

RECENZJA**rozprawy doktorskiej mgr farm. Jakuba Władysława Strawy****pt. „Badania fitochemiczne ziela okrzężnicy bagiennnej *Hottonia palustris* L. oraz ocena jej aktywności biologicznej”****wykonanej w Zakładzie i Katedrze Farmakognozji
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku****pod kierunkiem****dr hab. n. farm. Michała Tomczyka**

Mimo intensywnego rozwoju syntezy organicznej oraz włączenia sztucznej inteligencji w projektowanie leków, świat roślin z jego niezrównaną bio- i chemoróżnorodnością nadal stanowi istotną inspirację w tym procesie. Zazwyczaj nowych struktur poszukuje się wśród składników substancji roślinnych uznanych i szeroko stosowanych w tzw. medycynie tradycyjnej, której doświadczenia pozwalają wskazać potencjalne źródła wysoce aktywnych molekuł. W ostatnim czasie zwraca się jednak coraz większą uwagę na rośliny rzadziej wykorzystywane w leczeniu tradycyjnym, bytujące na trudno dostępnych stanowiskach lub w ekstremalnych warunkach środowiskowych, np. na terenach bagiennych, pustynnych, o wysokim zasoleniu gleby, niskim nasłonecznieniu, czy w strefie polarnej. Przeżycie roślin w takich warunkach jest uwarunkowane wykształceniem specyficznej palety metabolitów wyspecjalizowanych, wśród których możemy poszukiwać wysoce aktywnych cząsteczek ze znacznym prawdopodobieństwem sukcesu. Stąd też istotnym kierunkiem rozwoju współczesnej farmakognozji są badania metabolomiczne roślin leczniczych środowisk ekstremalnych, które rozszerzone o analizy aktywności biologicznej i weryfikację bezpieczeństwa stosowania mogą dać impuls do opracowania innowacyjnych preparatów leczniczych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się doskonale w te trendy. Przedmiotem pracy była bowiem interesująca roślina wodna, występująca na terenach zalewowych, bagiennych i w płytkich zbiornikach, tj. okrzężnica bagienna *Hottonia palustris* L. z rodziny Primulaceae. Celem rozprawy była szczegółowa charakterystyka składu chemicznego ziela *H. palustris*, w tym analiza metabolomiczna z izolacją i określeniem struktury związków czynnych oraz przesiewowe badania aktywności biologicznej ekstraktów, wzbogaconych frakcji i wyizolowanych składników substancji roślinnej. Efektem realizacji rozprawy było m.in. wyizolowanie z materiału roślinnego siedmiu nowych związków naturalnych, w większości reprezentujących rzadką w przyrodzie grupę wolnych, lipofilowych flawonów. Tego rodzaju związki wzbudzają duże zainteresowanie nauki z uwagi na potencjalnie szerokie możliwości zastosowania i funkcjonalizacji wynikające z ich specyficznych właściwości fizyko-chemicznych oraz przewag farmakokinetycznych w stosunku do najpopularniejszych w świecie roślinnym glikozydów polihydroksylowanych flawonoli.

W tym świetle, tematykę rozprawy doktorskiej mgr Jakuba Strawy należy uznać za istotną i aktualną, a cele za uzasadnione i sformułowane w odpowiedzi na przesłanki wynikające zarówno z dotychczas nagromadzonej wiedzy, jak i z myślą o dalszych pracach badawczych, zmierzających nie tylko do weryfikacji wartości fitoterapeutycznej gatunku *H. palustris*, lecz także do pogłębienia wiedzy na temat potencjału leczniczego lipofilowych flawonów.

Charakterystyka i ogólna ocena rozprawy oraz pozostałej działalności naukowej Doktoranta

Rozprawa doktorska mgr farm. Jakuba Strawy została przedstawiona w formie zbioru powiązanych tematycznie dwóch oryginalnych artykułów eksperymentalnych i jednego artykułu przeglądowego, opublikowanych w latach 2021-2022 w recenzowanych czasopismach o zasięgu światowym, notowanych w *Journal Citation Reports* (JCR), tj. *Molecules* (2 prace) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (1 praca). Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF prac tworzących zbiór wynosi 16,062, zaś punktacja MEiN 420, co jest wartością budzącą uznanie i wskazującą na wysoką wartość naukową rozprawy.

Wszystkie prace zbioru doktorskiego są zespołowe, a Doktorant jest ich pierwszym autorem. Zarówno Doktorant, jak i pozostali współautorzy złożyli komplementarne oświadczenia potwierdzające, że Jego wkład w powstanie poszczególnych prac był wiodący i możliwy do wyodrębnienia. Wkład ten został oszacowany przez Doktoranta na 60-75% i obejmował Jego zaangażowanie zarówno w formułowanie koncepcji badawczej, przegląd i analizę danych literaturowych oraz przygotowanie manuskryptów, jak i w praktyczną stronę realizacji eksperymentów, w szczególności w części pozyskania materiału badawczego, badań fitochemicznych i spektralnych oraz analizy i interpretacji wyników. Wobec stosunkowo nielicznego zespołu współautorów (7) oraz szerokiego zakresu przeprowadzonych badań, deklaracja Doktoranta, co do jego procentowego wkładu autorskiego nie budzi żadnych wątpliwości.

Rozprawa doktorska mgr Jakuba Strawy zawarta jest na 159 stronach i oprócz reprintów trzech źródłowych artykułów w języku angielskim wraz z suplementami zawiera także wykaz przedmiotowych publikacji, krótkie wprowadzenie w tematykę rozprawy, cel pracy, zwięzłe omówienie stosowanych metod badawczych i uzyskanych wyników z dyskusją, listę cytowanych pozycji piśmiennictwa (49) oraz streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim. Całość zamykają oświadczenia współautorów poszczególnych prac oraz CV zawodowe z wykazem dotychczasowych osiągnięć naukowych Doktoranta.

Zgodnie z obranym celem pracy, w pierwszym etapie badań Doktorant skupił się na charakterystyce fitochemicznej ekstraktów pozyskanych z ziela *H. palustris*, w tym przede wszystkim na izolacji i identyfikacji strukturalnej obecnych w materiale roślinnym metabolitów specyficznych. Zagadnienia te zostały przedstawione w **publikacjach I** (*Molecules*, 2022, 27, 4415) i **II** (*Molecules*, 2022, 27, 8034) oraz w dołączonych do nich obszernych suplementach. W tej części pracy, mgr Strawa wykazał się znajomością całego wachlarza nowoczesnych technik separacji i identyfikacji strukturalnej związków naturalnych, w tym chromatografii preparatywnej (HPLC, MPLC i grawitacyjnej chromatografii kolumnowej); analitycznych, chromatograficznych technik sprzężonych, jak HPLC-PDA-HRMS; spektroskopii UV-vis; jedno- i dwuwymiarowej spektrometrii NMR (^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HSQC, HMQC, HMBC, DEPT, ROESY) oraz krystalografii. Efektem badań było wykrycie w ekstraktach i wstępna identyfikacja w sumie 29 różnych związków naturalnych, przede wszystkim o charakterze fenoli i polifenoli, w tym 9 flawonoli oraz 15 flawonów, wśród których dominowały (10) wolne, lipofilowe aglikony. Pełna identyfikacja struktury większości z tych związków wymagała ich izolacji z materiału roślinnego – Doktorantowi udało się wyodrębnić 19 z nich, w tym 7 nowych struktur chemicznych, które po szczegółowych badaniach spektralnych zidentyfikował jako 5-hydroksy-2',6'-dimetoksyflawon; 5-hydroksy-2',3',6'-trimetoksyflawon; 2',5-dihydroksy-6'-metoksyflawon; 5,6'-dihydroksy-2',3',-dimetoksyflawon oraz trzy glikozydowe pochodne 5,2'-dihydroksyflawonu; 5,6-dihydroksyflawonu i apigeniny. Oprócz nowych związków naturalnych, Doktorant wyodrębnił również z badanego materiału roślinnego związki rzadkie w przyrodzie, m.in. zapotyńę (5,6,2',6',-tetrametoksyflawon), uzupełniając w dwóch przypadkach brakujące literaturowe dane spektralne dla tych molekuł.

Izolacja aż siedmiu nowych związków naturalnych stanowi wybitne osiągnięcie Doktoranta, wymagające szczególnego podkreślenia. Warto zauważyć, że w dobie powszechnego stosowania technik chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią selektywności masy, coraz mniej zespołów naukowych podejmuje się praco- i czasochłonnych badań izolacyjnych, poprzestając jedynie na częściowej identyfikacji składników ekstraktów roślinnych techniką LC-MS/MS lub LC-HRMS z wykorzystaniem substancji wzorcowych lub baz

danych. O ile jednak dla substancji roślinnych zawierających powszechnie spotykane składniki, uzyskane tą drogą wyniki mogą być zadowalające, to w przypadku związków rzadkich często okazują się nieskuteczne a uzyskiwane informacje strukturalne szczątkowe. Oprócz istotnej roli w analizie jakościowej, izolacja związków z materiału roślinnego jest również niezbędna dla weryfikacji ich efektywności działania, ustalenia głównych składników czynnych substancji roślinnej, ich parametrów farmakokinetycznych oraz relacji struktura-aktywność, kluczowych dla dalszych badań aplikacyjnych. Podjęcie przez Doktoranta trudu izolacji składników badanej substancji oceniam, zatem wysoko, nie tylko z uwagi na wniesienie istotnych elementów nowości naukowej, ale także na otwierające się dzięki temu dalsze perspektywy badawcze, z których część już została przez Kandydata wykorzystana w kolejnych etapach realizacji projektu doktorskiego.

Wartość naukową rozprawy mgr Jakuba Strawy w aspekcie izolacji związków naturalnych podnosi szczegółowa dokumentacja przeprowadzonych badań strukturalnych. Oprócz podstawowych danych spektralnych, w tym przypisania sygnałów w widmach ^1H NMR i ^{13}C NMR, do prac źródłowych dołączono obszerne suplementy zawierające reprinty widm UV-vis, MS oraz 1D i 2D NMR (34 i 44 ryciny, odpowiednio dla **publikacji I i II**), które pozwalają czytelnikowi na samodzielną weryfikację przypisań i potwierdzają deklarowaną czystość związków, stanowiąc tym samym wartościowy i transparentny materiał eksperymentalny. Warto podkreślić, że poza szczegółową charakterystyką spektralną, Doktorant załączył w pracy także dane fizykochemiczne dla wybranych związków wyizolowanych, takie jak logP, pKa i logS (**publikacja II**), które są pomocne w ocenie potencjalnych losów substancji badanej w organizmie. Szkoda jednak, że ww. parametry nie zostały wyznaczone dla wszystkich, w szczególności nowych związków, a Doktorant nie pokusił się o dyskusję otrzymanych wyników w tym zakresie.

Drugi etap pracy mgr Strawy wiązał się ze standaryzacją ilościową ekstraktów otrzymanych z ziela *H. palustris* do celów badań skrinningowych. Doktorant przygotował z materiału roślinnego trzy ekstrakty podstawowe, odpowiadające aktywnej matrycy roślinnej (metanolowy, metanolowo-wodny i wodny) oraz pięć ekstraktów/frakcji uzyskanych poprzez frakcjonowanie materiału roślinnego rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności. Jest to ogólnie przyjęty w badaniach fitochemicznych zabieg, pozwalający uzyskać skoncentrowane frakcje związków aktywnych, pomocne w badaniach biologicznych, a w szczególności w ustaleniu składników determinujących działanie farmakologiczne substancji roślinnej. Kwestią kluczową dla interpretacji wyników badań farmakologicznych jest jednak szczegółowa charakterystyka jakościowa i ilościowa ekstraktów. Pierwszy z tych elementów Doktorant doskonale zrealizował poprzez izolację i określenie struktury głównych metabolitów oraz analizę profilu ekstraktów techniką LC-PDA-HRMS z wykorzystaniem wyodrębnionych wzorców i danych literaturowych. W drugim etapie badań, profil ilościowy ekstraktów Doktorant badał z wykorzystaniem palety metod spektrofotometrycznych celem oceny całkowitej zawartości dominujących grup metabolitów wtórnych, a następnie zawartość związków wiodących oznaczył zoptymalizowaną i poddaną walidacji metodą HPLC-PDA. Wyniki tej części analiz zostały przedstawione w **publikacjach I i II**. Wszystkie analizy Doktorant przeprowadził po raz pierwszy ustalając, że części nadziemne *H. palustris* stanowią obiecujące źródło lipofilowych flawonów, w szczególności zapotyny, oraz że związki te mogą być selektywnie ekstrahowane z materiału roślinnego przez ekstrakcję rozpuszczalnikami lipofilowymi, tj. benzyną ekstrakcyjną i chloroformem, co ma istotne znaczenie aplikacyjne. W odpowiednich frakcjach HP6 i HP7 całkowita zawartość wynosiła 33,9% i 7,6%, przy sumarycznej wydajności ekstrakcji około 10%, co oznacza wysoką, około 2,5% zawartość lipofilowych flawonów w badanym materiale.

Podobnie, jak badania jakościowe, analizy ilościowe przedstawione w rozprawie są szczegółowe i wyczerpujące, jednak dyskusji wymaga decyzja o oznaczaniu garbników i kwasów fenolowych w materiale badanym oraz dobór metody analizy całkowitej zawartości flawonoidów. W pierwszym przypadku zastanawia niewykrycie żadnych kwasów fenolowych ani prekursorów garbników metodą LC-HRMS – jak Doktorant tłumaczy tę rozbieżność? W drugim przypadku rzuca się w oczy znaczna różnica w wynikach całkowitej zawartości flawonoidów oznaczona metodą spektrofotometryczną i HPLC w badanych ekstraktach. W opinii Recenzenta, można było jej uniknąć poprzez zastosowanie w miejsce rutynowej metody kompleksowania flawonoidów z

wykorzystaniem chlorku glinu (optymalnej w przypadku analizy flawonoli), metody z kwasem borowym i szczawiowym, pozwalającej zapobiec niedoszacowaniu zawartości dominujących w *H. palustris* flawonów.

Trzeci wątek rozprawy stanowiły badania aktywności biologicznej wyizolowanych związków, ekstraktów i frakcji (**publikacje I i II**). Z uwagi na fakt, że przedmiot analiz stanowił gatunek wcześniej niebadany, Doktorant postawił w tej części na badania przesiewowe pod kątem typowej dla flawonoidów aktywności antyoksydacyjnej. Z uwagi na wysoką zawartość lipofilowych flawonów, badania zostały rozszerzone o testy zdolności analitów do bezpośredniej inhibicji enzymu acetylocholinoesterazy (AChE), wpływu na przeżywalność komórek raka płaskonabłonkowego języka (SCC-25) i fibroblastów (PCS-201-012) oraz mechanizmu działania antyproliferacyjnego, co miało uzasadnienie w literaturze przedmiotu.

W badaniach aktywności przeciwutleniającej wykorzystano proste, bezkomórkowe testy *in vitro*, tj. testy DPPH, TEAC, FRAP i CUPRAC. Uzyskane wyniki pozwoliły uszeregować ekstrakty i związki modelowe pod kątem siły działania, wykazały jednak ograniczony potencjał analitów do bezpośredniej neutralizacji oksydantów. Nie jest to zaskakujące biorąc pod uwagę, że głównymi składnikami *H. palustris* są flawony o niewielkiej liczbie wolnych grup OH, warunkujących aktywność redukującą związków flawonoidowych. W tym kontekście, bardziej miarodajne wyniki można by uzyskać wykorzystując modele komórkowe, w których metoksylovane flawony mogą wpływać na parametry wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego poprzez mechanizmy pośrednie, w tym m.in. hamowanie sekrecji reaktywnych form tlenu, a nie tylko poprzez ich bezpośrednią neutralizację.

W testach aktywności AChE wykazano umiarkowaną zdolność ekstraktów z ziela okrzężnicy i wyizolowanych związków do hamowania enzymu z wyróżniającą się efektywnością dibenzoilometanu i stosunkowo silniejszym wpływem ekstraktów w stosunku do związków izolowanych. Doktorant postawił uzasadnioną tezę, że wskazuje to na synergię działania indywidualnych składników ekstraktów. Z kolei w badaniach wpływu analitów na żywotność komórek SCC-25 i PCS-201-012 wykazano obiecującą i selektywną aktywność cytostaticzną zarówno dibenzoilometanu, jak i dwóch flawonów, tj. zapotyny (dominującego flawonoidu *H. palustris*) i 5,6'-dihydroksy-2',3',-dimetoksyflawonu, w stosunku do komórek nowotworowych i w porównaniu do referencyjnej cisplatyny, co zachęca do kontynuacji badań ww. związków w kierunku aktywności przeciwnowotworowej z wykorzystaniem większej liczby modeli, w tym modeli *in vivo*, na co słusznie wskazuje Doktorant w dyskusji.

Oprócz wymienionych dwóch publikacji eksperymentalnych, w skład zbioru doktorskiego mgr Jakuba Strawy wchodzi także praca przeglądowa dotycząca zapotyny (**publikacja III: *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, 13227**), która podsumowuje dostępne dane na temat występowania, historii badań strukturalnych, danych spektralnych, metod analizy zawartości w materiale roślinnym oraz właściwości biologicznych tego interesującego polimetoksylovanego flawonu, ze szczególnym uwzględnieniem jego aktywności przeciwnowotworowej. Jest to pozycja, która, mimo że dostępna dopiero 15 miesięcy zgromadziła już około 1900 wejść on-line i 7 cytowań indeksowanych w Web of Science, co świadczy, że była oczekiwana w środowisku naukowym i budzi znaczny oddźwięk.

Badania eksperymentalne i przeglądowe stanowiące podstawę rozprawy zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane na wysokim poziomie naukowym. Wszystkie publikacje wchodzące w skład zbioru doktorskiego stanowią starannie przygotowane, szerokie opracowania, zaopatrzone w bogatą dokumentację zebranych danych, zarówno z badań własnych, jak i literaturowych. Całość zasługuje na wysoką ocenę, choć przygotowując rozprawę Doktorant nie ustrzegł się kilku nieścisłości, w tym:

1. w przypadku niektórych z wyizolowanych związków błędnie został opisany charakter sygnałów części protonów; przykładowo, dla związku 18 (glikozydu kwercetyny), w którym protony H-2', H-5' i H-6' tworzą układ ABX z bardzo bliskimi wartościami przesunięć dla H-2' i H-6' (7,56 i 7,58 ppm), sygnał protonu H-2' został opisany jako singlet, zaś sygnał H-6' jako dublet, podczas gdy tworzą one zniekształcony multiplet powstały w wyniku nałożenia i deformacji dubletu H-2' i dubletu dubletów H-6'; w takich

wypadkach wskazane jest podawanie charakterystyki sygnałów jako multipletu. Podobnie, dla związku 9 sygnał protonu H-7 przy $\delta=7,68$ ppm opisano jako triplet, jednak podano dwie stałe sprzężenia $J=8,28$ i $J=8,16$, co wskazuje na multipletowość zgodną z oczekiwaniami, tj. występowanie dubletu dubletów (dd);

2. zastosowana do analizy aktywności przeciwutleniającej metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power) została przedstawiona jako służąca ocenie właściwości chelatujących analizowanych substancji, podczas gdy, podobnie jak metoda CUPRAC służy do oznaczania zdolności redukującej próbek;
3. w tabelach zawierających dane z analiz DPPH, ABTS i CUPRAC zabrakło informacji o sposobie wyrażenia wyników dla ekstraktów – czy dane liczbowe zostały przeliczone na 1 g czy inną jednostkę masy ekstraktu;
4. z kolei wyniki testów FRAP zostały przeliczone na jednostkę objętości ekstraktu (o nieznanym stężeniu), podczas gdy właściwsze i łatwiejsze do interpretacji byłoby ich podanie w przeliczeniu na jednostkę masy, np. 1 g.

Niezależnie od wymienionych wyżej kwestii, rozprawa doktorska mgr Jakuba Strawy stoi na wysokim poziomie naukowym i wnosi istotne elementy nowości w postaci przede wszystkim dogłębnej analizy fitochemicznej badanego gatunku, wyizolowania aż siedmiu nowych związków naturalnych oraz podania pierwszych danych na temat aktywności biologicznej ekstraktów z ziela *H. palustris* oraz jego głównych składników, które mogą stanowić punkt wyjścia dla dalszych badań. Realizacja pracy wymagała od Doktoranta opanowania szeregu nowoczesnych technik badawczych, w tym chromatograficznych (analitycznych i preparatywnych) i spektralnych, jak LC-HRMS, 1D i 2D NMR, metod krystalograficznych, metod in vitro analizy aktywności biologicznej w modelach bezkomórkowych, a także przygotowania i oczyszczania próbek. Warto podkreślić również wysoki poziom edycji rozprawy – w pracy można zauważyć jedynie nieliczne błędy literowe, czy stylistyczne.

Oprócz trzech prac tworzących cykl doktorski Kandydat jest współautorem także 26 innych artykułów naukowych a Jego całkowity dorobek osiąga imponujący łączny współczynnik oddziaływania $IF = 123,835$ (2760 pkt MEiN). Dorobek Doktoranta cieszy się istotnym oddźwiękiem w środowisku naukowym, o czym świadczy indeks Hirscha wg. WoS równy 7. Artykułom w czasopismach towarzyszą ponadto liczne doniesienia zjazdowe (48), pochodzące głównie z zagranicznych konferencji naukowych. Tak liczne prace są wynikiem szeroko zakrojonej współpracy Doktoranta z wieloma jednostkami krajowymi i zagranicznymi, czego efektem jest zgromadzenie poważnego dorobku naukowego o parametrach zazwyczaj będących udziałem kandydatów aplikujących o wyższe szczeble awansu naukowego, co zdarza się niezwykle rzadko i zdecydowanie wyróżnia mgr Jakuba Strawę na tle innych młodych adeptów nauki.

Konieczne kompetencje badawcze Doktorant nabył w drodze pracy w macierzystym zespole Zakładu i Katedry Farmakognozji UM w Białymstoku oraz w trakcie trzech krajowych staży naukowych odbytych w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz w Instytucie Podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej. Doktorant odbył także liczne szkolenia naukowe i brał udział w realizacji wielu projektów badawczych finansowanych przez macierzystą Uczelnię oraz jednego projektu NCN (wykonawca). Mgr Strawa jest również aktywnym dydaktykiem, prowadzącym nie tylko planowe zajęcia dla studentów kierunku farmacja, ale także pełniącym funkcję opiekuna prac magisterskich i studenckich praktyk zawodowych.

Przytoczone wyżej dane na temat dorobku publikacyjnego oraz pozostałej aktywności Doktoranta świadczą o Jego bardzo dobrym przygotowaniu po podjęcia nowych, samodzielnych wyzwań badawczych, dydaktycznych i organizacyjnych.

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi posiadania wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki farmaceutycznej oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, spełniając w pełni formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Wnoszę zatem do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr farm. Jakuba Strawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną pracy, potwierdzoną wysokim współczynnikiem oddziaływania zbioru doktorskiego (IF=16,062) oraz całości dorobku Doktoranta (IF=123,835), wnoszę do Wysokiego Senatu o wyróżnienie rozprawy.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Farmakognozji
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

dr hab. n. farm. prof. nadzw. Monika A. Olszewska