UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

PRACOWNIA BIOLOGII FARMACEUTYCZNEJ I BIOTECHNOLOGII
KATEDRA I ZAKŁAD KOSMETOLOGII PRAKTYCZNEJ I PROFILAKTYKI CHORÓB SKÓRY

Collegium Pharmaceuticum
ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel. +48 61 641 85 18
fax -
e-mail: jbudzian@ump.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.:
"Badania fitochemiczne ziela okrężnicy bagiennej *Hottonia palustris* L. oraz ocena jej aktywności biologicznej"
wykonanej przez mgr Jakuba Władysława Strawę
pod kierunkiem dr hab. Michała Tomczyka
w Zakładzie Farmakognozji
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

OCENA FORMALNA

Rozprawa doktorska ma formę powiązanego tematycznie cyklu 3 publikacji, w tym 2 doświadczalnych i 1 przeglądowej, w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, ogłoszonych w latach 2021-2022, których dane bibliograficzne i bibliometryczne podane są poniżej (* autor korespondencyjny).

Publikacje oryginalne:

Publikacja 1
Strawa J.W., Jakimiuk K., Szoka Ł., Brzezinski K., Drozdzal P., Pałka J.A., Tomczyk M*.
New polymethoxyflavones from *Hottonia palustris* evoke DNA biosynthesis-inhibitory activity in an oral squamous carcinoma (SCC-25) cell line.
Molecules 2022; 27, 4415. DOI: 10.3390/molecules27144415
IF: 4,927, punktacja MEiN: 140 pkt, cytowania Web of Science/SCOPUS = 0/1

Publikacja 2
Strawa J.W., Jakimiuk K., Kita Z., Tomczyk M*.
In vitro screening for anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities of *Hottonia palustris* L. extracts and their unusual flavonoids.
Molecules 2022; 27, 8034. DOI: 10.3390/molecules27228034
IF: 4,927, punktacja MEiN: 140 pkt, cytowania Web of Science/SCOPUS = 0/0

Publikacja przegladowa:

Publikacja 3
Strawa J.W., Jakimiuk K., Tomczyk M*.
Zapotin, a polymethoxyflavone, with potential therapeutic attributes. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22, 13227. DOI: 10.3390/ijms222413227
IF: 6,208; punktacja MEiN: 140 pkt, cytowania Web of Science/SCOPUS = 6/7 1.

Sumaryczne dane naukometryczne ww publikacji wynoszą: Sumaryczny Impact Factor wynosi IF=16.062; sumaryczna punktacja MNiSW wynosi 420 pkt.

Rozprawa doktorska składa się z kopii wyżej wymienionych publikacji, poprzedzonych rozdziałami, które w zwięzły i syntetyczny sposób przedstawiają podstawy teoretyczne i wyniki zawarte w publikacjach doktorskich, wraz z dyskusją i odniesieniami do literatury naukowej.

Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich publikacji, a autorem korespondencyjnym jest promotor.
Z oświadczeń doktoranta i współautorów tych publikacji wynika, że udział doktoranta jest dominujący.
Wkład doktoranta w cyklu publikacji polegał na przeprowadzeniu prac doświadczalnych fitochemicznych, w tym wyodrębienia związków, ich krystalizacji i ustalenia struktury chemicznej, analiz jakościowych i ilościowych HPLC wraz z ich walidacją, przygotowaniu próbek związków i ekstraktów do badań biologicznych oraz udziale w opracowaniu powstałych wyników.

Z kolei udział współautorów tych publikacji polegał na wykonaniu, bądź pomocy w wykonaniu analiz krystalograficznych (dr Paweł Drożdżal, dr hab. Krzysztof Brzeziński), analiz cytotoksyczności i wpływu na syntezę DNA w liniach komórkowych (dr Katarzyna Jakimiuk, dr Łukasz Marek Sroka), oznaczeń ilościowych metodą spektrofotometryczną, aktywności antyoksydacyjnej metodami DPPH, APTS, FRAP i CUPRAC (dr Katarzyna Jakimiuk) oraz korekcie ostatecznej wersji manuskryptu (prof. Jerzy Aleksander Pałka).

Publikacja przeglądowa pokrywa część teoretyczną rozprawy doktorskiej, natomiast publikacje oryginalne zawierają całość części doświadczalnej tej rozprawy. Rozdziały spinają te części w jedną całość, stanowiąc komentarz i podsumowanie wyników opisanych w publikacjach. Tak więc rozprawa doktorska ma najlepszą możliwą formę, gdyż została w całości opublikowana w punktowanych czasopismach.

OCENA MERYTORYCZNA

Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

Tytułowa roślina – *Hottonia palustris* L. (okrężnica bagienna) z rodziny Primulaceae (pierwiosnkowate) jest jedynym w Polsce przedstawicielem rodzaju *Hottonia* L. i występuje w środowisku wodnym. Zastosowanie lecznicze, ograniczone w medycynie ludowej do bliżej niesprecyzowanego działania w chorobach serca oraz alternatywnej metody terapeutycznej – terapii kwiatowej Edwarda Bacha. Bardziej wyraźne jest zastosowanie w kosmetologii (INCI: HOTTONIA PALUSTRIS FLOWER EXTRACT) oraz jako rośliny ozdobnej do tzw. oczek wodnych lub akwariów. Jej skład chemiczny jest słabo poznany – dotąd wykryto w nim trzy saponiny charakterystyczne dla pokrewnego rodzaju *Primula* L. i obecność bliżej nieokreślonych flawonoidów, antocyjanów, kwasów fenolowych. Związki 2-4 opisane w ocenianej dysertacji wykazały w innych badaniach umiarkowaną aktywność inhibitorów tyrozynazy (IC_{50} = 120-127 μM; substancja referencyjna - kwas kojowy IC_{50}=49.48 μM). Dwie polimorficzne struktury związku 1 zostały przeanalizowane metodami krystalograficznymi również w innych badaniach.

Oceniana rozprawa doktorska zawiera: (i) badania doświadczalne fitochemiczne obejmujące izolację i ustalenie struktury związków flawonoidowych oraz analizy ich zawartości, (ii) badania doświadczalne aktywności biologicznej *in vitro* działania na linię komórek nowotworowych i komórki prawidłowe oraz działania hamującego procesy neurodegeneracyjne w modelu hamowania acetylocholinesterazy i działania przeciwutleniającego.

W świetle powyższych danych, zarówno wybór rośliny, jak i zakres szeroko założonych badań własnych, jest bardzo trafny, w pełni uzasadniony i wielce oryginalny.

Ponadto, podjęta tematyka rozprawy doktorskiej, zmierzająca do znalezienia nowych związków pochodzenia naturalnego o potencjalnym znaczeniu leczniczym – przeciwnowotworowym i neuroprotekcyjnym, odpowiada dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu i dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Ocena uzyskanych rezultatów i ich znaczenie dla nauki

Ocena szczegółowa

W dysertacji doktorskiej przeprowadzono dwa kierunki badań doświadczalnych - fitochemiczne i biologiczne.

Pierwszy etap stanowiły badania fitochemiczne opisane w publikacjach 1 i 2.

Materiał do badań stanowiły pędy *Hottonia palustris* zebrane przed kwitnieniem na podmokłych terenach Puszczy Knyszyńskiej, na przełomie kwietnia i maja 2019 r., i wysuszone w cieniu, w temperaturze otoczenia. Z małych porcji tego materiału doktorant przygotował ekstrakty - metanolowy (HP1), 50% wodno-metanolowy (HP2) i wodny (HP3), metodą ekstrakcji ultradźwiękowej. Natomiast z dużej porcji materiału roślinnego przygotował następujące ekstrakt: najpierw benzynowy (HP6), chloroformowy (HP7) metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta i następnie ekstrakty – metanolowy i 50% wodno-metanolowy w drodze ekstrakcji pod chłodnicą zwrotną. Z połączonych dwóch ostatnich wymienionych ekstraktów otrzymał frakcje – chloroformową (HP8), octanowo-etylową (HP4), butanolową (HP5) i wodną metodą ekstrakcji ciecz-ciecz. Wszystkie ekstrakty i frakcje zawieszał w wodzie, zamrażał i liofilizował.

Z ekstraktu benzynowego (?) rozdzielanego na kolumnie z Sefadeksem LH20, eluowanym mieszaniną chloroform-metanol (3:2), wydzielił frakcję flawonoidów. Z frakcji tej, metodą chromatografii kolumnowej

na żelu krzemionkowym eluowanym gradientem heksan→octan etylu, wyodrębnił trzy znane związki - 1,3-difenylopropano-1,3-dion (dibenzoilometan) (**1**), 5-hydroksyflawon (primuletyna) (**2**) i 5-hydroksy-2'-metoksyflawon (**3**), oraz cztery dotąd nieznane związki - 5-hydroksy-2',6'-dimetoksyflawon (**4**), 5-hydroksy-2',3',6'-trimetoksyflawon (**5**), 2',5-dihydroksy-6-metoksyflawon (**6**) i 5,6'-dihydroksy-2',3'-dimetoksyflawon (**7**).

Z frakcji chloroformowej (HP8), rozdzielanej na złożu RP-18 eluowanym różnymi stężeniami metanolu, wyodrębnił frakcję flawonoidową, a z niej, po preparatywnej chromatografii RP-HPLC i krystalizacji, dalsze związki: 5,6,2',6'-tetrametoksyflawon (zapotyna) (**8**), 2'-O-β-glukopiranozyd 5,2'-dihydroksyflawonu (**9**), 6-O-(6''-O-glukopiranozylo)-β-glukopiranozyd 5,6-dihydroksyflawonu (hottoniozyd A) (**10**), 5,2'-dihydroksyflawon (**11**), 5,6-dihydroksyflawon (**12**) i 5,7-dihydroksyflawon (chryzyna) (**13**).

Następnie, z frakcji butanolowej (HP5), na kolumnie ze złożem C18, przemywanym gradientem woda→metanol, wydzielił dalszy flawonoid - 7-O-(2''-O-β-glukuronozylo)-β-glukopiranozyd apigeniny (**14**) oraz mieszaninę, z której po preparatywnej chromatografii RP-18 HPLC (ziarno 5 μm) wyodrębnił 3-O-(6''-O-α-ramnopiranozylo)-β-glukopiranozyd kemferolu (nikotyfloryna) (**15**), 3-O-(6''-O-β-ksylopiranozylo)-β-glukopiranozyd kempferolu (**16**), kempferol (**17**), 3-O-(6''-O-β-ksylopiranozylo)-β-glukopiranozyd kwercetyny (**18**) oraz 3-O-(6''-O-α-rhamnopiranozylo)-β-glukopiranozyd kwercetyny (rutozyd, rutyna) (**19**). Związki **9**, **10**, **14** są nowe, dotąd nieznane. Ważnym etapem oczyszczania wielu wyodrębnionych związków była ich krystalizacja z różnych rozpuszczalników. Wydajność izolacji wahała się w zakresie 12 – 729 mg. Stwierdził 98% czystość związków metodą HPLC. Struktury chemiczne związków **1–19** ustalił metodami spektralnymi, w tym za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS, pomiar masy monoizotopowej jonu pseudomolekularnego $[M-H]^-$ i jonów fragmentacyjnych) oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), jednowymiarowego (1D-NMR: ^1H, ^{13}C, DEPT) i dwuwymiarowego (2D-NMR) korelacji homojądrowej (HH-COSY, ROESY) i heterojądrowej (HSQC, HMBC), a także spektrometrii UV z diagnostycznymi odczynnikami. Związki **2–7** zostały poddane także analizie krystalograficznej. W przypadku glikozydów zastosował analizę produktów rozszczepienia hydrolitycznego kwasem - LC-PAD-MS dla aglikonów i kochromatografię TLC ze wzorcami dla cukrów. Doktorant scharakteryzował też wyodrębnione związki przez pomiar temperatury topnienia, skręcalności optycznej, a w przypadku kilku związków, również wyznaczenie współczynników pKa, logP i logS.

W toku dalszych prac doktorant oznaczył zawartość związków **1–7** w ekstraktach za pomocą zwalidowanej metody HPLC-DAD stosując bardziej polarną kolumnę C8 (ziarno 1,7 μm) zamiast standardowej C18, co pozwoliło na użycie fazy ruchomej o mniejszej zawartości rozpuszczalników organicznych.

Z kolei analiza LC-PDA-HRESIMS pozwoliła na identyfikację 31 związków – flawonoidów i triterpenów.

Ponadto, oznaczono w ekstraktach i frakcjach z *H. palustris* całkowitą zawartość fenoli, flawonoidów, kwasów fenolowych i garbników.

Drugi etap stanowiły badania aktywności biologicznej.

Pierwszy rodzaj tych badań dotyczył wpływu ekstraktów HP1, HP6-8 i związków **1-8** z *H. palustris* na linię komórek raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (SCC-25) i normalnych fibroblastów ludzkiej skóry – najpierw analizy ich cytotoksyczności metodą MTT, a następnie oceny wpływu na biosyntezę DNA. Najbardziej aktywne wśród związków były: dibenzylometan (**1**) i zapotyna (**8**) (IC_{50} 29,1 i 20,33 μM), a wśród ekstraktów, – ekstrakt benzynowy (HP6) (IC_{50} 14,9 μg/ml), przy czym IC_{50} cisplatyny, jako leku referencyjnego, wynosiło 7.58 μM = 2,28 μg/ml). Aktywność ekstraktów korelowała z zawartością w nich zapotyny. Wszystkie badane związki i ekstrakty (z wyjątkiem HP7) były nietoksyczne dla komórek normalnych fibroblastów (IC_{50} > 200 μM lub μg/ml).

Drugi rodzaj badań biologicznych dotyczył wpływu hamującego związków **1-19** na acetylocholinesterazę. Wśród związków najsilniejsze działanie wykazał dibenzoilometan (**1**) - IC_{50} =144,83 μM, pozostałe związki wykazały ograniczoną aktywność. Spośród ekstraktów najsilniejszym inhibitorem był ekstrakt 50% metanolu (HP2), a nieaktywne były wodny (HP3) i butanolowy (HP5). Galantamina, jako lek referencyjny, wykazała IC_{50} = 91,23 μM.

Równolegle przeprowadzono analizę potencjału antyoksydacyjnego wszystkich związków czterema metodami: DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC.

Trzecia publikacja dotyczy przeglądu doniesień literaturowych, w liczbie 69 pozycji, na temat flawonu – zapotyny. Przedstawiono w niej występowanie tego związku, analizę struktury chemicznej, syntezę chemiczną, techniki analizy w materiale roślinnym, metody wyodrębniania i aktywność biologiczną.

Podsumowanie oceny

Reasumując, w ocenianej rozprawie doktorskiej przeprowadzono rozległe, bardzo wnikliwe badania doświadczalne z zakresu fitochemii i wybranej aktywności biologicznej.

Doktorant przeprowadził proces wyodrębniania związków w niezwykle sprawny, systematyczny sposób, ściśle powiązany z chromatografią analityczną. Związki uzyskał już po drugiej kolumnie, przy czym dla końcowego oczyszczanie zastosował krystalizację. która jest najlepszym sposobem uzyskania czystego produktu. O ile metody analizy struktury chemicznej opierają się na logicznych regułach, to wyodrębnianie związków z materiału roślinnego jest połączeniem sztuki i wiedzy, a w przypadku krystalizacji wymagają też intuicji i umiejętności manualnych. Co godne uwagi, w analizie związków zastosował On nie tylko nowoczesne metody MS i NMR, ale też klasyczną analizę, jak diagnostyczne przesunięcia w widmach UV czy pomiar temperatury topnienia. Znalazł też nowe, dotąd nieznane związki, co najbardziej dobitnie świadczy, że Pan Jakub W. Strawa jest pierwszorzędnym fitochemikiem. Doniosłym osiągnięciem jest odkrycie, że roślina *Huttonia palustris* jest nowym, obecującym źródłem przeciwnowotworowego flawonoidu – zapotyny.

Oceniana rozprawa doktorska stanowi znaczne osiągnięcie naukowe w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Nie podważają tej opinii poniższe uwagi.

1) Nie podano z jakiego ekstraktu zostały wyodrębnione związki **1-7** (prawdopodobnie benzynowego).
2) Dla związku **2**, czyli 5-hydroksyflawonu podano, że przesunięcie z $AlCl_3$ w UV było nietrwałe w obecności HCl, co jest nieprawdopodobne, i wg literatury (Mabry et al. 1970) jest ono trwałe.
3) Dla niektórych związków zmierzono skręcalność optyczną pomimo, że nie mają one chiralnego atomu węgla (jak flawanony, flawany czy glikozydy). Może warto byłoby wyjaśnić dlaczego.
4) Pominięto, z czego i jak, został wyodrębniony kemferol (związek **17**).
5) Porównanie wartości IC_{50} cisplatyny i aktywnych ekstraktów trzeba zweryfikować, ponieważ wartość IC_{50} w µg/ml i w µM liczbowo istotnie różni się. Poza tym ciekawe wyniki możnaby uzyskać przez porównanie IC_{50} w µg/ml związków (zwłaszcza zapotyny) i ekstraktów.

Doktorant jest absolwentem Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (UMB) (2009-2015 r.). Wykonał pracę magisterską z zakresu fitochemii. Od 1.10.2015 r. pracuje w Zakładzie Farmakognozji UMB.

Pozostały dorobek naukowy Doktoranta obejmuje współautorstwo 26 publikacji w czasopismach naukowych oraz 48 doniesień zjazdowych i posiada punktację IF=123,835, MEiN 2760, h-indeks 7(8). Był On kierownikiem 4-ch, współkierownikiem 1-ej i współwykonawcą 14-tu projektów naukowych. Odbył 3 staże naukowe krajowe w WUM i Politechnice Łódzkiej. Uczestniczył w licznych kursach i szkoleniach naukowych (6) i dydaktycznych (4). Jest opiekunem koła STN przy macierzystym zakładzie (2017-nadal) , praktyk zawodowych na kierunku Analityka medyczna oraz opiekunem prac magisterskich. Otrzymał 4 nagrody Rektora UMB, w tym 3 naukowe (Ist. x2, IIst. x1; 2020, 2021 r.) i 1 dydaktyczną (IIst., 2021 r.).

WNIOSEK KOŃCOWY

Rozprawę doktorską mgr Jakuba W. Strawy oceniam jako wybitną i uważam, że zasługuje ona na wyróżnienie, o co niniejszym wnioskuję. Uważam, że mgr Jakub W. Strawa w pełni zasługuje na stopień doktora. Podjęta tematyka rozprawy doktorskiej, dotycząca znalezienia nowych związków pochodzenia naturalnego o potencjalnym znaczeniu leczniczym, odpowiada dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu i dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Rozprawa doktorska w pełni spełnia wymagania Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14.03.2003 r. oraz Ustawy prawo o szkolnictwie wyższym z 20.07.2018 r.

Zwracam się do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o nadanie stopnia doktora Panu Jakubowi Władysławowi Strawie.

J. Budzianowski

Poznań, 21 marca 2023 r. prof. dr hab. n. farm. Jaromir Budzianowski