

Prof. dr hab.

PIOTR STEPNOWSKI

Kierownik Katedry Analizy Środowiska

Gdańsk, dnia 7.11.2020 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Gulyaim Sagandykovej pod tytułem „Study of biological activity of naturally occurring compounds by modern analytical techniques”

Teoretyczne metody opisu czynności biologicznej związków chemicznych, które na ogół poprzedzają badania aktywności *in vitro* i *in vivo*, wykorzystują kombinację narzędzi chemometrycznych, statystycznych i obliczeniowych. Z jednej strony stosuje się kwantowo-mechaniczne techniki obliczeniowe i modelowania molekularnego, z drugiej zaprzęga się liczne metodyki oparte o zależności struktura-aktywność, zarówno w ujęciu jakościowym (SAR) jak i ilościowym (QSAR). Z kolei wykorzystując dane chromatograficzne można dodatkowo wyprowadzać niezwykle użytecznie ilościowe zależności struktura – retencja (QSRR), które w sposób selektywny są w stanie determinować określone zachowanie molekuly w modelowanym układzie biologicznym. Staje się to możliwe dzięki zastosowaniu specyficznych faz stacjonarnych imitujących określone części układu, wobec którego bada się zachowanie analitu o potencjalnej bioczynności. Metodyka ta zyskała miano chromatografii biomimetycznej i jest dziś niezwykle obiecującym uzupełnieniem standardowych technik w tym zakresie. Z kolei z analitycznego punktu widzenia zagadnienie określania czynności biologicznej związków chemicznych wymaga niejednokrotnie podejścia wielonarzędziowego, od zastosowania różnorodnych technik separacyjnych, poprzez liczne metody spektroskopowe, aż po techniki mikroskopowe, *każdorazowo uzupełniane metodami chemii teoretycznej*. *Uporządkowanie i systematyzacja tych podejść przedstawia dziś poważne wyzwanie bioanalizy chemicznej, zwłaszcza w odniesieniu do potencjalnych leków i ich skuteczności wobec wybranych receptorów*. Biorąc powyższe pod uwagę należy uznać, że obrona przez Doktorantkę tematyka badań naukowych, która stała się podstawą jej rozprawy doktorskiej, jest niezwykle aktualna i nacechowana podejściem interdyscyplinarnym.

Za cel pracy doktorskiej mgr Gulyaim Sagandykova postawiła sobie przedstawienie zwalidowanych procedur określania czynności biologicznej związków pochodzenia naturalnego. Praca została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego z Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, który kieruje jednym z wiodących zespołów

badawczych w zakresie badań bioanalitycznych z wykorzystaniem technik chromatograficznych i spektroskopowych na Świecie. Promotorem pomocniczym rozprawy był Pan dr hab. Paweł Pomastowski. Dotychczasowe doświadczenie zespołu w pracy nad bioaktywnością związków naturalnych, zaawansowanymi technikami separacyjnymi i metodami chemometrycznymi spowodowało, iż Kandydatka mogła rozpocząć swoje zadania badawcze na podstawie wcześniej ugruntowanych w zespole tez. Niezależnie od tego, trzeba uznać, iż obrona przez Doktorantkę tematyka rozprawy doktorskiej jest z utylitarne go punktu widzenia, ważna i wnosi znaczący wkład w poznanie podstawowych zagadnień bioaktywności związków naturalnych.

Rozprawa doktorska składa się z 17 stronicowego wstępu, dwóch wieloautorskich publikacji przeglądowych oraz czterech publikacji oryginalnych. Z załączonych oświadczeń wynika, że Doktorantka była wykonawcą większości eksperymentów oraz miała znaczący udział w przygotowaniu manuskryptów, odpowiedzi na recenzje i przygotowania ostatecznych wersji publikacji. Część teoretyczna dysertacji podzielona jest na 5 podrozdziałów odpowiadających w dużej mierze tematyce kolejnych prac wchodzących w skład rozprawy. Uważam jednak, że komentarz w rozprawach składanych z publikacji oryginalnych powinien przede wszystkim koncentrować się na takiej prezentacji wszystkich wyników badań, aby można było całość ocenić jako spójny, przemyślany cykl badawczy. W komentarzu zabrakło też szczegółowego celu badawczego (zamiast tego jest cel ogólny i wykonane w ramach prac działania), a także hipotez badawczych. Kolejne części pracy stanowią samoistne publikacje współautorstwa Doktorantki opublikowane w dobrych i bardzo dobrych międzynarodowych periodykach naukowych takich jak: *Trends in Analytical Chemistry* (IF=9,8), *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (IF=4,7) czy *International Journal of Molecular Sciences* (IF=4,6). Prace te przeszły już rygorystyczny proces wydawniczy, w którym zaangażowano przynajmniej dwóch zewnętrznych recenzentów, stąd ocena tych osiągnięć jest w zasadzie ułatwiona. Większość z uzyskanych przez Doktorantkę rezultatów badań a także krytycznych przeglądów literatury oceniam wysoko. Za najważniejsze osiągnięcia Kandydatki uważam:

- Podsumowanie i krytyczny przegląd literaturowy najbardziej efektywnych połączeń metodologicznych określania czynności biologicznej związków naturalnych w oparciu o studia QSAR z metodami spektroskopii fluorescencyjnej, technikami chromatograficznymi i elektromigracyjnymi, które pozwalają na modelowanie aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwutleniającej, przeciwmutagennej czy w zakresie inhibicji enzymatycznej.
- Zaproponowanie optymalnych deskryptorów molekularnych w oparciu o metodyki QSAR i QSRR pozwalające na przewidywanie potencjalnej lekodostępności (ang. drugability), znacząco upraszczające dotychczasowe procedury ewaluacji biodostępności.

- Krytyczny, obszerny przegląd wszystkich dotychczas zastosowanych wielonarzędziowych podejść do badania oddziaływań pomiędzy flawonoidami a różnymi receptorami, ze wskazaniem na bardzo obiecujący potencjał zastosowania nanomateriałów
- Skuteczne zastosowanie połączenia obliczeniowych (QSRR i DFT) oraz instrumentalnych technik analitycznych (MALDI TOF, SDS PAGE, FTIR, HPLC na fazach funkcjonalizowanych) do badań oddziaływania 45 sulfonamidów z anhidrazą węglanową IX (CA IX), na podstawie zależności struktura-aktywność-lipofilowość, na podstawie których opracowano model wykorzystujący 7 (z pośród 5000 obliczonych) kluczowych deskryptorów molekularnych umożliwiającą określenie najbardziej efektywnych struktur związków bioaktywnych. 10 najbardziej obiecujących ligandów poddano dalszym badaniom z użyciem dynamiki molekularnej.
- Dowiedzenie przydatności badań z wykorzystaniem wypełnień chromatograficznych z immobilizowaną membraną uzupełnionych jako szybkiej i efektywnej alternatywy dla szybkich oznaczeń intensywności oddziaływań flawonoidów z wybranymi barierami biologicznymi w ustroju.
- Dogłębne przebadanie mechanizmów wiązania jonów srebra z kazeiną metodami MALDI-TOF-MS, FTIR, SEM, TEM, EDX, TGA, DTG) w kontekście nutraceutycznej roli tego białka w podnoszeniu biodostępności
- opracowanie metod prognozy potencjalnych metabolitów bioczynnych związków roślinnych na przykładzie glukozy, fruktozy, galaktozy, pinitolu i inozytolu z wykorzystaniem techniki technik elektrodegradacyjnych (elektroda BDD) i MALDI-TOF-MS wspomaganą zaawansowaną analizą statystyczną

Z kolei poniżej wymieniam zagadnienia budzące moje wątpliwości oraz pytania jakie pojawiły się w trakcie lektury dysertacji:

- Cel pracy został przedstawiony jako lista działań badawczych, które łączy bardzo szeroko pojęta tematyka oznaczania aktywności biologicznej związków pochodzenia naturalnego. Czy możliwe jest według kandydatki pewne doprecyzowanie celu w taki sposób, by wskazywał pewną myśl przewodnią, łączącą omawiane publikacje, ze szczególnym uwzględnieniem prac P5-P6?
- Z lektury prac wprost nie wynika jakie jest faktyczne uzasadnienie badania wiązania przez kazeinę akurat jonów srebra? W krótkim opisie publikacji P5 (punkt 3.4, strony 14-16) szczególny nacisk został położony na możliwość dostarczania do organizmu mikroelementów w formie kompleksów białkowych. W tym aspekcie, wybór srebra jest nie do końca zbieżny z uzasadnieniem podanym w samej publikacji.

- Jak Autorka ocenia rzeczywiste zagrożenie, związane z tworzeniem w kompleksach białkowych nanocząstek pierwiastków metalicznych, ze szczególnym uwzględnieniem mikroelementów? Jako źródło wskazujące możliwość występowania efektów toksycznych podana została praca [30] z załączonej listy źródeł. Nie zawiera ona jednak wyczerpujących danych na ten temat.
- Zastosowanie w pracy P6 techniki MALDI-TOF-MS, choć godne uwagi ze względu na łatwość i szybkość wykonania analiz, nie pozwala na jednoznaczne określenie struktury powstających w trakcie degradacji produktów przemian. Podkreśla to sama autorka w oryginalnej pracy, pisząc często o „możliwych strukturach”. Czy rozważane jest zastosowanie innych technik do potwierdzenia sugerowanych struktur? Jak autorka ocenia możliwość zastosowania opisanego podejścia EC-MALDI-TOF-MS do badania podobnych zjawisk w przypadku bardziej złożonych związków chemicznych?
- Rysunek 8 w pracy P6 (mapa cieplna, wygenerowana z zastosowaniem dwuwymiarowej analizy skupień) budzi pewne wątpliwości co do zastosowanych danych wejściowych. Jak rozumiem na podstawie opisu i prezentowanej mapy cieplnej, zastosowano matrycę zawierającą dane „binarne” (jon o określonej wartości m/z jest obecny [1] lub nie [0] na danym widmie). Po pierwsze, nie jestem w pełni przekonany co do zasadności stosowania technik analizy danych wielowymiarowych w przypadku zero-jedynkowej matrycy danych. Po drugie, badane układy są grupowane przede wszystkim według zastosowanego trybu pracy spektrometru mas, co jest dość oczywiste i nie wnosi wiele do opisu uzyskanych wyników – poproszę o komentarz doktorantki w tej sprawie.

Przytoczone wątpliwości i uwagi krytyczne nie mają charakteru istotnego i w żadnej mierze nie podważają wartości rozprawy i mojej zdecydowanie pozytywnej jej oceny. Podsumowując, uważam, że cel pracy został osiągnięty, a postawione przez doktorantkę tezy znalazły potwierdzenie. Rozprawa mgr Gulyaim Sagandykovej zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał badawczy, a Kandydatka wykazała się ponadto doskonałą znajomością technik separacyjnych, spektroskopowych i chemometrycznych.

Doktorantka jest współautorką 10 publikacji naukowych opublikowanych m.in. w czasopiśmie z listy JCR. Jest także współautorką 5 komunikatów konferencyjnych. W czasie przewodu doktorskiego doktorantka była laureatką pięciokrotnie Nagrody Zespołowej Rektora UMK za osiągnięcia naukowe, zajęła także pierwsze miejsce w narodowym konkursie naukowym studentów i młodych naukowców w Kazachstanie. Brała też udział w realizacji trzech projektów naukowych, w tym w jednym w roli kierownika (Preludium NCN)

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do

Rady Dyscypliny nauki chemiczne UMK o dopuszczenie mgr Gulyaim Sagandykovej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, mając na względzie ponadprzeciętny dorobek Kandydatki oraz jej dotychczasową aktywność naukową, a nade wszystko innowacyjny charakter rozprawy, zwracam się także do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie jej.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Riek Stefanowski". The signature is fluid and cursive, with a horizontal line extending from the end.

Wpłynęło dnia*24.11.2010*.....
dr Katarzyna Białowicz

Podpis*Białowicz*.....