



Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

dr hab. inż. Barbara Gawdzik, prof. UJK
Instytut Chemii
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
ul. Uniwersytecka 7
25-406 Kielce
b.gawdzik@ujk.edu.pl

Kielce 25.10.2023

Ocena Pracy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Gach

pt. „Aktywność biologiczna ftalidów i ich metabolitów pochodzenia
mikrobiologicznego”

Podstawę opracowania stanowi decyzja Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu podjęta na posiedzeniu w dniu 1 września 2023 roku, odnośnie powierzenia mi funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Gach pt. „Aktywność biologiczna ftalidów i ich metabolitów pochodzenia mikrobiologicznego”.

W nurt aktualnych badań nad poszukiwaniem nowych regio- i stereoselektywnych strategii syntezy związków biologicznie aktywnych i ich modyfikacji strukturalnych z zastosowaniem mikroorganizmów jako biokatalizatorów, wpisuje się przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Joanny Gach wykonana pod kierunkiem Profesor Teresy Olejniczak oraz Doktora Stefano Serra jako promotora pomocniczego.

Aktualność tematyki badań, podjętych przez Doktorantkę, nad biotransformacjami laktonów ftalidowych, ich aktywnością przeciwdrobnoustrojową i mechanizmem działania oraz aktywnością biologiczną metabolitów ftalidowych, wynika przede wszystkim z uwagi na fakt wciąż rosnącej lekooporności mikroorganizmów. Pragnę podkreślić, że podjęcie tego typu badań jest ze wszech miar

godne pochwały, tak ze względu na obszar badawczy, jak i na przygotowanie merytoryczne Zespołu, w którym były prowadzone.

We wprowadzeniu zredagowanym na podstawie 47 pozycji literaturowych, Autorka przedstawiła właściwości farmakologiczne 3-*n*-butyloftalidu i fungistatyczne ftalidów. Odnosząc się do zastosowania związków bioaktywnych, jako farmaceutyków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, omówiła standardowe badania metabolizmu, który pełni istotną rolę w określeniu farmakokinetyki i farmakodynamiki oraz profilu bezpieczeństwa potencjalnych leków. Natomiast mój niedosyt budzi zbyt lakoniczne potraktowanie tak interesującego tematu jakim jest szerokie spektrum aktywności biologicznej laktonów ftalidowych.

W kolejnym rozdziale dysertacji zostały jasno sprecyzowane szczegółowe cele pracy, takie jak:

- biotransformacja syntetycznych laktonów ftalidowych 3-*n*-butyloftalidu i jego nienasyconego analogu 3-*n*-butylidenoftalidu do metabolitów powstających odpowiednio w organizmach człowieka i szczura,
- zbadanie właściwości fungistatycznych pochodnych ftalidowych wobec grzybów strzępkowych *Rhodotorula mucilaginosa* oraz *Candida albicans*,
- zbadanie właściwości przeciwdepresyjnych otrzymanych w wyniku biotransformacji produktów.

Przed prezentacją opublikowanych w trzech pracach naukowych wyników badań nad biotransformacjami i aktywnością biologiczną laktonów ftalidowych i ich metabolitów pochodzenia mikrobiologicznego, Pani mgr inż. Joanna Gach w rozdziale zatytułowanym „Materiały i metody” zamieściła opis metodologii przeprowadzonych biotransformacji z udziałem wybranych szczepów: bakterii, drożdży i grzybów strzępkowych. W rozdziale tym zostały wymienione również metody, które Autorka dysertacji zastosowała w celu określenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej, efektu synergistycznego, aktywności przeciwdepresyjnej i parametrów farmakokinetycznych tytułowych pochodnych ftalidowych.

W kolejnym rozdziale „Wyniki i dyskusje” Doktorantka prezentuje swoje dokonania uzyskane w trakcie realizacji celów pracy doktorskiej. Przeprowadzone badania można podzielić na trzy obszary tematyczne:

- biotransformacje 3-*n*-butylidenoftalidu (1) z udziałem całych komórek grzybów strzępkowych do 3-*n*-butylo-3-hydroksyftalidu (3)
- aktywność fungistatyczna i inhibująca enzym monoaminooksydazę A ftalidowych laktonów
- predykcje bioinformatyczne parametrów farmakokinetycznych- lipofilowości i toksyczności pochodnych ftalidowych.

Opisane w tej części dysertacji badania charakteryzują się głęboko przemyślaną strategią postępowania. Przeprowadzone w pierwszym etapie badania przesiewowe, w których Doktorantka wykorzystała wybrane szczepy bakterii, drożdży i grzybów strzępkowych, pozwoliły na wyselekcjonowanie trzech biokatalizatorów: *Absidia cylindrospora* AM336, *Aspergillus candidus* AM386, *Chaetomium indicum* AM158, charakteryzujących się najwyższym stopniem konwersji 3-*n*-butylidenoftalidu (1) do 3-*n*-butylo-3-hydroksyftalidu (3). Następnie w celu potwierdzenia struktury 3-*n*-butylo-3-hydroksyftalidu (3) standardowymi metodami spektroskopowymi, biotransformacje prowadziła w zwiększonej skali przy zastosowaniu najskuteczniej biotransformujących szczepów grzybów strzępkowych. Ponadto Autorka dysertacji doktorskiej zaproponowała mechanizm procesu biotransformacji, której produkt 3-*n*-butylo-3-hydroksyftalidu (3) tworzy się w wyniku addycji cząsteczki wody do wiązania podwójnego 3-*n*-butylidenoftalidu (1). Analogiczne badania przesiewowe potwierdziły najwyższą efektywność biotransformacji 3-*n*-butyloftalidu (2) w przypadku czterech szczepów grzybów strzępkowych: *Penicillium dierckxii* AM32, *Penicillium* sp. AM91, *Botrytis cinerea* AM235, *Botrytis* sp. KKP3292. Na ich podstawie Doktorantka sformułowała wniosek, że głównym metabolitem 3-*n*-butyloftalidu (2) powstającym w organizmie człowieka, zgodnie z doniesieniami literaturowymi, jest 3-*n*-butylo-10-hydroksyftalid (4), jednak podkreśla na stronie 27, że ten produkt biotransformacji otrzymywała jako mieszaninę dwóch diastereoizomerów, co nie zostało opisane w publikacjach naukowych.

Dalsza część badań dotyczyła określenia bioaktywności tytułowych ftalidów i ich metabolitów. Aktywność inhibującą wzrost drożdży trzech szczepów *Candida albicans* 636/20, 595/20 i 38 oraz szczepu referencyjnego ATTC 90028 zbadano dla 3-*n*-butylidenoftalidu (**1**), 3-*n*-butyloftalidu (**2**), 3-*n*-butylo-3-hydroksyftalidu (**3**) i 3-*n*-butylo-3-metoksyftalidu (**7**). Zbadano siedem laktononowych ftalidów: 3-*n*-butylidenoftalidu (**1**), 3-*n*-butyloftalidu (**2**), 3-*n*-propylidenoftalidu (**8**), 3-*n*-propyloftalidu (**9**), 3-*n*-butylo-4,5,6,7-tetrahydroftalidu (**10**), 3-*n*-butylo-heksahydroftalidu (**11**) i 3-*n*-butylo-1,2,4,6-tetrahydroftalidu (**12**) w badaniach przesiewowych wobec szczepu drożdży *Rhodotorula mucilaginosa* IHEM 18459. W przypadku najskuteczniejszego fungistatyku 3-*n*-butylidenoftalidu (**1**) przetestowała jego wpływ na zawartość suchej biomasy drożdży przy zastosowaniu dwóch dawek inokulum o stężeniach 0,5 i 10%, a także przy zastosowaniu podłoża płynnego Sabouraud i matryc spożywczych.

Oczywistą konsekwencją uzyskanych rezultatów, potwierdzających aktywność fungistatyczną 3-*n*-butylidenoftalidu (**1**), było postawienie sobie przez Doktorantkę kolejnego celu, a mianowicie wyjaśnienie mechanizmu tej bioaktywności. Mechanizm efektu fungistatycznego 3-*n*-butylidenoftalidu (**1**) został zbadany poprzez analizę: profilu i składu kwasów tłuszczowych oraz zawartości ergosterolu, poziomu stresu oksydacyjnego, a także profilu karotenoidów w suchej biomacie drożdży *Rhodotorula mucilaginosa* IHEM 18459. Ponadto został potwierdzony synergistyczny efekt fungistatycznego działania 3-*n*-butylidenoftalidu (**1**) i standardowo stosowanego fungistatyku – flukonazolu.

Aktywność antydepresyjną 3-*n*-butyloftalidu (**2**) i jego metabolitów **4-6** Autorka pracy doktorskiej zbadano przeprowadzając testy na inhibicję monoaminooksydazy A.

Trzeci a zarazem ostatni obszar badań przedstawiony w recenzowanej dysertacji doktorskiej dotyczy profilowania parametrów farmakokinetycznych lipofilowości i toksyczności: tak dla 3-*n*-butylidenoftalidu (**1**) i 3-*n*-butyloftalidu (**2**), jak i dla ich metabolitów i poszukiwania korelacji pomiędzy lipofilowością a bioaktywnością.

Autorka w swojej liczącej 57 stron pracy zamieściła rozdział, w którym dokonała podsumowania przeprowadzonych badań oraz sformułowała wnioski.

W zestawieniu literaturowym znalazł się wykaz 77 publikacji z lat 2001-2023, które cytowała w tekście pracy doktorskiej. Do każdej z trzech publikacji, które stały

się kanwą dysertacji przedstawiła oświadczenia, precyzujące zakres zadań, których realizacja stanowiła niezaprzeczany wkład Autorki w ich powstanie, dodatkowo potwierdzony przez Promotorkę Panią Profesor Teresę Olejniczak.

Dla mnie jako recenzenta istotne uzupełnienie tematyki badawczej i prowadzonych we współpracy z innymi ośrodkami prac naukowo-badawczych, w których Pani mgr inż. Joanna Gach brała udział, stanowi zamieszczony i zasługujący na wyróżnienie wykaz dorobku naukowego, na który składa się: sześć publikacji, sześć patentów, cztery zgłoszenia patentowe, dwie monografie, siedemnaście wystąpień ustnych i prezentacji posterowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, udział w dwóch projektach badawczych oraz staż na Politecnico di Milano we Włoszech.

Całość pracy doktorskiej spina streszczenie w języku polskim i angielskim, zatem przedstawiona do recenzji dokumentacja jest kompletna, a jej układ podoba mi się i nie budzi moich zastrzeżeń. Zwłaszcza, że tekst pracy napisany jest jasnym i poprawnym językiem.

Przechodząc do uwag, które wynikają z powierzonej mi roli recenzenta pragnę zwrócić uwagę że:

- na Rysunku 4 (strona 17) i tekście (strona 16) wymienione zostały ftalidy **1-2** i **9-12**, jednak struktury tych pochodnych czytelnik znajdzie dopiero na stronie 22,
- zabrakło informacji czy, a jeśli nie, to z jakich powodów inne metabolity niż te, o których mowa w tabeli 1 były badane odpowiednio wobec szczepów *Candida albicans* 636/20, 595/20 i 38 oraz szczepu referencyjnego ATTC 90028. *Per analogiam* nie znalazłam uzasadnienia dlaczego przeprowadzono testy na aktywność wobec szczepu drożdży *Rhodotorula mucilaginosa* IHEM 18459 tylko dla siedmiu pochodnych ftalidowych, co potwierdzają dane w tabeli 2,
- za niewyjaśnione uważam kryteria wyboru mikroorganizmów, jako biokatalizatorów, które zostały zastosowane w procesach biotransformacji 3-*n*-butylidenoftalidu (**1**) i 3-*n*-butyloftalidu (**2**).

Dokonując oceny wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że do najważniejszych, w mojej opinii, osiągnięć naukowych Pani mgr inż. Joanna Gach zaliczam:

- wyselekcjonowanie biokatalizatorów - grzybów strzępkowych i zastosowanie ich w procesie biotransformacji do otrzymania metabolitów 3-*n*-butylidenoftalidu (1), powstających w organizmie szczurów i metabolitów 3-*n*-butyloftalidu (2), powstających w organizmie człowieka,
- wyselekcjonowanie, w wyniku przeprowadzonych testów na aktywność fungistatyczną: 3-*n*-butylidenoftalidu (1) i 3-*n*-butyloftalidu (2), skutecznych inhibitorów wzrostu drożdży z rodzaju *Candidia albicans* oraz *Rhodotorula micilaginosa*, zwłaszcza w stosunku do szczepów klinicznie opornych na działanie flukonazolu, powszechnie stosownego fungistatyku, a tym samym zaproponowanie zastosowania 3-*n*-butylidenoftalidu (1) jako alternatywy w leczeniu zakażeń o etiologii grzybiczej oraz skutecznego środka konserwującego żywność,
- zaproponowanie mechanizmu fungistycznego działania 3-*n*-butylidenoftalidu (1) oraz potwierdzenie jego synergicznego efektu,
- zbadanie i potwierdzenie wysokiej aktywności inhibującej monoaminoooksydazę A dla 3-*n*-butylo-11-hydroksyftalidu (5), co daje szansę na zastosowanie go jako farmaceutyku o działaniu przeciwdepresyjnym.

Analizując cele sprecyzowane przez Promotorkę i Doktorantkę oraz założone kierunki badań nie mam żadnych wątpliwości, że tematyka badań prowadzonych w ramach dysertacji doktorskiej jest ważna i ciekawa, a uzyskane wyniki niezaprzeczalnie mają wartość poznawczą i aplikacyjną dla obszaru biotechnologii.

Natomiast bogaty materiał eksperymentalny zaprezentowany w sposób przejrzysty z wykorzystaniem tabel, schematów, wykresów i widm ^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HSQC, HMBC, HR-ESI-MS/MS świadczy nie tylko o dużym nakładzie pracy, jaki Doktorantka włożyła w realizację założonych celów, ale również o jej naukowej dojrzałości.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji dysertacja autorstwa Pani mgr inż. Joanny Gach zatytułowana: „Aktywność biologiczna ftalidów i ich metabolitów pochodzenia mikrobiologicznego” w nadmiarze spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określonym w § 5 oraz § 8 ust. 4 i 5 „Trybu postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora” wprowadzonego uchwałą nr 31/2023 Senatu Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 26 maja 2023 roku w sprawie wprowadzenia trybu postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora oraz ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023. poz. 742 ze zm.). W związku z powyższym z całym przekonaniem, przedstawiam Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Gach do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej. Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej, wnoszącej znaczący wkład nie tylko do rozwoju biokatalizy i biotechnologii, ale również w rozwiązywanie problemów farmakologicznych, wnioskuję do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o jej wyróżnienie.

Phabane Gpuskiri