



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Kraków, 08.08.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.:
„*Badania zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną selenowanych
polisacharydów pochodzenia grzybowego*”
wykonanej przez **mgr Sądre Joannę Górską-Jakubowską**
w Katedrze Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
pod kierunkiem prof. dr hab. Jadwigi Turło
i dr Marzenny Klimaszewskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska powstała na podstawie cyklu trzech prac opublikowanych w 2021 roku, w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym znajdujących się w bazach Scopus oraz Web of Science. W skład cyklu wchodzi:

1. S. Górska, A. Maksymiuk, J. Turło: Selenium-Containing Polysaccharides—Structural Diversity, Biosynthesis, Chemical Modifications and Biological Activity. *Applied Sciences* **2021**, 11, 3717. <https://doi.org/10.3390/app11083717> [P1]
2. **S. Górska-Jakubowska**, M. Klimaszewska, P. Podsadni, B. Kaleta, R. Zagożdżon, S. Górska, A. Gamian, T. Strączek, C. Kapusta, M. Cieślak et al.: Selenium-Containing Exopolysaccharides Isolated from the Culture Medium of *Lentinula edodes*: Structure and Biological Activity. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 13039. <https://doi.org/10.3390/ijms222313039> [P2]
3. M. Klimaszewska, S. Górska, G. Łapienis, B. Kaleta, **S. Górska**, M. Kaszowska, M. Dawidowski, A. Gamian, R. Zagożdżon, A. Górski, J. Turło: *Identification of the Primary Structure of Selenium-Containing Polysaccharides Selectively Inhibiting T-Cell Proliferation*, *Molecules* **2021**, 26(17), 5404; <https://doi.org/10.3390/molecules26175404> [P3]

Pierwsza z publikacji ma charakter przeglądowny, powstała na podstawie analizy 392 pozycji piśmiennictwa i stanowi część teoretyczną rozprawy, natomiast w dwóch pozostałych pracach Doktorantka zaprezentowała badania własne dotyczące analizy struktury i aktywności biologicznej frakcji Se-egzopolisacharydowej, analizy struktury Se-polisacharydów izolowanych z mycelium *Lentinula edodes* oraz analizę porównawczą tych frakcji.

Zakład Biochemii Farmaceutycznej

ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, tel. +48 12 620 55 77, +48 12 620 55 98, faks +48 12 620 55 77

www.famacja.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) prac tworzących rozprawę doktorską wynosi $IF = 13.015$, a liczba punktów wg MNiSW jest równa 380. Doktorantka w dwóch pracach jest pierwszym autorem. Swoją udział w przygotowaniu poszczególnych publikacji określiła odpowiednio na 50% w [P1], 40% w [P2] oraz 25% w [P3], co jednoznacznie potwierdzają załączone oświadczenia współautorów. Prace mają charakter interdyscyplinarny, powstały w ramach współpracy z kilkoma renomowanymi krajowymi ośrodkami naukowymi. Na realizację swoich badań Doktorantka pozyskała środki finansowe pochodzące z Narodowego Centrum Nauki (grant Preludium) oraz funduszy WUM (Inkubator Innowacyjności oraz dwukrotnie Projekt Młodego Badacza).

Praca doktorska mgr Sandry Górskiej-Jakubowskiej reprezentuje problematykę badawczą związaną z opracowaniem nowych kandydatów na leki immunosupresyjne, które oprócz dużej skuteczności powinny się charakteryzować mniejszą toksycznością od obecnie stosowanych w transplantologii i terapii chorób autoimmunologicznych.

Doktorantka, jako obiekt swoich badań biosyntetycznych pozwalających na otrzymanie związków o działaniu immunomodulującym wybrała gatunek grzyba *Lentinula edodes*. Z owocników tego gatunku izolowany jest lentinan, polisacharyd, rozgałęziony β -glukan, zarejestrowany w Japonii jako lek stosowany wspomagająco w terapii przeciwnowotworowej, głównie przewodu pokarmowego. Polisacharydy są metabolitami grzybów wykazującymi wielokierunkową, zróżnicowaną aktywność biologiczną, taką jak np.: przeciwutleniającą, immunomodulującą, przeciwnowotworową, przeciwdrobnoustrojową, czy hepatoprotekcyjną. Związki selenu (Se) charakteryzuje podobny kierunek aktywności immunomodulacyjnej, odgrywają również kluczową rolę w mechanizmie odporności organizmu. Z tego względu powstała hipoteza zakładająca możliwość synergizmu dla tych komponent.

Tematyka podjęta przez Doktorantkę stanowi kontynuację badań prowadzonych, przez pracowników Katedry Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej WUM, a zwłaszcza p. prof. Turło, światowego eksperta w dziedzinie biotechnologii grzybów, nad biosyntezą oraz strukturą i aktywnością biologiczną Se-polisacharydów otrzymanych

Zakład Biochemii Farmaceutycznej

ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, tel. +48 12 620 55 77, +48 12 620 55 98, faks +48 12 620 55 77

www.famacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

z biomasy grzybni *Lentinula edodes*. Wyizolowane Se-polisaharydy (frakcja Se-L) wykazywały silne i selektywne działanie (supresyjne) hamujące proliferację limfocytów krwi, przy bardzo niskiej toksyczności. Okazało się, że to działanie było odwrotne do immunostymulującego, powszechnie opisywanego w literaturze, jako charakterystyczne dla polisacharydów pochodzenia grzybowego.

Głównym celem pracy doktorskiej p. mgr Sandry Górskiej-Jakubowskiej było określenie wpływu inkorporacji selenu do egzopolisaharydów (EPS) wydzielanych do pożywki hodowlanej przez grzybnię *L. edodes* na ich strukturę i aktywność biologiczną. Dodatkowym celem było ustalenie zależności typu struktura – aktywność pomiędzy Se-egzopolisaharydami (Le-P-Se) a Se-polisaharydami (Se-L) wyizolowanymi z grzybni *L. edodes* wcześniej otrzymanymi i opisanymi.

Uważam, że podjęta przez Autorkę tematyka badań oraz postawione zadania i cele są jak najbardziej aktualne i uzasadnione, a otrzymane rezultaty posiadają duże walory zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne.

Wstęp, który stanowi publikacja [P1] został zredagowany w jasny i wyczerpujący sposób. Doktorantka dokonała wnikliwego przeglądu polisacharydów oraz selenopolisaharydów różnego pochodzenia. Szczególnie wiele uwagi poświęciła biosyntezie, a także problemom związanym z różnorodnością strukturalną, modyfikacjami chemicznymi oraz wielokierunkową aktywnością biologiczną selenopolisaharydów.

Cel oraz zakres zaplanowanych badań został przez Doktorantkę przedstawiony logicznie i klarownie, a dobór metod biotechnologicznych, biochemicznych, immunoenzymatycznych, analitycznych, spektralnych oraz statystycznych jest jak najbardziej właściwy i adekwatny w stosunku do wytyczonych zadań badawczych.

Doktorantka w pierwszej kolejności przeprowadziła biosyntezę i oczyszczanie selenowanych polisacharydów z podłoża hodowlanego i biomasy grzybni *Lentinula edodes*. Doprowadziło to do wyizolowania kilku frakcji: nowej, Se-egzopolisaharydowej (Le-P-Se), wzbogaconej w selen i frakcji referencyjnej (Le-P-0), pozbawionej selenu oraz frakcji



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

wcześniej opisanych w literaturze, Se-polisacharydowej (Se-L) i referencyjnej (L), a także frakcji Se-Le-30 (surowy Se-polisacharyd) otrzymanej zmodyfikowaną metodą Chihara.

W kolejnym etapie Doktorantka zaplanowała szeroki zakres badań strukturalnych dla Se-egzopolisarydów (frakcja Le-P-Se) oraz frakcji referencyjnej (Le-P-0), na który złożyło się: określenie masy molowej, składu monosacharydowego i aminokwasowego, typu oraz konformacji wiązań glikozydowych, zawartości selenu i jego sposobu wiązania z polimerem.

Niezwykle ważnym etapem były także badania *in vitro* aktywności antyoksydacyjnej, cytotoksycznej oraz immunomodulacyjnej nowo otrzymanych makromolekuł.

W ostatnim etapie Doktorantka porównała strukturę oraz aktywność biologiczną nowo otrzymanych frakcji egzopolisacharydowych wyizolowanych z podłoża pochodowlanego z analogicznymi frakcjami wyizolowanymi z biomasy mycelium *L. edodes*.

Frakcje Se-egzopolisacharydowe okazały się jednorodne, składały się głównie z silnie rozgałęzionych Se-1,2- α -1,4- α -mannanów, dlatego w tym przypadku nie istniała konieczność identyfikacji składnika aktywnego. Natomiast frakcje Se-polisacharydowe wyodrębnione z grzybnia *L. edodes* wykazały obecność trzech głównych składników polisacharydowych: Se-1,2- α -D-glukanów, 1,6- β -D-glukanów i 1,3- β -D-glukanów, dlatego w tym przypadku podjęto także próby ustalenia, który ze składników frakcji polisacharydowej jest odpowiedzialny za działanie immunosupresyjne.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań potwierdziły, że zarówno grzybnia *L. edodes* jak i pożywka pochodowlana stanowią źródło biologicznie czynnych selenopolisacharydów o dużym zróżnicowaniu mas cząsteczkowych, a także zróżnicowanej budowie. Wyniki badań potwierdziły także, że selen może wiązać się z polisacharydami i wpływać zarówno na ich budowę przestrzenną oraz aktywność immunomodulacyjną.

Analiza wyników wskazała na zależność pomiędzy budową a aktywnością selenopolisacharydów. Okazało się, że polimannany izolowane z podłoża hodowlanego



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

wykazywały zdecydowanie niższą aktywność immunosupresyjną w porównaniu do poliglukanów wyizolowanych z grzybni. Zatem potencjał terapeutyczny nowej frakcji S-egzopolisacharydowej jest słabszy. Jednak brak toksyczności i prawdopodobnie selektywne działanie immunosupresyjne dają nadzieję na dalszy rozwój badań w grupie tych związków.

Znakomitą większość wyników Autorka przedstawiła w postaci bardzo przejrzystych rycin, które wyczerpująco dokumentują przeprowadzone analizy. Otrzymane dane zostały poddana ocenie statystycznej, co w znacznym stopniu obiektywizuje otrzymane wyniki.

Uzyskane przez Doktorantkę rezultaty zostały wnikliwie przeanalizowane w ramach dyskusji [P2, P3], w której daje się zaobserwować dużą erudycję Doktorantki i umiejętność samodzielnej, krytycznej oceny własnych wyników w konfrontacji z wynikami publikowanymi przez innych autorów. Całość dyskusji świadczy o bardzo dobrym, merytorycznym przygotowaniu Autorki, która wykazała się umiejętnością korzystania z najistotniejszych i aktualnych danych literatury fachowej oraz zdolnością formułowania logicznych wniosków.

Podczas wnikliwego czytania pracy nasunęło mi się kilka pytań i uwag, na które proszę Doktorantę o odpowiedź:

1. Linia komórkowa HeLa, zawiera komórki raka szyjki macicy, zatem informacja zawarta w tekście na str. 40, w podrozdziale 7.1, że frakcje egzopolisacharydowe nie wywierają wpływu na komórki raka piersi jest błędna.
2. Czym kierowano się przy wyborze linii komórkowych do badań cytotoksyczności?
3. Czy wykonanie testu MTT wystarczy, aby uzyskać wiarygodne dane na temat cytotoksyczności badanych związków?
4. Jaki rodzaj modyfikacji można zaproponować dla nowych selenopolisacharydów, aby poprawić ich aktywność immunostymulującą?

Wymienione drobne niedoskonałości i uwagi w żadnym razie nie umniejszają wartości merytorycznej pracy.



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Podsumowując pragnę stwierdzić, że p. mgr Sandra Górską-Jakubowska przedłożyła niezwykle wartościową pracę, którą oceniam bardzo wysoko, wnosi poważny wkład w opracowywanie nowych skutecznych środków immunomodulujących pochodzenia naturalnego w grupie selenopolisacharydów. Doktorantka wykazała się umiejętnością tworzenia hipotezy badawczej, projektowania i przeprowadzenia eksperymentów z szeroko rozumianej biotechnologii farmaceutycznej, chemii medycznej oraz biologii komórki. Wykazała wysokie kompetencje w zakresie analizy otrzymanych wyników oraz formułowania wniosków.

W mojej opinii recenzowana rozprawa w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim określone w Art. 13 ust. 1 z dn. 14 marca 2003r o stopniach i tytule naukowym z późniejszymi poprawkami z 2014r. (Dz.U. Poz. 1852), dlatego zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie p. mgr Sandry Górskiej-Jakubowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoki poziom recenzowanej pracy, oryginalność stosowanych metod badawczych, szczególne walory poznawcze i aplikacyjne oraz fakt, że badania zostały opublikowane w czasopiśmie anglojęzycznym o zasięgu międzynarodowym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej p. mgr Sandry Górskiej-Jakubowskiej

prof. dr hab. Elżbieta Pękala

Zakład Biochemii Farmaceutycznej

ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, tel. +48 12 620 55 77, +48 12 620 55 98, faks +48 12 620 55 77

www.famacja.cm-uj.krakow.pl