



Olsztyn, dnia 15 maja 2023 roku

Dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. uczelni
Katedra Mikrobiologii i Mykologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 1A
10-719 Olsztyn

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Prajsnar
pt. „Opracowanie ścieżki chemicznej oraz enzymatycznej modyfikacji grupy
aminowej kwasu 6-aminopenicylanowego poprzez wprowadzenie do cząsteczki
3-hydroksykwasów pochodzenia bakteryjnego”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Prajsnar pt. „Opracowanie ścieżki chemicznej oraz enzymatycznej modyfikacji grupy aminowej kwasu 6-aminopenicylanowego poprzez wprowadzenie do cząsteczki 3-hydroksykwasów pochodzenia bakteryjnego” została wykonana w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk pod opieką naukową Pana dra hab. Macieja Guzika, prof. IKiFP PAN oraz Pana prof. dra hab. Andrzeja Bojarskiego. Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo z dnia 3 kwietnia 2023 roku Pana prof. dra hab. Piotra Warszzyńskiego Dyrektora Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk.

Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska liczy 182 strony. Składa się z 4 głównych rozdziałów: Wstępu, Celu pracy, Badań własnych oraz Literatury. Dysertacja została opatrzona streszczeniem (w języku polskim i angielskim), spisem tabel i ilustracji, suplementami i kartą wzorów. Piśmiennictwo wykorzystane do przygotowania dysertacji jest ściśle związane z tematyką rozprawy. Szeroki zakres cytowanej literatury świadczy o znajomości aktualnych

prac związanych z tematyką rozprawy oraz o dobrym przygotowaniu teoretycznym do realizacji postawionego celu badawczego. Na podkreślenie zasługuje czytelne i staranne opracowanie części teoretycznej jak również eksperymentalnej w formie rysunków i tabel, co podnosi atrakcyjność wizualną przedłożonej dysertacji. Oceniana rozprawa doktorska ma charakter doświadczalny, a jej tematyka wpisuje się w dziedzinę nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinę nauki chemiczne.

Warto również zwrócić uwagę, że Pani mgr Justyna Prajsnar realizowała zadania badawcze we współpracy z naukowcami z innych ośrodków badawczych takich jak Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, Warszawski Uniwersytet Medyczny oraz Uniwersytet Jagielloński w Krakowie. Dlatego też, chciałabym docenić umiejętności Doktorantki w prowadzeniu badań naukowych we współpracy z innymi specjalistami.

Ocena tematyki rozprawy doktorskiej

Pani mgr Justyna Prajsnar podjęła się trudnej tematyki związanej z opracowaniem uniwersalnej ścieżki otrzymywania zmodyfikowanych penicylin z wykorzystaniem kwasów karboksylowych monomerów polihydroksyalkanianów (PHA) oraz ich estrów metylowych.

Jedną z najczęściej stosowanych grup związków o działaniu przeciwbakteryjnym są antybiotyki β -laktamowe. Do tej grupy zaliczamy między innymi penicylinę G, pierwszy odkryty antybiotyk pochodzenia naturalnego stanowiący podwaliny do poszukiwania nowych związków na drodze chemicznej modyfikacji kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA). Z uwagi na fakt, że bakterie nabywają oporności na antybiotyki β -laktamowe poszukuje się nowych związków oraz inhibitorów β -laktamaz, a także nowych sposobów ich modyfikacji w celu osiągnięcia sukcesu terapeutycznego. Grupą związków stosowaną do modyfikacji 6-APA mogą być pochodne PHA stanowiące źródło (*R*)-3-hydroksykwasów o potencjale farmakologicznym. Ponadto, polimery te posiadają dwie grupy funkcyjne, hydroksylową oraz karboksylową, które można poddać modyfikacji, co jest niezwykle zaletą z punktu widzenia projektowania nowych leków. Co najważniejsze, PHA mogą być produkowane przez bakterie, a proces ich otrzymywania jest zgodny z zasadą zrównoważonego rozwoju.

Uzasadnia to tym samym prowadzenie badań opisanych przez Doktorantkę oraz świadczy o podjęciu niezwykle ważnego zagadnienia opracowania nowych ścieżek otrzymywania penicylin poprzez wprowadzenie do cząsteczki 6-APA monomerów 3-hydroksykwasów pochodzenia naturalnego.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że wybór tematu przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest uzasadniony i aktualny. Zrealizowany cel naukowy odpowiada poziomowi jakim powinna odznaczać się rozprawa doktorska.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Tytuł przedłożonej rozprawy doktorskiej odzwierciedla zakres prowadzonych przez Panią mgr Justynę Prajsnar prac badawczych.

Streszczenia, w języku polskim oraz angielskim, przekazują czytelnikowi w przystępny sposób podjęte zagadnienie badawcze, otrzymane wyniki oraz wnioski.

Wstęp teoretyczny Doktorantka podzieliła na dwa podrozdziały - w jednym opisała zagadnienia związane z antybiotykami β -laktamowymi, natomiast w drugim przedstawiła tematykę dotyczącą polihydroksyalkanianów. W części tej należałoby ujednoczyć zapis nazw rodzajowych bakterii, na stronie 16 Doktorantka przy nazwach rodzajowych stosuje skrót spp., podczas gdy na stronie 22 już nie. Poprawnie byłoby zastosować powyższy skrót po każdej nazwie rodzajowej. Ponadto, skrót karboksylazy acetylo-CoA (Tabela 2) powinien zostać napisany dużą literą. Dodatkowo, w podrozdziale „1.2.4. Charakterystyka monomerów PHA i ich modyfikacje” Doktorantka podkreśliła, że „monomery PHA posiadające w łańcuchu grupę aromatyczną mają właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz przeciwgrzybiczne”, podczas gdy nie odniosła się do literatury naukowej potwierdzającej wspomniany potencjał antywirusowy, opisując jedynie aktywność antybakteryjną i antygrzybiczną. W mojej opinii, w bardzo oszczędny sposób opisała dotychczasowy stan wiedzy z zakresu antybiotykooporności, co budzi mój niedosyt. Autorka mogła podjąć się bardziej wnikliwej analizy dostępnej literatury naukowej oraz danych statystycznych związanych z tym zagadnieniem ze szczególnym podkreśleniem problemu oporności na antybiotyki β -laktamowe. Wiedza ta powinna stanowić uzupełnienie podrozdziału „1.1.4. Rodzaje β -laktamaz oraz ich mechanizmy działania”, pozwalając docenić nowatorski charakter przeprowadzonych badań. W podrozdziale „1.2.5. Cel i zakres wykorzystania PHA oraz jego pochodnych w pracy badawczej” Pani mgr Justyna Prajsnar w sposób przekonujący uzasadniła celowość zastosowania monomerów PHA do modyfikacji kwasu 6-aminopenicylanowego. Jednakże, brakuje analogicznego podrozdziału wyjaśniającego cel i zakres wykorzystania penicyliny G. Niemniej jednak chciałabym podkreślić, że w pozostałych częściach „Wstępu teoretycznego” Doktorantka w sposób szczegółowy oraz zrozumiały opisuje obecny stan wiedzy na temat antybiotyków β -laktamowych oraz PHA, co świadczy o bardzo dobrej

znajomości tej problematyki badawczej. Bez wątplenia jest to wartościowy przegląd literatury ściśle związany z tematyką opisanych prac badawczych.

W kolejnym rozdziale sformułowano „**Cel naukowy badań**”, który jest ambitny i został poprawnie napisany. Oprócz celu rozprawy mogłyby również zostać przedstawione hipotezy badawcze związane z wykonanymi pracami badawczymi w świetle danych literaturowych przedstawionych w rozdziale „Wstęp teoretyczny”.

Następnie Pani mgr Justyna Prajsnar opisuje „**Badania własne**” poprzedzając opis uzyskanych rezultatów prac badawczych wraz z dyskusją, krótkim wprowadzeniem oraz opisem materiałów i metod. Pierwsze zadanie badawcze (rozdział 3.1.) dotyczyło otrzymania wybranych modyfikatorów dla kwasu 6-aminopenicylanowego. Doktorantka wykorzystała dwa typy różnych strukturalnie PHA, a mianowicie poli-3-hydroksynonanian [P(3HN)] z grupy polimerów alifatycznych oraz poli-3-hydrokso-5-fenylwalerian [P(3H55PV)] z grupy aromatycznej. Polimery te zostały otrzymane na drodze biologicznej z wykorzystaniem różnych strategii hodowlanych, natomiast w wyniku syntezy chemicznej otrzymano odpowiedniki monomerów PHA. P(3HN) otrzymano w hodowli *Pseudomonas putida* KT2440 w warunkach niedoboru fosforanów z wykorzystaniem mieszaniny kwasu nonanowego oraz kwasu masłowego w proporcji 4:1. Dlaczego zdecydowano się na wybór powyższego rodzaju limitacji? Czy proporcja poszczególnych kwasów zastosowanych jako źródło węgla została wcześniej zoptymalizowana? Z kolei producentem polimeru aromatycznego była *Pseudomonas putida* CA3 hodowana w pożywce z ograniczonym stężeniem źródła azotu z wykorzystaniem soli sodowej kwasu 5-fenylwalerianowego jako substratu. Również tutaj brakuje szerszego uzasadnienia zastosowanego typu stresu pokarmowego. Ponadto, w Tabeli 3 niezbyt precyzyjnie określono typ hodowli prowadzonej w kierunku produkcji polimeru alifatycznego – zapis „hodowla okresowa z zasilaniem” wymaga uszczegółowienia. Ponadto, z opisu wynika, że hodowle inokulacyjne, hodowle w kolbach oraz w bioreaktorze różniły się między innymi rodzajem zastosowanego źródła azotu. Z czego wynikają te różnice? W hodowli w bioreaktorze stężenie tlenu rozpuszczonego było utrzymywane na poziomie 20%. Czy można stwierdzić, że oprócz niedoboru fosforanów w medium hodowlanych były warunki limitacji tlenu? Czy mogły one wpłynąć na poziom syntezy i kumulacji PHA przez komórki bakteryjne? Nie wyjaśniono również dlaczego fermentację w bioreaktorze zakończono w 31 h. W podrozdziale 3.1.2.4. pojawiło się niefortunne sformułowanie „Zamrożone próbki z biomasa poddano liofilizacji, a następnie ważono, uzyskując przyrost suchej masy bakteryjnej...”. Prawidłowe byłoby zastąpienie słowa „uzyskując” stwierdzeniem „w celu oszacowania przyrostu...”. Ponadto, brakuje informacji w ilu powtórzeniach biologicznych wykonano hodowle w kierunku

produkcji biopolimerów. Na Rysunku 16 Doktorantka naniosa wartości odchylenia standardowego wyników uzyskanych z hodowli w bioreaktorze. Czy w związku z powyższym Autorka do obliczenia średniej stosowała dane z powtórzeń biologicznych czy też technicznych?

Kolejne zadanie badawcze (rozdział 3.2.) dotyczyło otrzymania zmodyfikowanych penicylin na drodze syntezy chemicznej oraz biosyntezy enzymatycznej, w których jako cząsteczki przyłączane do 6-APA wykorzystano pochodne PHA oraz ich odpowiedniki w formie racemicznej. Na uwagę zasługuje fakt, że obie ścieżki opracowano w sposób gwarantujący wydajną reakcję otrzymywania nowych pochodnych 6-APA przy jednoczesnym zachowaniu możliwie największego spektrum substratów do modyfikacji penicylin. Pani mgr Justyna Prajsnar z sukcesem podjęła się optymalizacji ścieżki biosyntezy pochodnych 6-APA poprzez wybór najlepszego rozpuszczalnika organicznego stanowiącego środowisko reakcji dla wybranych enzymów; optymalizację temperatury gwarantującą najefektywniejszy przebieg procesu biosyntezy unikając degradacji produktów reakcji; wybór typu modyfikatora (kwasu lub estru) cząsteczki 6-APA oraz preferowanej przez enzym formy chiralnej cząsteczki dołączonej do pierścienia β -laktamowego. Wyniki otrzymane w ramach realizacji powyższego etapu badawczego zostały opisane skrupulatnie i nie budzą żadnych zastrzeżeń.

Ostatnim zadaniem badawczym była ocena aktywności biologicznych otrzymanych penicylin. W toku badań wyznaczono potencjał przeciwbakteryjny nowych pochodnych 6-APA oraz oceniono ich genotoksyczność i cytotoksyczność. Uzyskane wyniki potwierdziły skuteczność przeciwbakteryjną otrzymanych związków względem badanych bakterii Gram-dodatnich. Otrzymane nowe penicyliny nie były skuteczne wobec *K. pneumoniae* ATCC 700603 wyposażonej w β -laktamazę typu SHV-18, a także wobec szczepu wzorcowego *P. aeruginosa* ATCC 27853 posiadającego chromosomalną cefalosporynazę AmpC. Co najważniejsze, otrzymane nowe penicyliny nie wykazywały cytotoksyczności względem mysich embrionalnych fibroblastów MEF 3T3, a ich genotoksyczność była niższa w porównaniu z komercyjnymi antybiotykami. Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka przy wyborze stężeń nowych pochodnych 6-APA do określenia powyższych aktywności biologicznych ?

Rozdział „**Badania własne**” kończy „*Podsumowanie globalne wyników pracy eksperymentalnej*”, w którym Doktorantka opisuje rezultaty uzyskanych wyników badań oraz potwierdza, że postawiony cel badawczy został zrealizowany.

W moim odczuciu w przedłożonej rozprawie doktorskiej brakuje odrębnego rozdziału „Dyskusja”, w którym Doktorantka skonfrontowałaby wszystkie otrzymane wyniki z danymi z piśmiennictwa. Ponadto, potwierdziłaby w sposób jednoznaczny ich spójność, a co

najważniejsze dowiodłaby swoich umiejętności analitycznych. Niemniej jednak chciałabym podkreślić, że przyjęty przez Doktorantkę sposób zaprezentowania wyników potwierdza istotny wkład zrealizowanych prac badawczych w poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat możliwości otrzymywania nowych antybiotyków.

Podsumowanie i konkluzja końcowa

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr Justyny Prajsnar uważam, że podjęty przez Nią temat badawczy ma charakter nowatorski, a uzyskane wyniki są wartościowe i stanowią cenny wkład w rozwój wiedzy nad nowymi związkami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Autorka udowodniła, że dysponuje odpowiednimi umiejętnościami badawczymi, które umożliwiły uzyskanie danych o dużym potencjale aplikacyjnym. Chciałabym również podkreślić, że zastosowany szeroki zakres metod badawczych oraz ich prawidłowe dostosowanie do postawionego celu naukowego wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki. W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa jest dowodem dojrzałości naukowej Pani mgr Justyny Prajsnar oraz Jej odpowiedniego przygotowania merytorycznego i warsztatowego. Powyższe spostrzeżenia nie umniejszają wartości naukowej rozprawy doktorskiej, a jedynie są dobrym punktem do rozpoczęcia dyskusji podczas obrony dysertacji.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Prajsnar pt. „Opracowanie ścieżki chemicznej oraz enzymatycznej modyfikacji grupy aminowej kwasu 6-aminopenicylanowego poprzez wprowadzenie do cząsteczki 3-hydroksykwasów pochodzenia bakteryjnego” spełnia kryteria określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (t.j. Dz. U. 2022, poz. 574 z późn. zm.).

W związku z powyższym, przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk wnioski o dopuszczenie Pani mgr Justyny Prajsnar do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ur nab: inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. uczelni