

Prof. UP dr hab. Daria Szymanowska-Powałowska
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Poznań, dnia 5 lipca 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Krawczyk-Łebek pt. Synteza i biotransformacje flawonoidów z grupą metylową wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Edyty Kostrzewy-Susłow i promotora pomocniczego dr inż. Moniki Dymarskiej.

Wprowadzenie

Flawonoidy stanowią bardzo liczną grupę fenolowych metabolitów wtórnych. Występują u zarodnikowych, naczyniowych, a także u glonów i mszaków. Flawonoidy obecne są m.in. w liściach i kwiatach najczęściej jako żółte barwniki, nieco rzadziej w owocach, korze, drewnie, niekiedy w nasionach. Niektóre krystalizują w komórkach epidermy, np. hesperydyna w owocni pomarańczy gorzkiej. Obecnie poznanych jest ponad 6000 różnych flawonoidów i liczba ta stale rośnie. Wyszczególniamy wśród nich m.in. flawany, izoflawany, flawonole, flawony, izoflawony, dihydroflawonole, flawanony, antocyjanidyny, chalkony. Flawonoidy klasyfikujemy na podstawie różnic w budowie, które mogą dotyczyć np. – liczby i lokalizacji grup hydroksylowych i metoksyłowych w pierścieniach; – rodzaju wiązania glikozydowego (C- lub O-glikozydowe wiązanie); – liczby przyłączonych cząsteczek cukrów (najczęściej glukozy, galaktozy i arabinozy w liczbie od 1 do 5); – rozmiaru cząsteczek; – obecności grup sulfonowych na cukrach lub aglikonach. Związki flawonoidowe mogą także występować w formie dimerycznej – dwukrotnie powtórzonej podstawowej struktury piętnastowęglowej lub oligomerycznej. Flawonoidy wykazują zróżnicowane działanie farmakologiczne na organizm ludzki. Do najbardziej znaczących należą właściwości antyoksydacyjne – warunkujące efekt kardioprotekcyjny, naczynioochronny, a także zapobiegający powstawaniu nowotworów oraz przeciwzapalny. Flawonoidy działają anksjolitycznie oraz uspokajająco na centralny układ

nerwowy. Wykazują protekcyjny wpływ na wątrobę oraz pełnią funkcję fitoestrogenów. Szczególnie dużo wiadomo o właściwościach przeciwrakowych genisteiny czy daidzeiny, izoflawonoidów pochodzących z soi. Stwierdzono, że w krajach gdzie spożycie roślin motylkowatych, w tym soi, jest wysokie ludzie rzadziej zapadają na choroby nowotworowe, tyczy się to głównie raka piersi i prostaty. Na antynowotworowe właściwości tych izoflawonoidów składa się m.in. hamowanie angiogenezy i proliferacji komórek.

Recenzja pracy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma postać spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. Taką formę rozprawy dopuszcza znowelizowana Ustawa z 14 marca 20103 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

PRACA 1 Krawczyk-Łebek A.*, Dymarska M., Janeczko. T, Kostrzewa-Susłow E.*, 2020, Entomopathogenic Filamentous Fungi as Biocatalysts in Glycosylation of Methylflavonoids, Catalysts, 10, 1148; doi.org/10.3390/catal10101148. Udział procentowy: 60% (IF = 3,520; MNiSW = 100)

PRACA 2 Krawczyk-Łebek A.*, Dymarska M., Janeczko. T, Kostrzewa-Susłow E.*, 2021, New Glycosylated Dihydrochalcones Obtained by Biotransformation of 2'-Hydroxy-2-methylchalcone in Cultures of Entomopathogenic Filamentous Fungi, International Journal of Molecular Sciences, 22, 9619; doi.org/10.3390/ijms22179619. Udział procentowy: 60% (IF = 5,923; MNiSW = 140)

PRACA 3 Krawczyk-Łebek A.*, Dymarska M., Janeczko. T, Kostrzewa-Susłow E.*, 2021, Fungal Biotransformation of 2'-Methylflavanone and 2'-Methylflavone as a Method to Obtain Glycosylated Derivatives, International Journal of Molecular Sciences, 22, 9617; doi:10.3390/ijms22179617. Udział procentowy: 60% (IF = 5,923; MNiSW = 140)

PRACA 4 Krawczyk-Łebek A.*, Dymarska M., Janeczko. T, Kostrzewa-Susłow E.*, 2022, Glycosylation of Methylflavonoids in the Cultures of Entomopathogenic Filamentous Fungi as a Tool for Obtaining New Biologically Active Compounds, International Journal of Molecular Sciences, 23, 5558; doi.org/10.3390/ijms23105558. Udział procentowy: 70% (IF = 5,923; MNiSW = 140)

PRACA 5 Krawczyk-Łebek A.*, Dymarska M., Janeczko. T, Kostrzewa-Susłow E.*, 2022, 4'-Methylflavanone Glycosides Obtained Using Biotransformation in the Entomopathogenic

Filamentous Fungi Cultures as Potential Anticarcinogenic, Antimicrobial, and Hepatoprotective Agents, International Journal of Molecular Sciences, 23, 5373; doi.org/10.3390/ijms23105373. Udział procentowy: 70% (IF = 5,923; MNiSW = 140).

Całkowity współczynnik IF publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 27,212. Liczba punktów za publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej według listy czasopism punktowanych MNiSW wynosi 660, co już na wstępie wskazuje na wysoką wartość merytoryczną pracy. Warto zaznaczyć, że dołączone do rozprawy oświadczenia współautorów poszczególnych prac nie pozostawiają wątpliwości, że udział doktorantki w ich powstaniu był znaczący i kluczowy.

Praca doktorska została zaprezentowana w postaci postępujących po sobie rozdziałów:

1. Publikacje stanowiące pracę doktorską
2. Struktury związków uzyskanych w wyniku syntezy chemicznej i biotransformacji opisane w pracy doktorskiej
3. Streszczenie w języku polskim
4. Streszczenie w języku angielskim
5. Wstęp
6. Cel
7. Materiały i metody badań
8. Wyniki i dyskusja
9. Podsumowanie i wnioski
10. Literatura
11. Dorobek naukowy

Celem prezentowanej pracy była synteza wybranych aglikonów flawonoidowych z podstawnikiem metylowym (chalkonów, flawanonów i flawonów), a następnie uzyskanie ich pochodnych glikozydowych z wykorzystaniem całych komórek mikroorganizmów w procesie biotransformacji, a także określenie potencjalnych właściwości fizykochemicznych i aktywności wszystkich otrzymanych związków przy użyciu symulacji komputerowych. Na podstawie wstępnych badań w małej skali zostały wytypowane trzy najaktywniejsze szczepy entomopatogennych grzybów strzępkowych, tj. *Beauveria bassiana* KCH J1.5, *Isaria fumosorosea* KCH J2 i *Isaria farinosa* KCH J2.6. Zostały one użyte jako biokatalizatory w biotransformacjach prowadzonych w zwiększonej skali, których celem było wyizolowanie i określenie struktur produktów reakcji. Dzięki zastosowaniu cienkowarstwowej chromatografii

preparatywnej oczyściłam i rozdzieliłam otrzymane produkty, a następnie określiłam ich struktury chemiczne metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY HSQC, HMBC) i potwierdziłam ich masy molowe za pomocą spektroskopii masowej. W wyniku biotransformacji 8 substratów flawonoidowych (chalkonów, flawanonów i flawonów) z podstawnikiem metylowym otrzymałam 32 pochodne flawonoidowe spośród których 29 nie zostało wcześniej opisanych w literaturze (2 glikozydy chalkonów, 7 glikozydów dihydrochalkonów, 14 glikozydów flawanonów, 1 pochodna glikozydowa kwasu benzoowego, 5 glikozydów flawonów). Autorka wykazała, że badane szczepy mają zdolność przyłączania 4-O-metyloglukopiranozy do układu flawonoidowego i są zdolne do redukcji wiązania podwójnego chalkonów pomiędzy C- α a C- β prowadzącej do otrzymania dihydrochalkonów. Szczepy te prowadzą również reakcje hydroksylacji układu flawonoidowego oraz utlenienia podstawnika metylowego do grupy hydroksymetylowej. Pozycja podstawnika metylowego w strukturze związku flawonoidowego miała wpływ na regioselektywność i wydajność procesu biotransformacji. Symulacje komputerowe na podstawie struktur związków chemicznych wskazują, że otrzymane nowe pochodne 10 glikozydowe charakteryzują się poprawionymi właściwościami fizykochemicznymi i interesującymi aktywnościami biologicznymi, które wymagają dalszych badań w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Ten fragment pracy doktorskiej wzbudził w Recenzentce najwięcej pytań i tego zagadnienia naukowego dotyczą pytania, które kieruje do Doktorantki:

1. Czy znane jest przełożenie wyników prognozowania (*in vitro*) funkcjonalności zbadanych związków na stan w warunkach *in vivo*?
2. Proszę o wyjaśnienie na czym polega analiza przewidywania farmakokinetycznego i fizykochemicznego oraz potencjalnej aktywności biologicznej otrzymanych pochodnych flawonoidów przy wykorzystaniu programów SwissADME i Way2Drug Pass Online? Jaka jest opinia Doktorantki na temat modelowania właściwości funkcjonalnych związków na podstawie ich struktury chemicznej.
3. Jakiego winny być przeprowadzone kolejne etapy badań w warunkach *in vivo*, w celu potwierdzenia lub wykluczenia prognozowanych właściwości otrzymanych związków?
4. Ponadto Recenzentka jest ciekawa opinii Doktorantki na temat realnej biodostępności, w tym przenikalności przez barierę jelito-krew związków flawonoidowych spożytych wraz z dietą?

5. Proszę o wyjaśnienie wniosku nr 13 - Biotransformacje w kulturach wyselekcjonowanych szczepów entomopatogennych grzybów strzępkowych są tanią i prostą metodą pozyskiwania nowych pochodnych flawonoidowych, ze szczególnym zwróceniem uwagi na realne możliwości wdrożenia takiego procesu do warunków przemysłowych.

Na uwagę zasługuje dorobek naukowy doktorantki. Lektura tego rozdziału pokazuje, że Autorka rozprawy doktorskiej, mimo wczesnego etapu kariery naukowej, legitymuje się imponującym dorobkiem i doświadczeniem gromadzonym w trakcie krajowych i zagranicznych staży naukowych, jak również przy realizacji licznych projektów naukowych finansowanych z tzw. źródeł zewnętrznych. Lektura każdego z artykułów wchodzących w cykl prac stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora utwierdza mnie w przekonaniu, że Doktorantka nie tylko płynnie porusza się w szerokim spektrum technik analitycznych, ale posiada również umiejętność krytycznego spojrzenia na uzyskane wyniki i prowadzenia dojrzałej dyskusji. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski znajdują uzdatnienie w otrzymanych wynikach.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Krawczyk-Łebek z naddatkiem spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane tego typu pracom. Niewątpliwie stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, który sformułowany został w części rozprawy. Doktorantka dowiodła, że potrafi w pełni wykorzystać znajomość wielu technik analitycznych do zaprojektowania, wspólnie ze swym promotorem, oraz przeprowadzenia badań o istotnej wartości poznawczej i praktycznej. Upoważnia mnie to do przedstawienia wniosku o dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Krawczyk-Łebek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy zaprezentowanych wyników, fakt przyjęcia ich do druku w renomowanych czasopiśmie naukowych, jak również możliwości ich praktycznego wykorzystania, z pełnym przekonaniem wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem

Daria Szymanowska-Powałowska

