

**RECENZJA****rozprawy doktorskiej mgr farm. Katarzyny Jakimiuk****pt. „Charakterystyka fitochemiczna oraz ocena aktywności biologicznej części nadziemnych  
wybranych gatunków z rodzaju *Scleranthus* L.”****wykonanej w Zakładzie i Katedrze Farmakognozji  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku****pod kierunkiem****dr hab. n. farm. Michała Tomczyka**

Współczesna farmakognozja koncentruje się przede wszystkim na dwóch zagadnieniach – weryfikacji skuteczności i bezpieczeństwa stosowania tradycyjnych substancji roślinnych w określonych wskazaniach oraz na poszukiwaniu nowych źródeł dla leku naturalnego, w tym nowych, aktywnych molekuł, które bezpośrednio lub jako struktury modelowe mogłyby przyczynić się do rozwoju innowacyjnych preparatów leczniczych. W obydwu przypadkach kluczowym elementem są badania metabolomiczne, zarówno jakościowe, pozwalające na ocenę stopnia złożoności składu danej substancji roślinnej oraz na określenie struktury poszczególnych metabolitów, jak i ilościowe, weryfikujące wartość fitochemiczną badanego materiału. Stanowią one nieodzowny punkt wyjścia do opracowania kryteriów i narzędzi kontroli jakości roślinnych preparatów leczniczych. Dodatkowo, przyczyniają się do rozwoju chemotaksonomii, która porządkuje dane generowane w jednostkowych badaniach i ułatwia proces poszukiwania aktywnych cząsteczek.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się doskonale w te trendy. Celem pracy była szczegółowa charakterystyka składu chemicznego nadziemnych części dwóch gatunków z rodzaju *Scleranthus* L., tj. *S. perennis* i *S. annuus*, w tym analiza metabolomiczna, izolacja i określenie struktury związków czynnych, oraz przesiewowe badania aktywności biologicznej ekstraktów, wzbogaconych frakcji i wyizolowanych składników badanych substancji. Punktem wyjścia do podjęcia tych zagadnień była analiza dostępnych danych literaturowych wskazujących na możliwość występowania w badanym taksonie rzadkich w przyrodzie flawonoidów – C-glikozydów flawonowych. Mimo rzadkiego występowania związku te wzbudzają duże zainteresowanie świata naukowego z uwagi na wielokierunkową aktywność biologiczną, potwierdzoną ugruntowanym zastosowaniem, jakie już znalazły w leczeniu niektóre substancje roślinne bogate w te związki, jak np. kwiatostan głogu, ziele passiflory, czy korzeń opornika. Mogą także stanowić wartościowe markery taksonomiczne odpowiednich taksonów. Z drugiej strony, niewielka liczba znanych źródeł C-glikozydów utrudnia szersze badania zarówno ich potencjału farmakologicznego, jak i wartości chemotaksonomicznej. Stąd też, tematyka rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Jakimiuk jest istotna i aktualna, a cele uzasadnione i sformułowane w odpowiedzi na przesłanki wynikające zarówno z dotychczas nagromadzonej wiedzy, jak i z myślą o dalszych pracach badawczych, niezbędnych do weryfikacji wartości fitoterapeutycznej gatunków z rodzaju *Scleranthus* i C-glikozydów flawonoidowych oraz znaczenia chemotaksonomicznego tych rzadkich połączeń.

**Charakterystyka i ogólna ocena rozprawy**

Rozprawa doktorska mgr farm. Katarzyny Jakimiuk, zgodnie z możliwościami, jakie stwarzają przepisy Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.), została przedstawiona w formie zbioru powiązanych tematycznie trzech oryginalnych artykułów ekspery-

-mentalnych i dwóch artykułów przeglądowych, opublikowanych w latach 2021-2022 w recenzowanych czasopismach o zasięgu światowym, notowanych w *Journal Citation Reports* (JCR), tj. *Molecules* (2 prace), *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (2 prace) i *Phytochemistry Reviews* (1 praca). Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF prac tworzących zbiór wynosi 24.30, zaś punktacja MEiN 660, co jest wartością imponującą i wskazuje na wysoką wartość naukową rozprawy.

Wszystkie prace zbioru doktorskiego są zespołowe, a Doktorantka, która jest pierwszą autorką wszystkich artykułów, a także 12 pozostałych współautorów złożyło wymagane, kompatybilne oświadczenia wskazujące na istotny, możliwy do wyodrębnienia wkład Doktorantki w ich powstanie. Wkład ten obejmował współtworzenie koncepcji prac, pozyskanie materiału badawczego, przygotowanie i analizę fitochemiczną ekstraktów roślinnych, izolację związków aktywnych, interpretację danych spektralnych, identyfikację strukturalną związków, analizę aktywności antyoksydacyjnej i zdolności badanych analitów do inhibicji kolagenazy i tyrozynazy, opracowanie założeń wyjściowych do analiz statystycznych i *in silico*, przegląd i analizę danych literaturowych do prac poglądowych, a także przygotowanie wstępnych wersji manuskryptów. Doktorantka określa ilościowo swój wkład w powstanie poszczególnych prac na 65-80%, co wobec ciężaru gatunkowego zadań badawczych i projektowych, które na Niej ciążyły, nie budzi żadnych wątpliwości.

Obszerna monografia doktorska mgr Katarzyny Jakimiuk zawarta jest na 184 stronach i oprócz reprintów ww. pięciu artykułów w języku angielskim zawiera także wykaz przedmiotowych publikacji, krótkie wprowadzenie w tematykę rozprawy, cel pracy oraz zwięzłe omówienie stosowanych metod badawczych i uzyskanych wyników wraz z dyskusją. Całość zamykają rzeczowe wnioski, lista pozycji piśmiennictwa (48) cytowanych we wprowadzeniu i dyskusji, streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim, oświadczenia autorki i współautorów poszczególnych prac, oraz krótkie CV zawodowe z wykazem dotychczasowych osiągnięć naukowych Doktorantki. Należy podkreślić, że wskaźniki bibliometryczne zarówno samego cyklu doktorskiego (IF = 24.30), jak i pozostałych publikacji Doktorantki (5 prac oryginalnych, IF = 19.986) są niezwykle wysokie, szczególnie przy uwzględnieniu jedynie niespełna trzyletniego okresu Jej pracy. Tego rodzaju dorobek naukowy stawia wysoko poprzeczkę nie tylko rówieśnikom Doktorantki, stanowi także istotne ułatwienie dla recenzenta w przewodzie doktorskim. Świadczy również o pełnej świadomości Doktorantki znaczenia jak najszybszego upowszechniania wyników pracy naukowej.

Zgodnie z obranym celem pracy, w pierwszym etapie badań Doktorantka skupiła się na charakterystyce fitochemicznej ekstraktów pozyskanych z badanych substancji roślinnych, w tym przede wszystkim na identyfikacji strukturalnej obecnych w nich metabolitów specyficznych. Zagadnienia te zostały przedstawione w **publikacjach I** (*Molecules*, 2021, 26, 5631) i **II** (*Molecules*, 2022, 27, 2015). W tej części pracy, mgr Jakimiuk wykazała się znajomością całego wachlarza nowoczesnych technik separacji i identyfikacji strukturalnej związków naturalnych, w tym chromatografii preparatywnej (HPLC i grawitacyjnej chromatografii kolumnowej); analitycznych, chromatograficznych technik sprzężonych, jak UHPLC-PDA-MS/MS; spektroskopii UV-vis i IR; oraz jedno- i dwuwymiarowej spektrometrii NMR ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, COSY, HSQC, HMBC, DEPT). Efektem tej części badań było wykrycie w ekstraktach z części nadziemnych *S. perennis* i *S. annuus* oraz wstępna identyfikacja w sumie 24 różnych związków polifenolowych, w tym 22 C-glikozydów flawonowych. Pełna identyfikacja struktury większości z tych związków wymagała ich izolacji z materiału roślinnego – Doktorantce udało się wyodrębnić 9 z nich, w tym cztery nowe związki naturalne, które po szczegółowych badaniach spektralnych zidentyfikowała jako 8-C-diglikozydy 5,7,3',4'-tetrahydroksyflawonu, acylowane lub metylowane w części aglikonowej lub cukrowej, zależnie od związku, i które, korzystając z przywileju pierwszego odkrywcy, nazwała sklerantozydami A-D. Pięć pozostałych związków, to związki bardzo rzadkie w przyrodzie, w większości zidentyfikowane po raz pierwszy w rodzinie Caryophyllaceae (apiopeanozyd) lub rodzaju *Scleranthus* (lucnina-1, wicenina-2 i 6-C-glukozydo-8-C-arabinozyd 5,7,4'-tri-hydroksy-3'-metoksyflawon). Trzeba podkreślić, że izolacja z gatunków europejskich aż tylu tak unikatowych połączeń, w tym czterech nowych związków naturalnych jest rzadkością i stanowi tym samym szczególne osiągnięcie Doktorantki i istotną nowość naukową rozprawy. Jak wspominałam wyżej, osiągnięcie to zostało poprzedzone analizą dostępnych danych

chemotaksonomicznych rodziny Caryophyllaceae, nie jest zatem kwestią szczęścia czy przypadku, a raczej owocem dobrze zaplanowanego i przemyślanego projektu. Z racji rzadkości występowania, wyizolowane związki mogą mieć dużą wartość chemotaksonomiczną i ułatwić identyfikację pokrewnych gatunków, jednak nadanie im statusu markerów dla konkretnych taksonów, co sugeruje Doktorantka, wydaje się nieco przedwczesne i wymaga potwierdzenia w badaniach większej ilości gatunków z rodzaju *Scleranthus* i rodziny goździkowatych.

Substancja roślinna stanowi zazwyczaj złożoną matrycę chemiczną, która oprócz związków aktywnych może zawierać także związki obojętne biologicznie o charakterze balastowym. Stąd ważnym etapem badań fitochemicznych jest ekstrakcja, w tym ekstrakcja frakcjonowana, która pozwala na wyodrębnienie z materiału roślinnego frakcji aktywnej przy jak najniższej zawartości balastów. Pełna ocena wartości fitochemicznej tak otrzymanych ekstraktów roślinnych wymaga oprócz analizy jakościowej także oznaczenia zawartości przynajmniej związków dominujących. Te zagadnienia stanowiły drugi z wątków rozprawy mgr Jakimiuk, w ramach którego Doktorantka przygotowała z badanego materiału roślinnego trzy rodzaje ekstraktów z wykorzystaniem różnych rozpuszczalników (metanolu, mieszaniny metanol-woda 1:1 i wody) oraz wzbogacone frakcje polifenolowe, otrzymane przez frakcjonowaną ekstrakcję połączonych ekstraktów surowych eterem dietylowym, octanem etylu i *n*-butanolem. Wyniki tej części badań zostały przedstawione w **publikacji II** (*Molecules*, 2022, 27, 2015). W badanych ekstraktach i frakcjach Doktorantka oznaczyła metodami spektrofotometrycznymi całkowitą zawartość polifenoli, kwasów fenolowych i garbników. Ponadto, oznaczyła zawartość wcześniej wyizolowanych dziewięciu związków z pomocą metody HPLC, którą opracowała i poddała walidacji do tego celu. Wszystkie analizy Doktorantka przeprowadziła po raz pierwszy ustalając, że części nadziemne *S. perennis* i *S. annuus* stanowią obiecujące źródło polifenoli, w tym C-glikozydów flawonowych oraz, że związki te mogą być selektywnie ekstrahowane z materiału roślinnego przez ekstrakcję frakcjonowaną octanem etylu. W odpowiednich frakcjach SA5 i SP5 całkowita zawartość polifenoli przekroczyła 20% a zawartość C-glikozydów 7%.

Trzeci wątek rozprawy stanowiły badania aktywności biologicznej wyizolowanych związków, ekstraktów i frakcji. Z uwagi na fakt, że przedmiot analiz stanowiły gatunki wcześniej niebadane, Doktorantka postawiła w tej części na badania przesiewowe pod kątem typowej dla flawonoidów aktywności antyoksydacyjnej oraz pod kątem zdolności do bezpośredniej inhibicji enzymów kolagenazy i tyrozynazy. W badaniach wykorzystwała proste, bezkomórkowe testy *in vitro*, dobrze nadające się do prac skriningowych, jak m. in. testy DPPH, TEAC, FRAP i CUPRAC. Wyniki badań Doktorantka przedstawiła w **publikacji II** (*Molecules*, 2022, 27, 2015), w której wykazała istotny potencjał przeciwutleniający części z testowanych ekstraktów i związków, a także ich przeciwną aktywność hamującą kolagenazę. Dodatkowo, w **publikacji III** (*Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2022, 37, 427-436) Doktorantka przedstawiła wyniki badań porównawczych i zależności struktura-aktywność dla 44 związków flawonoidowych, w tym czterech wyizolowanych z rodzaju *Scleranthus*, pod kątem ich zdolności do hamowania tyrozynazy. Doktorantka wskazała najaktywniejsze związki oraz ustaliła elementy strukturalne w cząsteczce flawonoidów warunkujące satysfakcjonującą efektywność cząsteczki w porównaniu do substancji referencyjnej (kwasu kojowego). Mimo to, uzyskane w części badań przesiewowych wyniki nie pozwalają na wskazanie ewentualnych kierunków racjonalnego zastosowania ekstraktów z *S. perennis* i *S. annuus* w fitoterapii, wymaga to dalszych poszukiwań, co słusznie zauważa Doktorantka we wnioskach.

Oprócz wymienionych trzech publikacji eksperymentalnych, w skład zbioru doktorskiego mgr Katarzyny Jakimiuk wchodzi także dwie prace przeglądowe. Pierwsza z nich (**publikacja V**: *Phytochemistry Reviews*, 2022, 21, 179-218) stanowi wspomniany wyżej przegląd danych chemotaksonomicznych na temat rodziny Caryophyllaceae, który był m.in. efektem studiów literaturowych w ramach przygotowań do realizacji rozprawy i był dla niej inspiracją. Mimo, że dostępna dopiero rok, praca ta ma już około 2900 wejść on-line i 12 cytowań indeksowanych w Web of Science, co świadczy, że była pozycją oczekiwaną w środowisku naukowym. Druga z prac przeglądowych (**publikacja IV**: *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2021,

36, 1016-1028), dotycząca roli flawonoidów jako inhibitorów elastazy neutrofilowej, jest również bardzo wartościową pozycją, uzupełniającą widoczny brak w piśmiennictwie, jednak wydaje się co najwyżej luźno powiązana z tematyką zbioru doktorskiego. Doktorantka nie wyjaśnia jaką rolę ta publikacja pełni w Jej rozprawie, byłoby dobrze, gdyby zechciała to wyjaśnić w trakcie obrony. Osobiście uważam, że praca ta jest zbędna w zbiorze i jej pominięcie poprawiłoby jego spójność tematyczną.

Badania eksperymentalne i przeglądowe stanowiące podstawę rozprawy zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane z wykorzystaniem właściwie dobranej metodyki. Wszystkie publikacje wchodzące w skład zbioru doktorskiego stanowią starannie przygotowane i szerokie opracowania. **Publikacje I i II** zostały dodatkowo zaopatrzone w obszerne suplementy zawierające w sumie 32 ryciny chromatogramów i widm spektralnych, doskonale dokumentujących uzyskane wyniki i zapewniających transparentność badań. Całość zasługuje na wysoką ocenę, choć Doktorantka nie ustrzegła się kilku istotnych nieścisłości, w tym:

1. dla wszystkich wyizolowanych glikozydów flawonoidowych podała konfigurację absolutną cukrów (D lub L) bez przeprowadzenia odpowiedniego dowodu, bądź też z pominięciem tego istotnego elementu w opisie części eksperymentalnej;
2. podając nazwy systematyczne flawonoidów nie stosowała konsekwentnie tych samych zasad, co do adnotacji konfiguracji wiązań glikozydowych, formy cyklicznej cukrów i ww. konfiguracji absolutnej dla wszystkich związków i ich części cukrowych, tj. w większości związków taka adnotacja jest wprowadzona tylko dla jednej z cząsteczek cukru w diglikozydzie, np. dla związku **1** podano w **publikacji I** nazwę 8-C- $\beta$ -D-ksylopiranozydo-2''-O-glukozyd – czyli resztę glukozylową opisano mniej dokładnie niż ksylozylową, mimo posiadania analogicznych danych spektralnych;
3. oznaczone za pomocą HR-MS masy cząsteczkowe związków podała z dokładnością do 0.01 Da, podczas gdy oczekiwana rozdzielczość dla tego typu analizatorów to 0.001-0.0001 Da;
4. liniowość krzywych kalibracyjnych do oznaczeń ilościowych oceniła wyłącznie za pomocą współczynnika determinacji  $R^2$ , podczas gdy konieczna jest w takich przypadkach także weryfikacja istotności statystycznej równania regresji oraz współczynników krzywej (kierunkowego i wyrazu wolnego).

Z obowiązku recenzenta muszę także zauważyć, że przygotowane w języku polskim wprowadzenie do dysertacji wyraźnie różni się od opublikowanych artykułów poprawnością stylistyczną, na niekorzyść tej pierwszej. Miejscami sprawia ona wrażenie dosłownego tłumaczenia tekstu źródłowego z języka angielskiego bez uwzględnienia specyficznej semantyki języka ojczystego. W pracy, szczególnie w części opisu identyfikacji struktury wyizolowanych związków, występuje szereg kolokwializmów i skrótów myślowych, których w przyszłości Doktorantka powinna starać się unikać, jak np. „proton wykazywał korelacje”, „sygnały węgla”, „dla węgla acetoksykarbonylowego”, „węgle anomeryczne”, „cukier końcowy”, „miejsce metylacji”, etc. Poprawne sformułowania w tych przypadkach to „sygnał protonu korelował/był skorelowany”, „sygnały atomu węgla”, „dla atomu węgla grupy karbonylowej reszty acetylowej”, „terminalna reszta cukrowa”, „pozycja metylacji”, etc. Z drugiej strony, omówienie zbioru doktorskiego prezentuje wysoki poziom edytorski i nie zawiera błędów typograficznych i literowych.

Niezależnie od wymienionych wyżej kwestii, rozprawa doktorska mgr Katarzyny Jakimiuk stoi na wysokim poziomie naukowym i wnosi istotne elementy nowości w postaci przede wszystkim dogłębnej analizy fitochemicznej badanych gatunków, wyizolowania czterech nowych związków naturalnych oraz pierwszych danych na temat aktywności biologicznej ekstraktów i C-glikozydów *S. perennis* i *S. annuus*, które mogą stanowić punkt wyjścia dla ich dalszych badań. Realizacja pracy wymagała od Doktorantki opanowania/znajomości szeregu nowoczesnych technik badawczych, w tym chromatograficznych (analitycznych i preparatywnych) i spektralnych, jak LC-MS/MS, 1D i 2D NMR, IR, metod in vitro analizy aktywności biologicznej w modelach bezkomórkowych, a także przygotowania i oczyszczania próbek. Warto podkreślić także umiejętność współpracy naukowej Doktorantki w międzynarodowym zespole naukowym – współautorami czterech prac ze zbioru doktorskiego są badacze z Włoch, Austrii, Niemiec i Turcji.

Konieczne kompetencje badawcze Doktorantka nabyła w drodze pracy w macierzystym zespole Zakładu i Katedry Farmakognozji UM w Białymstoku oraz w trakcie trzech staży zagranicznych i krajowych w Zakładzie Chemii Analitycznej Uniwersytetu "G. d'Annunzio" of Chieti-Pescara (Włochy), w Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu w Zagrzebiu (Chorwacja) oraz w Laboratorium Środowiskowym Microbiota Lab, Katedry Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Dzięki szerokiej współpracy Doktorantki, Jej dorobek naukowy obejmuje w sumie już 10 publikacji w renomowanych czasopismach naukowych o sumarycznym współczynniku wpływu IF 44.286, co stanowi imponujący wynik na tym etapie kariery naukowej i przy tak krótkim stażu pracy. Dorobek Doktorantki uzupełnia 13 komunikatów zjazdowych, w tym 12 z konferencji międzynarodowych (5 z konferencji dla studentów i młodych naukowców), potwierdzając Jej dużą aktywność na arenie ponadnarodowej.

Przytoczone wyżej dane na temat dorobku publikacyjnego oraz pozostałej aktywności naukowej Doktorantki świadczą o Jej bardzo dobrym przygotowaniu po podjęcia nowych, samodzielnych wyzwań badawczych.

### **Pytania i komentarze**

Oceniając wysoko recenzowaną dysertację w świetle obowiązujących kryteriów, poniżej zamieszczam listę pytań i komentarzy do niektórych wątków rozprawy, jako zachętę dla Doktorantki do dyskusji.

1. Czy Doktorantka mogłaby szerzej wyjaśnić, dlaczego jako jeden z kierunków badań przesiewowych wyciągów z *S. perennis* i *S. annuus* wybrała hamowanie kolagenazy i tyrozynazy?
2. Wykorzystując metodę spektrofotometryczną, Doktorantka oznaczyła w badanych ekstraktach zawartość kwasów fenolowych na poziomie 5-11 mg/g, jednak nie wykryła żadnych tego typu związków techniką LC-MS/MS – czym można to wytłumaczyć?
3. Doktorantka oznaczyła w badanych ekstraktach także zawartość garbników – jaki typ budowy mogą reprezentować te związki, czy Doktorantka to ustaliła lub planuje ustalić?
4. Literatura wskazuje na możliwość występowania w rodzaju *Scleranthus* saponin – czy Doktorantka weryfikowała ten fakt w badanych gatunkach?

### **Podsumowanie**

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi posiadania wiedzy teoretycznej w dyscyplinie oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, spełniając w pełni formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim, określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr farm. Katarzyny Jakimiuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną pracy, potwierdzoną wysokim współczynnikiem oddziaływania zbioru doktorskiego (IF=24.300) oraz całości dorobku Doktorantki (IF=44.286), a także Jej aktywność w międzynarodowym środowisku naukowym, 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