych ebselenu, a zwłaszcza rozpuszczalnych w wodzie soli kwasów seleninowych. Oczywiście nie wszystkie modyfikacje okazały się korzystne, ale uzyskane wyniki wskazują kierunek dalszych zmian strukturalnych. Stwierdzam, że Doktorantka zdobyła niezbędną wiedzę teoretyczną i praktyczną z zakresu chemii organicznej i spełnione zostały wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Obieziurskiej-Fabisiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

