

dr hab. Danuta Wojcieszynska, prof. UŚ
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
ul. Jagiellońska 28
40-032 Katowicach
tel. 32 2009567
e-mail danuta.wojcieszynska@us.edu.pl

Katowice, dn. 30.06.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Krawczyk-Łebek pt. „Synteza i biotransformacje flawonoidów z grupą metylową”

Pani mgr Agnieszka Krawczyk-Łebek w rozprawie doktorskiej zatytułowanej „Synteza i biotransformacje flawonoidów z grupą metylową” podjęła się opracowania zagadnienia interesującego w ostatnich latach nie tylko mikrobiologów i biochemików, ale przede wszystkim biotechnologów. Wynika to z trudności stosowania metod chemicznych w pozyskiwaniu aktywnych stereoisomerów, w tym przypadku glikozylowanych flawonoidów. Związki te są roślinnymi metabolitami wtórnymi zaangażowanymi w różne interakcje roślin ze środowiskiem, a co szczególnie istotne wywierają szeroki zakres działań biologicznych: przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwalergiczne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwpłytkowe, przeciwnowotworowe i neuroprotektoryjne. Pomimo ich powszechnego występowania w roślinach, farmakologiczne zastosowanie aglikonów flawonoidowych jest ograniczone przez ich słabą biodostępność. Glikozylacja flawonoidów powoduje modulację ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych, przede wszystkim poprzez poprawę ich rozpuszczalności w wodzie oraz ułatwienie ich transportu wewnątrzkomórkowego i międzykomórkowego. Jednak nie bez znaczenia dla ich aktywności biologicznej jest położenie i liczba grup cukrowych, stąd niezwykle istotne w procesie biotransformacji jest uzyskiwanie produktów o ściśle określonym układzie podstawników, które będą oddziaływać na stereoselektywne struktury biologiczne, jak receptory czy enzymy.

Doktorantka w swojej rozprawie doktorskiej podjęła się realizacji celu, którym była synteza wybranych flawonoidów, a następnie na drodze biotransformacji otrzymanie nowych pochodnych glikozydowych i hydroksylowych z wykorzystaniem układów enzymatycznych entomopatogennych grzybów strzępkowych oraz określenie potencjalnych właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej na podstawie ich struktur chemicznych przy użyciu symulacji komputerowych.



Substratami w biotransformacji były uzyskane w wyniku chemicznej syntezy odpowiednie aglikony flawonoidowe z podstawnikiem metylowym. Metylacja ma na celu zwiększenie stabilności metabolicznej. Doktorantka przeprowadziła syntezę chemiczną chalkonów z wykorzystaniem reakcji kondensacji Claisena-Schmidta hydroksyacetonu lub jego metylowej pochodnej z benzaldehydem lub jego metylową pochodną, 6-metyloflawanon oraz 4'-metyloflawanon otrzymała na drodze cyklizacji odpowiednio 2'-hydroksy-5'-metylochalkonu i 2'-hydroksy-4-metylochalkonu w obecności octanu sodu. Natomiast 2'-metyloflawanon uzyskiwała w wyniku spontanicznej cyklizacji 2'-hydroksy-2-metylochalkonu. Flawony zostały otrzymane w reakcji cyklizacji w obecności jodu z odpowiednich chalkonów.

Doktorantka jako narzędzie regio- i stereoselektywnej transformacji wykorzystwała grzyby strzępkowe *Isaria fumosorosea* KCH J2, *Isaria farinosa* KCH J2.1 i *Beauveria bassiana* KCH J1.5. Wybór tych organizmów nie był przypadkowy, gdyż grzyby te są znane z bogatego układu enzymatycznego, w skład którego wchodzi hydroksylazy, reduktazy, układ enzymatyczny cytochromu P450 czy glikozylotransferazy. Po uzyskaniu produktów biotransformacji dla każdego z nich przeprowadziła symulacje komputerowe mające na celu predykcję ich aktywności biologicznej.

Pani mgr Agnieszka Krawczyk-Łebek swoją rozprawę doktorską przygotowała w formie zestawu pięciu oryginalnych prac opublikowanych w czasopismach o wysokich wartościach Impact factor wg bazy Journal Citation Reports (JCR) i punktacji MEiN. Cztery prace opublikowano w *International Journal of Molecular Science*, którego IF wynosi 5,923 i posiada 140 pkt na liście MEiN, oraz jedną pracę opublikowano w *Catalysts*, w czasopiśmie za 100 punktów MEiN i IF 3,520. Łączny IF publikacji wchodzących w skład rozprawy wynosi 27,212 natomiast liczba punktów za publikacje to 660. Udział doktorantki w tych publikacjach jest wiodący (od 60-70%), co zostało potwierdzone stosownymi oświadczeniami współautorów publikacji. Każda z prac została opatrzona suplementem, w którym znajduje się niezwykle bogaty materiał wynikowy. Pewien niedosyt powoduje brak pracy przeglądowej, która mogłaby wnieść element wzrastającego zainteresowania czytelnika w miarę poznawania faktów uzasadniających podjęcie tematu publikacji i jednocześnie byłoby to monograficzne ujęcie danych literaturowych dotyczących rozprawy. Do zestawu prac autorka dołączyła autoreferat zawierający streszczenie w języku polskim i angielskim, krótki wstęp, wyodrębniony cel pracy, materiały i metody, w rozdziale wyniki i dyskusja syntetycznie omówiono wyniki, całość zamyka podsumowanie i wnioski oraz bogaty spis literaturowy.

Pod względem merytorycznym prace stanowią jednolity, monotematyczny cykl publikacji i w sposób logiczny wiążą całość przedstawionej problematyki. Z uwagi na fakt, że wszystkie prace zostały już szczegółowo zrecenzowane przez specjalistów z redakcji czasopism, w których je wydrukowano, pozostała mi rola dokonania oceny całościowego znaczenia naukowego każdej z tych prac.

W pierwszej publikacji cyklu zatytułowanej „*Entomopathogenic filamentous fungi as biocatalysts in glycosylation of methylflavonoids*” zsyntetyzowano dwa związki flawonoidowe z





grupą metylową przy C-6 szkieletu flawanonu (C-5' w przypadku chalkonu) i biotransformowano z udziałem entomopatogennych szczepów grzybów strzępkowych *B. bassiana* KCH J1.5 i *I. fumosorosea* KCH J2. W wyniku biotransformacji 2'-hydroksy-5'-metylochalkonu w obu kulturach obserwowano jeden główny produkt 2'-hydroksy-5'-metylochalkon 3-O-β-D-(4''-O-metylo)-glukopiranozyd. Oba zastosowane szczepy skutecznie biotransformowały 6-metyloflawanon. Zaobserwowano, że szczep *B. bassiana* KCH J1.5 jest zdolny do hydroksylacji ugrupowania metylowego w pozycji C-6 6-metyloflawanonu, a także przyłączenia glikozydu w tej pozycji. Przemiany takiej do tej pory nie opisano w literaturze. Ponadto *B. bassiana* KCH J1.5 przeprowadzał glikozylację 2'-hydroksy-5'-metylochalkonu w pozycji C-3 oraz 6-metyloflawanonu w C-3'. System enzymatyczny *B. bassiana* KCH J1.5 katalizował również hydroksylację szkieletu flawanonu w pozycji C-4'. Drugi wykorzystany szczep – *I. fumosorosea* KCH J2 glikozylował 2'-hydroksy-5'-metylochalkon w pozycji C-3 i 6-metyloflawanon w pozycji C-4' i C-4. Doktorantka wskazała, że przyłączenie ugrupowania glikozydowego do C-4 było poprzedzone redukcją grupy karbonylowej.

Kolejne prace są produktem konsekwentnie realizowanego celu pracy. W publikacji “*New glycosylated dihydrochalcones obtained by biotransformation of 2'-hydroxy-2-methylchalcone in cultures of entomopathogenic filamentous fungi*” opisano biotransformacje 2'-hydroksy-2-metylochalkonu. Szczep *B. bassiana* KCH J1.5 przeprowadzał redukcję podwójnego wiązania 2'-hydroksy-2-metylochalkonu i jego glikozylację w pozycji C-3' oraz hydroksylację przy C-3, C-4 i C2-CH₃. Szczep *I. farinosa* KCH J2.6 również utworzył dihydrochalkony z grupą 4''-O-metyloglikozydową w pozycji C-3' i hydroksylową przy C-3. Ostatni szczep *I. fumosorosea* KCH J2 był zdolny do redukcji podwójnego wiązania 2'-hydroksy-2-metylochalkonu i jego glikozylacji przy C-2'. Z kolei w publikacji “*Fungal biotransformation of 2'-methylflavanone and 2'-methylflavone as a method to obtain glycosylated derivatives*” opisano mikrobiologiczne transformacje odpowiedników 2'-hydroksy-2-metylochalkonu w klasie flawanonów – 2'-metyloflawanonu oraz w klasie flawonów – 2'-metyloflawonu. W wyniku biotransformacji z udziałem szczepu *B. bassiana* KCH uzyskano pochodne glikozydowe 2'-metyloflawanonu w pozycji C-6, C-4, natomiast ugrupowanie 2'-metylowe pozostało nienaruszone. Biotransformacja 2'-metyloflawanonu przez szczep *I. fumosorosea* KCH J2 pozwoliła na uzyskanie kolejnych dwóch produktów. Pierwszy produkt podlegał glikozylacji przy C-3'. Drugim był glikozylowany produkt rozszczepienia pierścienia C szkieletu flawanonu. Ponadto 2'-metyloflawon był skutecznie biotransformowany do trzech glikozydów z ugrupowaniem 4''-O-metyloglikozydowym przyłączonym do pozycji C-3', C-4' i C-5'.

W publikacji “*Glycosylation of methylflavonoids in the cultures of entomopathogenic filamentous fungi as a tool for obtaining new biologically active compounds*” opisano biotransformacje 2'-hydroksy-4-metylochalkonu oraz jego flawonowego analogu – 4'-metyloflawonu. Szczep *I. fumosorosea* KCH J2 transformował 2'-hydroksy-4-metylochalkon do dwóch produktów glikozylacji i redukcji. Biotransformacja z udziałem *B. bassiana* KCH J1.5 spowodowała powstanie jednego produktu glikozylacji. Symulacje przeprowadzone





z wykorzystaniem platformy SwissADME wykazały, że otrzymane pochodne glikozydowe odznaczały się zwiększoną rozpuszczalnością w wodzie. Natomiast symulacje z wykorzystaniem narzędzi informatycznych Way2Drug Pass Online wskazywały na ich przeciwdrobnoustrojowe, antynowotworowe, chemoprewencyjne i hepatoprotekcyjne właściwości.

W publikacji “4'-methylflavanone glycosides obtained using iotransformation in the entomopathogenic filamentous fungi cultures as potential anticarcinogenic, antimicrobial, and hepatoprotective agents” przedstawiono rezultaty biotransformacji 4'-metyloflawanonu. Szczep *I. fumosorosea* KCHJ2 hydroksylował 4'-metyloflawanon w pozycji C-4'-CH₃ oraz redukował grupę karbonylową w pozycji C-4. W mieszaninie poreakcyjnej obserwowano produkt utleniania grupy hydroksylowej w pozycji C-4'-CH₃. Główny produkt biotransformacji był 4''-O-metyloglikozylowany w pozycji C-4'-CH₃. Szczep *B. bassiana* KCH J1.5 glikozylował 4'-metyloflawanon w pozycji C-4'-CH₃. Z kolei szczep *I. farinosa* KCH J2.1 utworzył dwa glikozydowe produkty, tj. 4'-metyleno-O-β-D-(4''-O-metylo)-glukopiranozyd flawanonu oraz 4'-hydroksymetyloflawanon 4-O-β-D-(4''-O-metylo)-glukopiranozyd. Trzy z otrzymanych produktów biotransformacji nie zostały wcześniej opisane w literaturze, a symulacje Swiss-ADME potwierdziły ich zwiększoną rozpuszczalność w wodzie i wysoką wchłanianość z przewodu pokarmowego. Analizy z wykorzystaniem narzędzi informatycznych do przewidywania aktywności biologicznej wykazały, że otrzymane flawonoidy wykazują ogromny potencjał jako środki przeciwnowotworowe, hepatoprotekcyjne, przeciwdrobnoustrojowe i chemoprewencyjne.

Uzyskane przez mgr A. Krawczyk-Łebek wyniki są niezwykle obiecujące, o dużym znaczeniu praktycznym. Oceniając prezentowany cykl prac chciałabym podkreślić, iż istotnym elementem każdej z nich jest dyskusja wyników, która daje jasny pogląd na teoretyczne i praktyczne znaczenie prowadzonych badań nad biotransformacją i potencjalnym zastosowaniem uzyskanych produktów, pożądanym, ze względu na swoje właściwości biologiczne, zarówno przez przemysł spożywczy, jak i farmaceutyczny.

Po analizie całego zestawu pięciu prac mogę stwierdzić, że powstał on z przemyślanego programu badawczego, a przyjęte założenia dla poszczególnych badanych zagadnień zostały właściwie zweryfikowane i wyjaśnione. Podjęcie przez Doktorantkę tak szerokiego zakresu badań zasługuje na pochwałę, bowiem świadczy o Jej dużej dociekliwości. Zaskakuje jedynie fakt, iż doktorantka nie podjęła żadnej próby eksperymentalnej weryfikacji, uzyskanych w wyniku symulacji komputerowych, przewidywanych właściwości biologicznych zsyntetyzowanych związków. Dla przykładu wiele z pośród uzyskanych produktów powinno wykazywać właściwości przeciwdrobnoustrojowe, co można łatwo zweryfikować np. testem dyfuzyjno-krażkowym. Właściwości hamujące aktywność enzymatyczną otrzymanych produktów można weryfikować w badaniach kinetycznych.

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe Doktorantki w zakresie realizowanego kierunku badań uznaję następujące dokonania:





- ✓ Wyselekcjonowanie odpowiednich szczepów entomopatogennych grzybów strzępkowych do procesów biotransformacji i opracowanie taniej i prostej metody pozyskiwania nowych produktów.
- ✓ Wykazanie, iż pozycja podstawnika metylowego w strukturze związku flawonoidowego wpływa na regioselektywność i wydajność procesu biotransformacji.
- ✓ Uzyskanie 29, nieopisanych do tej pory, pochodnych flawonoidowych (2 glikozydy chalkonów, 7 glikozydów dihydrochalkonów, 14 glikozydów flawanonów, 1 pochodna glikozydowa kwasu benzoowego i 5 glikozydów flawonów).
- ✓ Przeprowadzenie symulacji komputerowych w oparciu o struktury otrzymanych związków mających na celu identyfikację ich właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznych oraz wskazanie ich potencjalnych aktywności przeciwdrobnoustrojowych, antynowotworowych, hepatoprotekcyjnych, chemoprewencyjnych i kardioprotekcyjnych.
- ✓ Identyfikacja nietypowej reakcji redukcji grupy karbonylowej przy C-4 do grupy hydroksylowej, przeprowadzana z udziałem szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2.

Mam jednak pytania do doktorantki :

- ✓ Jakie doktorantka widzi zalety i wady stosowania kultur grzybowych zamiast oczyszczonych enzymów- czy daje to technologiczną przewagę?
- ✓ Czy doktorantka rozważała/rozważa wykorzystanie w biotransformacji czystych enzymów, lub w razie konieczności sekwencji enzymów, tak aby otrzymany produkt był jednorodny i nie wymagał oczyszczania? I jak doktorantka ocenia możliwość zastosowania takiego rozwiązania?
- ✓ Informacja o aktywnościach enzymów zaangażowanych w procesy biotransformacji umożliwiłaby doktorantce szerszą dyskusję tego zagadnienia. Czy doktorantka planuje identyfikację aktywności enzymatycznych odpowiedzialnych za opisane procesy biotransformacji.
- ✓ W pracy doktorantka wykonała symulacje komputerowe w celu predykcji aktywności biologicznej. Czy doktorantka ma w planach przeprowadzenie testów bezpośrednich w celu określenia wpływu otrzymanych związków na wybrane organizmy modelowe?
- ✓ Ze względu na duży potencjał aplikacyjny otrzymanych związków czy doktorantka nawiązała już kontakt z podmiotami gospodarczymi zainteresowanymi takimi produktami?

Przytoczone przeze mnie pytania nie wynikają z negatywnej oceny tych elementów pracy, a tylko są sugestiami do rozważenia w dalszych badaniach i wynikają z naukowego zainteresowania wynikami uzyskanymi przez doktorantkę.

Podsumowując, stwierdzam, że oceniana przeze mnie praca jest solidnie wykonaną, interesującą, nie tylko ze względu na problem badawczy, ale również na otrzymane wyniki o dużym znaczeniu praktycznym (uzyskanie nowych produktów biotransformacji o potencjalnej aktywności biologicznej, większej stabilności i biodostępności) dysertacją. Struktura autoreferatu





i prac wchodzących w skład jest bez zarzutu, opracowanie metodyczne bardzo dobre, wyniki zestawione w pracach rozprawy i suplementach do nich w postaci tabel, oryginalnych widm, schematów przegrupowań nie budzą zastrzeżeń ani wątpliwości, terminologia właściwa, piśmiennictwo bogate.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest wartościowym opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Krawczyk-Łebek spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2020 r., poz. 85) i wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, w uznaniu wartościowych, oryginalnych wyników, które zostały opublikowane w specjalistycznych, międzynarodowych czasopismach naukowych, rekomenduję wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.


.....

dr hab. Danuta Wojcieszńska, prof. UŚ

