

Katowice, dnia 14.11.2020

prof. dr hab. Michał Daszykowski
Instytut Chemii
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych
Uniwersytet Śląski
ul. Szkolna 9
40-006 Katowice

Tel.: 32 359 15 68
E-mail: michal.daszykowski@us.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej pt. „*Study of biological activity of naturally occurring compounds by modern analytical techniques*” autorstwa Pani mgr Gulyaim Sagandykovej

Pomimo spektakularnego postępu w chemii i zaawansowania metod syntezy chemicznej to bezdyskusyjnie przyroda pozostaje największą fabryką różnorodnych związków chemicznych. Wiele związków chemicznych pochodzenia naturalnego z trudem może być syntezowana w warunkach laboratoryjnych. Ich synteza okazuje się często ekonomicznie niekorzystana, a nawet niemożliwa. Właśnie dlatego przyroda nadal stanowi spory rezerwuar związków chemicznych, w tym związków o wyjątkowych właściwościach oraz takich, które potencjalnie mogą wykazywać dużą aktywność biologiczną. Od wielu lat, eksploruje się naturalne zasoby, poszukując nowych leków lub skuteczniejszych substytutów znanych farmaceutyków, a także bada się lecznicze własności formułacji stosowanych w tradycyjnej medycynie. Bez względu czy pochodzenie związków chemicznych jest naturalne czy syntetyczne, rozważając ich zastosowanie jako potencjalnych leków należy zweryfikować aktywność biologiczną, a także ustalić mechanizm oddziaływania i potencjalne ryzyka dla pacjenta. Powszechnie panujący w przestrzeni publicznej pogląd na temat bezpieczeństwa związków pochodzenia naturalnego niestety jest błędny. To jedynie obejście kłopotliwego procesu syntezy chemicznej, a nie pewnik ich bezpieczeństwa. Pomimo stale rosnącego zainteresowania medycyną naturalną, a zwłaszcza związkami pochodzenia

naturalnego, właściwa kontrola jakości naturalnych farmaceutyków jest dużym wyzwaniem. Kontrola jakości powinna uwzględniać nie tylko oznaczenie zawartości wszystkich biologicznie aktywnych składników, ale również wszystkich potencjalnych występujących zanieczyszczeń. Badanie aktywności biologicznej związków chemicznych, w tym związków pochodzenia naturalnego, to bardzo ważne i wciąż aktualne zagadnienie. To właśnie jemu Pani mgr Gulyaim Sagandykova poświęciła swoją pracę doktorską.

Praca doktorska Pani mgr Gulyaim Sagandykovej została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, a także w Centrum Metod Separacyjnych i Bionalitycznych „BioSep”. Jej promotorem był Pan prof. dr hab. Bogusław Buszewski, a promotorem pomocniczym Pan dr hab. Paweł Pomastowski.

Tematyka pracy doktorskiej Pani mgr Gulyaim Sagandykovej koncentruje się na badaniach pożądanej własności jaką jest aktywność biologiczna związków pochodzenia naturalnego. W szczególności, autorka pracy formułuje hipotezę badawczą, która poddaje w wątpliwość możliwość badania aktywności biologicznej związków pochodzenia naturalnego w sposób relatywnie prosty. Wyrazem tego jest dość kłopotliwe lecz zarazem intrygujące z naukowego punktu widzenia pytanie, które znajdujemy we wstępie pracy doktorskiej – czym faktycznie jest aktywność biologiczna? W sposób zupełnie naturalny, postulowana hipoteza badawcza przekształca się w szereg realnych działań eksperymentalnych i poznawczych, mających na celu wsparcie jej weryfikacji. Już na wstępie, można domniemywać, że doktorantka postrzega aktywność biologiczną dużo szerzej, a zatem preferuje ona podejście bardziej ogólne i wielowątkowe. W pracy doktorskiej przedstawia argumenty, przemawiające za koniecznością charakteryzacji aktywności biologicznej uwzględniając dane eksperymentalne, opisujące różne aspekty tej bardzo specyficznej własności. Z drugiej strony, zwraca czytelnikowi uwagę na brak w literaturze przedmiotu spójnej definicji aktywności biologicznej, co znacząco utrudnia porównywanie wyników eksperymentalnych wyznaczonych dla określonych układów i systemów i ma bezpośredni wpływ na jakość danych pomiarowych. Zatem, włączanie w proces badawczy różnych technik pomiarowych w celu charakteryzacji aktywności biologicznej, pozwala „spojrzeć” na tą kluczową własność pod różnym kątem. Oprócz eksperymentalnych metod wyznaczania i badania aktywności biologicznej, szczególne uznanie znalazły również różne metody teoretyczne. Ich zadaniem jest między innymi konstruowanie matematycznej zależności pomiędzy wybranym kluczowym parametrem, np. aktywność biologiczna, a strukturą chemiczną określonej grupy związków. Autorka zwraca

także uwagę na potencjalne trudności, które pojawiają się, gdy łączy się ze sobą komplementarne źródła pomiarowe takie jak na przykład metody spektroskopowe, spektrometryczne czy techniki mikroskopowe z możliwościami dokowania molekularnego. Przede wszystkim wymienia wyzwania związane z gromadzeniem danych, ich przetwarzaniem oraz interpretacją, z powstawaniem różnego rodzaju artefaktów w danych czy choćby trudności wynikające wprost z doboru technik instrumentalnych i obliczeniowych. Szczególną misję w procesie badania aktywności biologicznej pełnią także techniki separacyjne, pozwalające uzyskać informację ilościową i jakościową na temat poszczególnych komponentów badanych mieszanin. Relatywnie duża łatwość sprzęgania ze sobą technik chromatograficznych o wzajemnie uzupełniających się możliwościach istotnie sprzyja lepszej eksploracji przestrzeni analitów. Realizowane jest to przede wszystkim poprzez uwzględnienie w procesie analizy mieszanin związków pochodzenia naturalnego różnych mechanizmów rozdziału, odmiennych (preferencyjnie ortogonalnych) warunków chromatograficznych czy użycie różnych jedno- i wielokanałowych detektorów oraz poprzez optymalną ekstrakcję użytecznej chemicznie informacji.

Praca doktorska została napisana w języku angielskim. Obejmuje badania szczegółowo przedstawione w cyklu spójnych tematycznie sześciu artykułów. Zostały one zamieszczone w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz wysokim współczynniku oddziaływania, z ang. *impact factor* (IF). Są to takie tytuły czasopism jak „*Trends in Analytical Chemistry*” (IF 9,801, 140 pkt.), „*Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*” (IF 4,673, 140 pkt.) oraz „*International Journal of Molecular Sciences*” (IF 4,556, 140 pkt.). Wszystkie artykuły ukazały się drukiem w okresie ostatnich dwóch lat. Struktura pracy doktorskiej jest zatem podyktowana w głównej mierze przyjętą formułą. Wyróżniono w niej takie rozdziały jak wstęp, cele badań, problemy badawcze, poszczególne artykuły, wnioski i końcowe uwagi, bibliografia, a także streszczenie w języku angielskim i polskim, zestawienie osiągnięć naukowych oraz oświadczenia wkładu współautorów poszczególnych artykułów. Analiza treści oświadczenia przedłożonego przez doktorantkę, a także treści oświadczeń poszczególnych współautorów pozwala jednoznacznie stwierdzić, że doktorantka miała znaczący i twórczy udział w powstaniu artykułów, a także że w bardzo dużym zakresie przyczyniła się do zaplanowania, a następnie realizacji eksperymentów oraz interpretacji wyników pomiarowych. Można zatem z pełnym przekonaniem powiedzieć, że rola doktorantki w procesie badawczym jest niekwestionowana, a prowadzone przez nią badania w ramach tematyki doktoratu i sposób ich

wszechstronnej i komplementarnej realizacji dowodzą Jej dużej dojrzałości naukowej.

W artykułach będących podstawą pracy doktorskiej, doktorantka przedstawia kolejne działania, których zasadniczym celem jest pogłębienie wiedzy na temat aktywności biologicznej, a także sposobów jej efektywnej charakteryzacji. Są to między innymi, (1) opracowanie metody wyboru potencjalnych inhibitorów jednego z enzymów, który może mieć udział w procesie kancerogenezy, a następnie budowa modeli typu QSPR, ocena oddziaływania pomiędzy enzymem, a inhibitorami, ocena inhibicji z wykorzystaniem techniki spektrofotometrii, dynamiki molekularnej i symulacji dokowania molekuł, (2) opracowanie teoretycznego podejścia badania oddziaływań pomiędzy wybranymi flawonoidami, a niektórymi fazami stacjonarnymi imitującymi działanie membran komórkowych czy fazami stacjonarnymi wybranych kolumn referencyjnych, poprzez budowanie modeli częściowych najmniejszych kwadratów (PLS) z uwzględnieniem procedury wyboru zmiennych i realizację obliczeń DFT, (3) opracowanie podejścia instrumentalnego umożliwiającego badanie oddziaływań pomiędzy kazeiną, a jonami srebra i określenie antybakteryjnych własności tego połączenia poprzez uprzednie określenie własności sorpcyjnych, badanie interakcji z wykorzystaniem MALDI-TOF-MS, spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera i spektroskopii Ramana, metod mikroskopowych (SEM, TEM), analizy DTG/TGA oraz badanie stabilności kompleksu w symulowanych płynach ustrojowych za pomocą techniki ICP-MS, (4) opracowanie metody laboratoryjnej EC-MALDI-TOF-MS do analizy i identyfikacji wybranych metabolitów z wykorzystaniem elektrochemicznej fragmentacji i ich charakteryzacja poprzez MALDI-TOF-MS.

Poszczególne problemy badawcze będące przedmiotem wnikliwych badań obejmują (1) wyznaczanie aktywności biologicznej związków występujących w przyrodzie, (2) badanie aktywności małowcząsteczkowych związków względem niektórych białek, (3) badanie oddziaływań pomiędzy aktywnymi biologicznie związkami występującymi w roślinach, a fazami stacjonarnymi, a także (4) badanie oddziaływań pomiędzy wybranymi jonami metali, a proteinami.

Pierwszy problem badawczy został bardzo szczegółowo opisany w dwóch artykułach przeglądowych. Autorka podkreśla w nich rolę związków pochodzenia naturalnego jako potencjalnych terapeutyków. Wskazuje na konieczność prowadzenia badań ułatwiających dogłębne poznanie molekularnych mechanizmów ich oddziaływań. Podkreśla, że nawet w przypadku związków pochodzenia naturalnego należy bezwzględnie zwrócić uwagę na aspekt stosowania odpowiedniej

dawki i badać potencjalne efekty uboczne. To oczywiście pociąga za sobą konieczność właściwej charakteryzacji składu chemicznego i należytej kontroli jakości produktów farmaceutycznych tworzonych na bazie produktów pochodzenia naturalnego. Jak zauważa doktorantka, zagadnienie badania aktywności biologicznej kryje w sobie wątek multi- i interdyscyplinarny, wymagający stosowania komplementarnych analiz i technik instrumentalnych. W artykułach przedstawiła także rekomendacje, które ułatwiają wybór technik analitycznych w odniesieniu do docelowych ich aplikacji, a także przedyskutowała ograniczenia metod i aktualne trendy ich rozwoju na przykładzie rozważnie dobranych zastosowań. Jednocześnie, w Jej artykułach faktycznie można zauważyć nakreślony wieloaspektowy charakter badania aktywności biologicznej, dzięki uwzględnieniu rozmaitych układów oddziaływań, zawierających takie wybrane komponenty jak różne flawonoidy, wybrane fazy stacjonarne, białka, mikroorganizmy, nanocząstki, komórki, organelle komórkowe, liposomy czy DNA.

Drugi istotny problem badawczy poruszany w pracy doktorskiej dotyczy oddziaływań małowcząsteczkowych związków z białkami. Jak wiemy, białka stanowią grupę niezwykle ważnych biomakromolekuł, pełniących kluczowe role dla funkcjonowania organizmów żywych. W literaturze przedmiotu znajdujemy również wiele doniesień i dowodów, które wskazują na istotny udział białek w kształtowaniu różnych procesów chorobotwórczych. Od wielu lat nie przemija żywe zainteresowanie poznawaniem natury, oddziaływań różnych molekuł czy indywiduów chemicznych z istotnymi pod względem biologicznym białkami, gdyż ten kierunek badań daje nowe nadzieje na skuteczną walkę z wieloma chorobami cywilizacyjnymi. Z kolei szczegółowa analiza oddziaływań enzymów z potencjalnymi inhibitorami sprzyja poznaniu skuteczności potencjalnego leku, ustalenia możliwych efektów ubocznych czy ustaleniu mechanizmu jego działania. Jednym z enzymów, który był obiektem badań w niniejszej pracy była anhydraza węglanowa IX. Odpowiada ona za katalityczną odwracalną reakcję tworzenia jonu wodorowęglanowego z cząsteczek wody i ditlenku węgla. Okazuje się, że anhydraza węglanowa IX nie występuje w zdrowych tkankach, natomiast stwierdza się jej obecność w nowotworach o szczególnie agresywnej progresji. Dlatego właśnie ten cel farmakologiczny jest atrakcyjny z perspektywy walki z nowotworami i poszukiwania potencjalnych inhibitorów. Doktorantka również sygnalizuje w swojej pracy doktorskiej, że badania uwzględniające wyłącznie oddziaływania inhibitor-enzym są poznawczo ograniczone i proponuje podejście wykorzystujące jednocześnie wiele technik pomiarowych.

Trzeci wątek badawczy pracy doktorskiej uwzględnia aspekt badania aktywności biologicznej poprzez wykorzystanie interesującej idei biomimetycznych układów chromatograficznych, które naśladują zachodzące procesy oddziaływań molekularnych (tzn. molekule budujące daną fazę stacjonarną). Tego typu podejście znacząco poprawia proces poszukiwań potencjalnych leków spośród związków naturalnie występujących w przyrodzie. Wykorzystanie w tym celu wysokosprawnej chromatografii ciekowej w połączeniu z metodami wieloparametrowego modelowania uzyskanych danych retencyjnych, ujawnia możliwe oddziaływania, pozwala wyznaczyć wybrane własności (np. lipofilowość, rozkład objętości leku, zdolność pokonywania bariery krew-mózg, itp.), a także daje możliwość ustalenia określonego mechanizmu retencji. Jednym z potencjalnych ograniczeń metody QSRR, na które zwraca uwagę doktorantka, jest relatywnie duża trudność interpretacyjna poszczególnych deskryptorów molekularnych, które opisują budowę molekuł co zarazem znacznie utrudnia interpretację stworzonego wieloparametrowego modelu. Nie bez znaczenia pozostaje także kwestia możliwego wpływu rozpuszczalnika na badany układ, a docelowo na własności predykcyjne modelu. Aby dogłębnie przeprowadzić interpretację wieloparametrowego modelu, w pracy doktorskiej końcowy model częściowych najmniejszych kwadratów skonstruowano wykorzystując wybrane zmienne. Identyfikacji zmiennych, które miały największe znaczenie przeprowadzono za pomocą algorytmu genetycznego.

Czwarty problem badawczy koncentrował się na zbadaniu oddziaływań pomiędzy wybranymi jonami metali, a proteinami. Jony wybranych metali to ważne mikroskładniki dla funkcjonowania i rozwoju organizmów żywych. Ich jonowa postać gwarantuje dość dobrą dostępność, lecz nie oznacza to że jest w takiej formie mikroskładnik jest w pełni dostępny. Okazuje się, że jego połączenie z proteinami może znacząco zwiększać biodostępność, a zatem cząsteczka białka spełnia rolę dostarczyciela. Oczywistym staje się zatem poszukiwanie właściwego białka, które zapewni dużą stabilność takiemu połączeniu i zarazem będzie biologicznie bezpieczne. Własności sorpcyjne wybranych białek mogą być postrzegane jako pożądany efekt, a niekiedy stwarzać realne zagrożenie, jak na przykład w przypadku kazeiny. Właśnie z tego powodu łatwo ulega ona zanieczyszczeniu, co oczywiście naraża na niebezpieczeństwo konsumenta. Badania prowadzone przez doktorantkę dowiodły, że sorpcja jonów srebra na powierzchni kazeiny jest dwuetapowa. Pierwszy etap, adsorpcja, jest szybka, a następnie zachodzi powolna dyfuzja i wiązanie. Ponadto, doktorantka wykazała, że tego typu połączenia są bezpieczne biorąc pod uwagę trwałość, z co za tym idzie możliwość uwalniania jonów srebra. Zastosowanie takich specyficznych nośników wydaje się być atrakcyjną pod

względem możliwości jakie dają one w walce z patogenami. Ich synteza nie jest skomplikowana, a substraty są relatywnie łatwo dostępne.

Ostatni wątek badawczy omawiany w pracy doktorskiej został poświęcony potencjalnym metabolitom bioaktywnych związków pochodzenia roślinnego. Wykorzystanie elektrochemicznych technik pozwala na symulowanie reakcji redox oraz pierwszej fazy procesu oksydacyjnego metabolizmu komórkowego. Badanie produktów tychże reakcji stanowi trudne analityczne wyzwanie. W swoich badaniach doktorantka skupia się na wykorzystaniu techniki MALDI-TOF-MS, doceniając zarazem brak konieczności uprzedniego rozdzielenia mieszanin, możliwość pracy z małą objętością próbek, potencjał identyfikacyjny i możliwość analizy form chiralnych. W szczególności, zbadano możliwe produkty przemian sacharydów i cyklitolii.

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania umożliwiły doktorantce realizację uprzednio zakładanych celów. Uzyskane wnioski znajdują w pełni oparcie w uzyskanych danych eksperymentalnych. Bez wątpienia stanowią one istotny wkład do istniejącego stanu wiedzy i wskazują możliwe kierunki dalszych poszukiwań.

Na całkowity dorobek naukowy doktorantki składa się dziesięć artykułów, które opublikowała w uznanych recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo wysoki współczynnik ich oddziaływania, łącznie 53,778, co średnio, na jeden artykuł daje 5,378. To znakomite osiągnięcie. Ponadto, wyniki swoich badań przedstawiała na pięciu konferencjach krajowych i międzynarodowych. Jest laureatką konkursów, a także pięciu nagród Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Należy podkreślić, że wyniki badań, które są przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej powstały dzięki środkom finansowym pochodzącym z kilku różnych źródeł. Aktywnie uczestniczyła w realizacji trzech grantów naukowych finansowych ze środków zewnętrznych, a w jednym była kierownikiem (grant PRELUDIUM pt. *"Development of MALDI target based on chemically synthesized metal and metal oxide nanoparticles for detection of natural low molecular weight compounds"*, 2018/31/N/ST4/02210, finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki). W trakcie swojej kariery naukowej odbyła trzy staże naukowe.

Korzystając z przywileju recenzenta, chciałbym w takcie publicznej obrony przedyskutować z doktorantką kilka istotnych wątków, na które lektura niniejszej pracy doktorskiej zwróciła mi uwagę, a także wskazać drobne niedociągnięcia.

- 1) Aktywność biologiczna to faktycznie niezwykle złożony i zarazem interesujący problem badawczy. Szczególnie interesującym jest aspekt wykorzystania metod chromatograficznych w badaniu aktywności biologicznej. Chciałbym poznać zdanie doktorantki na temat możliwości wykorzystania relatywnie prostej techniki chromatografii cienkowsarstwowej, jako techniki komplementarnej. W szczególności zastanawia mnie metoda bioautografii, której potencjał w aspekcie badania aktywności biologicznej, w moim odczuciu, jest relatywnie mało doceniony. Urzekająca jest duża prostota tej techniki, która przekształca podstawową wadę metody TLC (odsłonięta faza stacjonarna o bardzo rozwiniętej powierzchni), w zaletę umożliwiającą przestrzenną i bezpośrednią analizę aktywnych komponentów próbki w sposób nieszablonowy.
- 2) Istnieje bardzo wiele metod, ułatwiających konstrukcję modeli QSRR. Niewątpliwie na etapie ich konstrukcji należy zwrócić uwagę na fakt dużej korelacji pomiędzy zmiennymi. Wiele modeli QSRR konstruowanych jest w oparciu o podejście regresji wielorakiej (MLR), co w przypadku dużego zbioru deskryptorów molekularnych jest uciążliwe, gdyż zawsze wymaga selekcji ortogonalnych zmiennych. Stąd, z dużą satysfakcją przyjmuję użycie przez doktorantkę metody częściowych najmniejszych kwadratów (PLS). Chciałbym jednak zwrócić uwagę, że w tym przypadku wybór zmiennych aby dokonać interpretacji i uproszczenia modelu PLS można przeprowadzić dużo prościej i szybciej niż w oparciu o algorytm genetyczny. Jakie inne w tym zakresie propozycje ma doktorantka?
- 3) Na Rys. 3B jednego z artykułów (zob. strona 77) zbiór modelowy zawiera potencjalnie niebezpieczna dla konstrukcji modelu próbka. W jakim stopniu jej obecność faktycznie wpływa na konstrukcję modelu?
- 4) Na stronie 84, równania opisujące model PLS zawierają niedociągnięcia wynikające z niespójnej notacji. W szczególności, w równaniu (1) i (2) źle została oznaczona operacja transpozycji macierzy P i Q.
- 5) W jaki sposób można uchronić się przed artefaktami w danych, które wynikają z niewłaściwej optymalizacji geometrii molekuł i/lub ich nieodpowiedniego zadokowania?
- 6) Strona 62 – w badaniach wykorzystano metodę FTIR. Czy sprawdzono możliwość konstrukcji wieloparametrowych modeli opisujących zależność pomiędzy widmami FTIR próbek, a modelowaną własnością?

- 7) W jaki sposób dokonywano wyboru próbek do zbioru modelowego i testowego do budowy modeli QSRR i ich walidacji? Dlaczego właśnie w taki sposób?

W mojej ocenie, przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Gulyaim Sagandykovej z dużym naddatkiem spełnia ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Przedstawia ona oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. W trakcie realizacji badań doktoranta nabyła wiedzę teoretyczną, odpowiednio zaplanowała i przeprowadziła badania naukowe. Przedstawione wyniki oraz stosowne oświadczenia dowodzą, że posiada odpowiednie umiejętności w dyscyplinie. Niniejszym, wnoszę do Rady Dyscypliny na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie pani mgr do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jestem pod dużym wrażeniem skrupulatnej i zarazem bardzo wszechstronnej pracy doktorantki, a także Jej niezwykle rozwiniętego warsztatu badawczego. Mając na względzie uzyskane w ramach doktoratu wyniki badań, ich opublikowanie w prestiżowych recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, wnoszę do Rady Dyscypliny na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Michał Janykowski

