

imię i nazwisko autora pracy: **Joanna Gach**

tytuł pracy: **Aktywność biologiczna ftalidów i ich metabolitów pochodzenia mikrobiologicznego**

dziedzina nauki: **Dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych**

dyscyplina: **Biotechnologia**

data sporządzenia streszczenia: **15.08.2023**

słowa kluczowe: **Laktony ftalidowe, Apiaceae, fungistatyki, bioaktywność, lipofilość, metabolizm, grzyby strzępkowe**

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Ftalidy to bioaktywne laktony, kształtujące zapach roślin selerowatych. Działanie farmakologiczne jednego ze związków z tej grupy, 3-*n*-butyloftalidu, obejmuje właściwości neuroprotektoryjne, znajdujące zastosowanie w terapii chorych po udarze niedokrwiennym mózgu. Oprócz tego w literaturze występują wzmianki o działaniu przeciwdepresyjnym tego ftalidu. Inną aktywnością, ważną w obliczu rosnącej oporności mikroorganizmów na leki, jest zdolność do inhibicji wzrostu mikroorganizmów.

Mimo wielu doniesień literaturowych na temat bioaktywności ftalidów, działanie ich metabolitów pozostaje niezbadane. Otrzymanie tych pochodnych w warunkach *in vivo* jest trudne do realizacji, z uwagi na ich relatywnie małą zawartość. Rozwiązaniem, zapewniającym otrzymanie związków w ilościach umożliwiającym przeprowadzenie testów biologicznych, jest użycie całych komórek grzybów strzępkowych jako biokatalizatorów w transformacjach ftalidów.

W badaniach opisanych w niniejszej rozprawie, wykorzystano mikroorganizmy do otrzymania związków o strukturach identycznych jak metabolity 3-*n*-butylidenoftalidu oraz 3-*n*-butyloftalidu. Zastosowanie grzybów *Absidia cylindrospora* AM336, *Aspergillus candidus* AM386, *Chaetomium indicum* AM158 skutkowało otrzymaniem 3-*n*-butylo-3-hydroksyftalidu, metabolitu 3-*n*-butylidenoftalidu powstającego w organizmie szczurów. Prawdopodobny mechanizm tej biotransformacji opierał się na przyłączeniu cząsteczki wody z użyciem hydratazy. Użycie *Penicillium dierckxii* AM32, *Penicillium* sp. AM91, *Botrytis cinerea* AM235, *Botrytis* sp. KKP3292 do przekształceń 3-*n*-butyloftalidu umożliwiło uzyskanie

metabolitów powstających u człowieka - 3-*n*-butylo-10-hydroksyftalidu, 3-*n*-butylo-11-hydroksyftalidu i kwasu 3-*n*-butyloftalid-11-owego.

Oba ftalidy, 3-*n*-butylidenoftalid jak i jego nasycony analog, 3-*n*-butyloftalid, okazały się skutecznymi inhibitorami wzrostu *Candida albicans*, co ważne, w tym szczepu klinicznego opornego na działanie flukonazolu. Tymczasem bardziej polarny metabolit 3-*n*-butylidenoftalidu, 3-*n*-butylo-3-hydroksyftalid, wykazał znikomą inhibicję wzrostu drożdży z rodzaju *Candida*. Doszło więc do procesu detoksykacji na drodze biotransformacji. Co ciekawe, zablokowanie grupy hydroksylowej nie zmieniło znacząco aktywności fungistatycznej.

Zarówno 3-*n*-butyloftalid jak i jego metabolity wykazały wysoką skuteczność jako inhibitory monoaminooksydazy A (MAO-A), enzymu powodującego degradację prekursora serotoniny. Metabolit ftalidu, 3-*n*-butylo-11-hydroksyftalid, wykazał najwyższą aktywność inhibującą. Tym razem, podczas metabolizmu doszło do procesu bioaktywacji, co jest częstym zjawiskiem w przypadku I fazy biotransformacji. Ftalidy mają szansę stać się alternatywą dla komercyjnie dostępnych inhibitorów MAO-A w leczeniu depresji. Badania *in silico* wykazały większą toksyczność metabolitów niż prekursora, wciąż jednak nie przekraczała ona 2 g/kg masy ciała szczura. Konieczne są dalsze testy laboratoryjne by potwierdzić dane z predykcji komputerowych.

W pracy przebadano również siedem laktonów ftalidowych wobec drożdży *Rhodotorula mucilaginosa* IHEM18459, powodujących zarówno zakażenia grzybicze, jak i będących przyczyną mikrobiologicznego psucia się żywności. Sześć związków charakteryzowało się dobrym działaniem fungistatycznym, w przeciwieństwie do flukonazolu, wobec którego drożdże wykazały oporność. Najsilniejszym fungistatykiem okazał się 3-*n*-butylidenoftalid z wartością IC₅₀ równą 13 µg/mL. Wykonano dalsze eksperymenty z użyciem tego ftalidu. Wykazały one, że ilość suchej biomasy drożdży malała wraz ze wzrostem stężenia związku dodawanego do hodowli, ergosterol pozostawał na poziomie porównywalnym z próbą kontrolną, zwiększały się proporcje nienasyconych kwasów tłuszczowych, wzrosła zawartość reaktywnych form tlenu oraz zmienił się profil karotenoidów w próbkach poddanych działaniu związku.

Analizując wyniki można stwierdzić fakt istnienia innego mechanizmu efektu fungistatycznego ftalidu, niż ten, występujący w przypadku flukonazolu. Świadczą o tym: wzrost stresu oksydacyjnego, indukcja produkcji bezbarwnego prekursora karotenoidów

o działaniu przeciwzapalnym, a także fakt wykazania efektu synergistycznego wraz z flukonazolem. Przepuszczalnie, 3-*n*-butylidenoftalid oprócz wpływu na zawartość reaktywnych form tlenu, zahamował wpływ fungistatyku z komórki.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Phthalides are bioactive lactones that affects the aroma of celery plants. The pharmacological effects of one of the compounds of this group, 3-*n*-butylphthalide, include neuroprotective properties, which find application in the treatment of patients after ischemic stroke. In addition, there are reports on the antidepressant effect of this phthalide in the literature. Another activity, important in the face of increasing drug resistance of microorganisms, is the inhibition of microbial growth.

Despite many literature reports on the bioactivity of phthalides, the effects of their metabolites remain unexplored. Preparation of these derivatives *in vivo* is difficult to carry out, due to their relatively low content. An approach that ensures the compounds are obtained in quantities sufficient for biological assays involves the use of whole cells of filamentous fungi.

In the research described in this dissertation, microorganisms were used to obtain compounds with structures identical to the metabolites of 3-*n*-butylidene-phthalide and 3-*n*-butylphthalide. The use of the fungi *Absidia cylindrospora* AM336, *Aspergillus candidus* AM386, and *Chaetomium indicum* AM158 resulted in the production of 3-*n*-butyl-3-hydroxyphthalide, a metabolite of 3-*n*-butylphthalide formed in the rat organism. The probable mechanism of this biotransformation was based on the water molecule addition using hydratase. The use of *Penicillium dierckxii* AM32, *Penicillium* sp. AM91, *Botrytis cinerea* AM235, *Botrytis* sp. KKP3292 to transform 3-*n*-butylphthalide allowed the production of metabolites formed in human - 3-*n*-butyl-10-hydroxyphthalide, 3-*n*-butyl-11-hydroxyphthalide and 3-*n*-butylphthalide-11-oic acid.

Both phthalides, 3-*n*-butylidene-phthalide as well as its saturated analog, 3-*n*-butylphthalide, proved to be effective inhibitors of *Candida albicans*, notably including the fluconazole-resistant clinical strain. Meanwhile, the polar metabolite of 3-*n*-butylidene-phthalide, 3-*n*-butyl-3-hydroxyphthalide, showed negligible inhibition of *Candida* yeast growth. Thus, a detoxification process occurred.

Both 3-*n*-butylphthalide and its metabolites showed high efficacy as an inhibitor of monoamine oxidase A (MAO-A), the enzyme that causes degradation of the precursor of the serotonin. The metabolite of phthalide, 3-*n*-butyl-11-hydroxyphthalide, showed the greatest inhibitory effect. This time, a bioactivation process occurred during the metabolism, which is a common phenomenon for phase I biotransformation. Phthalides have the potential to become an alternative to commercially available MAO-A inhibitors in the treatment of depression.

In silico studies showed greater toxicity of the metabolites than of the precursor, but it still did not exceed 2g/kg of rat body weight. Further laboratory tests are required to confirm the computer prediction data.

In this work, seven phthalide lactones were also tested against the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* IHEM18459, causing both fungal infections and being the reason for microbial spoilage of food. The six compounds showed good fungistatic activity, in contrast to fluconazole, towards which the yeast showed resistance. The most potent fungistatic was 3-*n*-butylidenephthalide with an IC₅₀ value of 13 µg/mL. Further experiments were carried out using this phthalide. These demonstrated that the amount of dry yeast biomass decreased as the concentration of the compound increased, ergosterol remained at a level comparable with the control sample, the proportion of unsaturated fatty acids increased, as well as the content of reactive oxygen species, and the profile of carotenoids in the samples treated with the compound changed.

Analyzing the results, it is possible to conclude that there is a different mechanism of the fungistatic effect of phthalide than that occurring with fluconazole. This is evidenced by the increase in oxidative stress, the induction of the production of a colorless carotenoid precursor with anti-inflammatory activity, as well as the fact that a synergistic effect was demonstrated in conjunction with fluconazole. Presumably, 3-*n*-butylidenephthalide, in addition to its effect on the content of reactive oxygen species, inhibited the efflux of fungistatic from the cell.