



UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Zakład Biotechnologii

15-089 Białystok, ul. Kilińskiego 1

Tel. (85) 748-57-01, FAX (85) 879-57-18

Anna.Bielawska@umb.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm. Anna Bielawska

Białystok, 10. 08. 2022

**Ocena pracy doktorskiej mgr Sandry Joanny Górskiej-Jakubowskiej pt.
"Badanie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną
selenowych polisacharydów pochodzenia grzybowego"**

Współczesna medycyna z powodzeniem wykorzystuje preparaty pochodzenia naturalnego o działaniu immunomodulującym, które mogą wpływać na reakcje biologiczne zachodzące w organizmie i wspomagać jego naturalne mechanizmy obronne. Wśród nich liczną grupę stanowią produkty pozyskiwane z grzybów, m.in. schizofylan, lentinan, polisacharyd Krestin (PSK) i polisacharydopeptyd (PSP).

Pomimo stale wzrastającego zainteresowania środowisk naukowych grzybami leczniczymi tylko około 20 gatunków jest w powszechnym użyciu klinicznym. W tej grupie znajdują się zarówno gatunki jadalne między innymi: *Grifola frondosa*, *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, *Tremella mesenterica* i *Hericium erinaceus*, jak i wybrane niejadalne przeznaczone wyłącznie do celów leczniczych, w tym *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune* lub *Trametes versicolor*. Związki bioaktywne charakterystyczne grzybów to przede wszystkim polisacharydy (np. β -glukany) i białka oraz metabolity wtórne, takie jak związki fenolowe, terpeny czy sterole.

Stężenie i skuteczność związków bioaktywnych zależą od rodzaju grzyba, podłoża, warunków owocowania, stadium rozwoju, warunków przechowywania, czy zastosowanej procedury przygotowania preparatu. Spośród związków biologicznie czynnych będących produktami metabolizmu grzybów istotną rolę odgrywają polisacharydy. W literaturze szeroko opisane są ich właściwości przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, immunomodulujące, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, hepatoprotekcyjne, etc. Zarówno w Japonii, jak i innych krajach azjatyckich stosuje się polisacharydy wspomagająco w leczeniu nowotworów, HIV i HCV.

Wiele związków selenu, szczególnie związki organiczne, wykazuje podobne działanie biologiczne do polisacharydów pochodzenia grzybowego, co niesie możliwość synergizmu obu komponentów. Stąd wbudowanie selenu do cząsteczek polisacharydów jest jedną z obecnie badanych metod modyfikacji struktury polisacharydów, która może prowadzić do istotnej zmiany ich aktywności biologicznej. Stosowane są zarówno metody chemiczne (np. estryfikacja kwasem selenowym(IV) polisacharydów izolowanych ze źródeł naturalnych), jak i metody biotechnologiczne.

W Katedrze Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego już od kilku lat prowadzone są intensywne badania wpływu inkorporacji selenu do polisacharydów pochodzenia grzybowego na ich aktywność immunomodulacyjną. W nurt tych badań zespołu Profesor Jadwigi Turło włącza się recenzowana praca doktorska mgr Sandry Joanny Górskiej-Jakubowskiej pt. "Badanie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną selenowych polisacharydów pochodzenia grzybowego".

Rozprawa doktorska obejmuje trzy publikacje naukowe opublikowane w roku 2021. Wszystkie prace tworzące wspólny tematycznie cykl, zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Obejmują one jedną pracę poglądową opublikowaną w Applied Sciences oraz dwie prace eksperymentalne, które ukazały się w czasopismach: International Journal of

Molecular Sciences i Molecules. Łączny współczynnik oddziaływania tych artykułów wynosi IF=13,015, (380 pkt. MEiN). Opublikowane prace mają charakter opracowań wieloautorskich. W dwóch pracach mgr Sandra Joanna Górską-Jakubowska jest pierwszym autorem. Dołączone do komentarza oświadczenia wskazują na dominujący udział Doktorantki w wykonaniu badań eksperymentalnych oraz w tworzeniu manuskryptów (25%-50%). Wyniki badań obejmujących rozprawę doktorską były prezentowane na pięciu konferencjach zagranicznych [K1-K5] oraz na jedenastu konferencjach krajowych [K6- K16]. Można wspomnieć, że Autorka rozprawy doktorskiej otrzymała nagrodę IIER Excellent Paper Award w kategorii „najlepsza prezentacja” podczas *International Conference on Natural Science and Environment*. w Atenach w roku 2019 [K3]. Tematyka wyróżnionej prezentacji: “Imunomodulative effect of rich selenium mushroom polysaccharides isolated from submerged cultivated mycelium” obejmowała wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej.

Dysertacja opatrzona jest 55 stronicowym komentarzem, który zawiera: Wstęp, Cel pracy, Wprowadzenie – przegląd piśmiennictwa, Część doświadczalna, Podsumowanie i Wnioski, Piśmiennictwo, Spis tabel, oraz Spis rycin. Na końcu manuskryptu Doktorantka umieściła wykaz pozostałych publikacji, oraz komunikatów zjazdowych, w których jest współautorem. Rozdział „Wprowadzenie – przegląd piśmiennictwa” jest napisany poprawnym językiem i jest oparty jest na 38 pozycjach literaturowych, właściwie dobranych i cytowanych.

Jako obiekt swoich badań Autorka wybrała gatunek grzyba o bardzo cennych właściwościach zarówno leczniczych jak i dietetycznych – *Lentinula edodes*. Grzyb ten należy do podstawczaków (*Basidiomycota*) i zaliczany jest do grupy ponad 260 gatunków grzybów zdolnych do biosyntezy związków o działaniu farmakologicznym. We wstępie dysertacji Doktorantka zwięźle przedstawia informacje naświetlające zakres tematyczny podjętych badań. Część teoretyczną rozprawy doktorskiej stanowi praca przeglądowa [P1] opublikowana

w roku 2021 w czasopiśmie *Applied Sciences*. Pracę przygotowano na podstawie przeglądu 392 najnowszych pozycji piśmiennictwa, co budzi uznanie i podziw recenzentki. Publikacja ta wybornie wprowadza czytelnika w tematykę badawczą.

Brak analiz porównawczych dotyczących Se-egzopolisacharydów izolowanych z podłoża hodowlanego kultur mycelialnych *L. edodes* zainspirował mgr Sandrę Górską do podjęcia badań nad biosyntezą, strukturą i aktywnością biologiczną tych związków w celu uzyskania preparatu a aktywności immunomodulacyjnej. Badania te opisane są w publikacji oznaczonej w rozprawie doktorskiej jako P2. Celem prowadzonych badań było określenie wpływu inkorporacji selenu do struktury egzopolisacharydów wydzielanych do pożywki hodowlanej przez grzybnię *L. edodes* na ich strukturę oraz aktywność biologiczną: immunomodulacyjną, cytotoksyczną oraz przeciwutleniającą. Kolejnym zadaniem badawczym było określenie różnic w strukturze i aktywności biologicznej pomiędzy Se-egzopolisacharydami a Se-polisacharydami wyizolowanymi z grzybni *L. edodes*. Wyniki badań potwierdziły, że zarówno grzybnia *L. edodes* jak i pożywka pohodowlana stanowią źródło biologicznie czynnych selenopolisacharydów o dużym zróżnicowaniu mas cząsteczkowych oraz o różnorodnej budowie. Autorka dysertacji wykazała, że selen może trwale wiązać się ze strukturą polisacharydów, wpływając na ich budowę przestrzenną oraz aktywność biologiczną. Publikacja P2 obejmuje zbadanie struktury pierwszorzędowej Se-egzopolisacharydów (frakcja Le-P-Se) oraz frakcji referencyjnej (frakcja Le-P-0) oraz frakcji L wyizolowanych z biomasy grzybni *L. edodes*. Na podstawie przeprowadzonych badań wyznaczono masę molową, skład monosacharydowy, typ oraz konformację wiązań glikozydowych, zawartość selenu, sposobu jego wiązania ze strukturą polimeru, otoczenie chemiczne atomu selenu oraz zbadano *in vitro* aktywność antyoksydacyjną, cytotoksyczną i immunomodulacyjną otrzymanych związków [P2]. W publikacji P2 porównano strukturę oraz aktywność biologiczną otrzymanych frakcji EPS wyizolowanych z podłoża pohodowlanego z analogicznymi frakcjami

wyzolowanymi z biomasy mycelium *L. edodes*: selenowanej frakcji Le-P-Se oraz frakcji referencyjnej Le-P-0 z selenowaną frakcją Se-L i frakcją referencyjną L. Frakcja Se-egzopolisacharydowa izolowana z podłoża pochodowlanego (Le-P-Se) okazała się być jednorodna, więc identyfikowanie w niej aktywnego składnika nie było konieczne [P2]. Natomiast publikacja P3 obejmowała frakcjonowanie selenopolisacharydu izolowanego z grzybni *L. edodes*. Stwierdzono obecność trzech głównych składników polisacharydowych. W ostatnim etapie pracy podjęto więc próbę ustalenia, który ze składników frakcji polisacharydowej wyizolowanej z biomasy grzybni był odpowiedzialny za stwierdzone poprzednio działanie immunosupresyjne [P3].

Każda z dwóch publikacji eksperymentalnych jest doskonale zaplanowana, zaś wyniki eksperymentów są precyzyjnie opracowane i opisane. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wysunęła prawidłowe, logiczne wnioski. Recenzentka zgadza się z końcową konkluzją Doktorantki, że zarówno grzybnia *L. edodes* jak i pożywka pochodowlana stanowią źródło biologicznie czynnych selenopolisacharydów o dużym zróżnicowaniu mas cząsteczkowych oraz zróżnicowanej budowie. Badania przeprowadzone w ramach recenzowanej dysertacji są cennym, nowym źródłem wiedzy na temat budowy mało znanych polimerów naturalnych, jakimi są Se-egzopolisacharydy.

Strona edytorska, formalna oraz redakcyjna rozprawy doktorskiej jest staranna, jednak z obowiązku recenzenta chcę zwrócić uwagę na kilka drobnych uchybień. Na str. 27 Autorka napisała „stopień utlenienia selenu włączonego do struktury Le-P-Se równy 4” oraz „Jego stopień utlenienia wynosił 2”. Podobny błąd pojawia się na str. 42 „selen na drugim stopniu utlenienia”. Stopnie utlenienia oznaczamy cyframi rzymskimi, poza tym stopień utlenienia selenu (opisywany w tych fragmentach pracy) wynosił –II. Ryc.13 oraz Ryc. 14 posiadają nieprawidłowo opisaną oś Y „Żywotność komórek MTT”, prawidłowo powinno być: % przeżywalności komórek. Są to jednak uchybienia nie wpływające na wartość merytoryczną pracy.

W swojej rozprawie Doktorantka wykazała wpływ selenowania na aktywność biologiczną badanych polisacharydów w związku z czym nasuwa się pytanie: jakie możliwości widzi Doktorantka w zakresie modyfikacji i optymalizacji warunków otrzymywania Se-polisacharydów o wysokiej aktywności biologicznej? Czy Doktorantka rozważa rozwinięcie badań nad Se-polisacharydami w kierunku sprawdzenia ich aktywności przeciwbakteryjnej?

Reasumując przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Sandry Joanny Górskiej-Jakubowskiej pt. "Badanie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną selenowych polisacharydów pochodzenia grzybowego" cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość praktyczną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Doktorantkę.

Pragnę również podkreślić całościowy dorobek naukowy mgr Sandry Joanny Górskiej-Jakubowskiej, jest Ona współautorką 12 znaczących prac naukowych o wysokich współczynnikach oddziaływania IF, wynoszącym łącznie 33,799. Mgr Sandra Joanna Górską-Jakubowska była kierownikiem grantu NCN PRELUDIUM, grantu „Inkubator Innowacyjności +” oraz dwóch projektów Młodego Badacza. Poza tym Doktorantka uczestniczyła w realizacji grantu NCN Opus 5.

Podsumowując, rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, uważam za niezwykle interesującą oraz nowatorską. Stanowi ona samodzielny dorobek naukowy, jest na najwyższym światowym poziomie i w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Pragnę rekomendować rozprawę doktorską mgr Sandry Joanny Górskiej-Jakubowskiej do wyróżnienia.

KIEROWNIK
Zakład Biotechnologii

prof. dr hab. Anna Bielawska