



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL

Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Farmakognozji
z Ogrodem Roślin Leczniczych
80-415 Gdańsk, ul. S. Hallera 107

Gdańsk, 16.05.22 r.

OCENA

pracy doktorskiej mgr Katarzyny Jakimiuk

**pt: „Charakterystyka fitochemiczna oraz ocena aktywności
biologicznej części nadziemnych wybranych gatunków z rodzaju
Scleranthus L.**

przedstawiona Kolegium Nauk Farmaceutycznych
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Pragnę podziękować Dziekanowi Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za powierzenie mi zaszczytu recenzowania rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Jakimiuk zatytułowanej „Charakterystyka fitochemiczna oraz ocena aktywności biologicznej części nadziemnych wybranych gatunków z rodzaju *Scleranthus* L.” przygotowanej w Zakładzie Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem dr hab. n. farm. Michała Tomczyka.

Szacuje się, że spośród około 250 000-500 000 gatunków roślin występujących na świecie około 5-15 % jest zbadanych w zakresie składu chemicznego i działania leczniczego. Prace badawcze nad gatunkami dostarczającymi surowców leczniczych stosowanych w tradycyjnych systemach terapeutycznych, umożliwiły wprowadzenie na rynek farmaceutyczny nowych leków i suplementów pochodzenia roślinnego, np. korzenia pelargonii afrykańskiej (*Pelargonium sidoides*), korzenia różenia górskiego (*Rodiola rosea*) czy ziela brodziuszki wiechowatej (*Andrographis paniculata*). Ponadto, w ramach wielu światowych programów

badawczych eksplorujących świat roślin oraz organizmów morskich (programy badawcze m. in. National Cancer Institute) wyodrębniono szereg substancji chemicznych, z których część jest stosowana w celach leczniczych a inne pozostają potencjalnymi kandydatami na leki. Szacuje się, że około 60% leków ma związek i wywodzi się ze świata naturalnego. W poszukiwaniu nowych surowców roślinnych oraz związków chemicznych pochodzenia naturalnego wykorzystuje się wszystkie dostępne obecnie narzędzia badawcze z obszaru chemii, w tym fitochemii, preparatyki chromatograficznej, badań strukturalnych, biochemii, biologii molekularnej oraz farmakologii. Przełomem w rozwoju badań fitochemicznych i farmakognostycznych, był postęp w technikach separacyjnych, w tym szczególnie technikach sprzężenia wysokosprawnej chromatografii cieczowej z selektywnymi detektorami, głównie spektrometrami mas różnych typów. oraz detektorem NMR. Ukierunkowane na określone rodzaje aktywności biologicznej badania surowców roślinnych i otrzymywanych z nich ekstraktów, doprowadziły do wyodrębnienia i ustalenia struktur chemicznych około 200 000-300 000 nowych związków, w tym rocznie jest izolowanych i identyfikowanych około 1600.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, poprzez założone cele, wybrany przedmiot badań, osiągnięte przez Doktorantkę rezultaty, włącza się w ten światowy nurt badań, wybierając jako przedmiot poszukiwań farmakognostycznych (obejmujących analizę kompozycji związków czynnych z grupy związków flawonoidowych w połączeniu z wybranymi kierunkami aktywności biologicznej) – dwa gatunki z rodzaju *Scleranthus*, mianowicie *Scleranthus perennis* (czerwiec trwały) i *S. annuus* (czerwiec roczny) (Caryophyllaceae). Obydwa nie były wcześniej szczegółowo badane i nie ma pełnych danych o składzie chemicznym części nadziemnej (ziela), w tym przede wszystkim o związkach flawonoidowych i ich działaniu biologicznym.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Jakimiuk jest cyklem 5 publikacji – 2 prac przeglądowych i 3 prac eksperymentalnych, mianowicie:

- 1. Jakimiuk K**, Strawa JW, Granica S, Tomczyk M. New flavone C-glycoside s from *Scleranthus perennis* and their anti-collagenase activity. *Molecules*, 2021, 26, 5631, DOI: 10.3390/molecules26185631
- 2. Jakimiuk K**, Strawa JW, Granica S, Locatelli M, Tartaglia A, Tomczyk M. Determination of flavonoids in selected *Scleranthus* species and their anti-collagenase and antioxidant potential. *Molecules*, 2022, 27, 2015. DOI: 10.3390/molecules27062015
- 3. Jakimiuk K**, Suat S, Milewski R, Supuran CT, Sohretoglu D, Tomczyk M. Flavonoids as tyrosinase inhibitors in *in silico* and *in vitro* models: basic framework of

SAR using a statistical modeling approach. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2022, 37, 427-436. DOI: 10.1080/14756366.2021.2014832

4. **Jakimiuk K**, Gesek J, Atanasov AG, Tomczyk M. Flavonoids as inhibitors of human neutrophil elastase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2021, 36, 1016-1028. DOI: 10.1080/14756366.2021.1927006

5. **Jakimiuk K**, Wink M, Tomczyk M. Flavonoids of the Caryophyllaceae. *Phytochemistry Reviews*, 2022, 21, 179-218. DOI: 10.1007/s11101-021-09755-3

Udział Autorki w wymienionych powyżej wieloautorskich pracach (pozycja 1 i 4 - czterech autorów, pozycje 2 i 3 - sześciu autorów, pozycja 5 – trzech autorów), stanowiących oceniany jako rozprawa doktorska cykl wynosi odpowiednio 70% (pozycja 1), 65% (pozycja 2), 70% (3), 80% (4) i 80% (5). We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem i jej udział w ich opracowaniu polegał na przygotowaniu podstawowych założeń badań (publikacje 1-5), pozyskaniu materiału badań (publikacje 1,2), korekcie merytorycznej pracy, przeprowadzeniu pełnej procedury ekstrakcji (1,2), analizie wyników spektralnych i spektroskopowych (prace 1-2), przygotowaniu próbek do analizy jakościowej i ilościowej (praca 2), wykonaniu oznaczenia i interpretacji wyników na temat aktywności inhibicji enzymatycznej (1,2) i antyoksydacyjnej (2), wykonaniu badań biologicznych w modelu *in vitro*, analizie i interpretacji uzyskanych wyników (3), stworzeniu założeń do analizy statystycznej oraz badaniach w modelu *in silico* (3), przygotowaniu schematu pracy, zebraniu i zestawieniu literatury (4,5), opracowaniu zestawienia chemotaksonomicznego rodziny botanicznej Caryophyllaceae oraz dyskusji pracy (5), części odnoszącej się do aktywności flawonoidów względem elastazy, właściwości biologicznych elastazy, stworzeniu schematu porównującego aktywność biologiczną z badaniami strukturalnymi i dyskusji (4). W oświadczeniach pozostałych autorów, wskazują oni na korektę merytoryczną prac, współtworzenie koncepcji pracy, edycji finalnej wersji manuskryptu, pełnienia funkcji autora korespondencyjnego, współtworzenia metody ekstrakcyjnej, wykonania fragmentacji MS w celu identyfikacji wyizolowanych związków, wykonania analizy jakościowego i ilościowego składu fitochemicznego ekstraktów i frakcji uzyskanych z badanych gatunków roślin, uczestniczeniu w izolacji związków oraz korekcie ostatecznej manuskryptu, współudziale w wykonaniu analiz jakościowych materiału roślinnego, korekcie i edytorskich poprawkach. Załączone oświadczenia potwierdzają fakt, że Doktorantka była badaczem wiodącym w tych zespołach, uczestniczącym we wszystkich etapach prowadzonych badań, począwszy od ekstrakcji, separacji, identyfikacji chromatograficznej z użyciem HPLC-MS/MS oraz z

użyciem technik 1D i 2D NMR, interpretacji otrzymanych wyników, wykonania testów aktywności biologicznej oraz przygotowania manuskryptów. Prace eksperymentalne zostały opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej, *Molecules* (2 publikacje), *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (2 publikacje), *Phytochemistry Reviews* (1) a i ich wartość IF wynosi odpowiednio praca 1 i 2 – IF2020 - 4.412, praca 3 – IF2020 - 5.051, praca 4 IF2020 - 5.051, praca 5 IF2020 - 5.374. Sumaryczny IF dla cyklu prac wynosi 24.30 a sumaryczna wartość punktów MNiSW 660. Bardzo wysoka sumaryczna wartość IF oraz punktów MNiSW przypisanych powyżej wymienionym publikacjom, świadczy o wysokiej wartości naukowej prac Doktorantki. Wszystkie czasopisma, *Molecules*, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* and *Phytochemistry Reviews*, w których zamieszczone są prace eksperymentalne oraz teoretyczne należą do grupy czasopism z najwyższą wartością parametru Quartile, mianowicie Q1. Liczba cytowań dla wymienionych powyżej publikacji wynosi wg bazy Web of Science 18 a wg bazy Scopus 10, należy podkreślić, że prace zostały opublikowane w latach 2021-2022, dlatego obydwie liczby cytowań można uznać na wysokie. W pracach teoretycznych Doktorantka opisała na podstawie zebranych danych literaturowych - aktualny stan badań nad związkami flawonoidowymi jako inhibitorami ludzkiej elastazy neutrofilowej (publikacja 4) oraz scharakteryzowała związki flawonoidowe dotychczas wyodrębnione i zidentyfikowane w gatunkach z rodziny goździkowatych - Caryophyllaceae (publikacja 5). Są one wprowadzeniem teoretycznym do zaplanowanych przez Doktorantkę a następnie przeprowadzonych przez nią badań, jednocześnie stanowiąc punkt odniesienia dla oceny wartości i znaczenia osiągniętych w toku własnych prac wyników.

W przedstawionych do oceny 3. publikacjach eksperymentalnych (pozycje 1-3), które przeszły pozytywnie proces recenzji, Doktorantka przedstawiła wyniki bardzo szeroko zaplanowanych i przeprowadzonych badań fitochemicznych, które dostarczyły nowych danych o kompozycji związków aktywnych biologicznie w obydwu badanych gatunkach czerwców oraz o ich potencjale antyoksydacyjnym, zdolności do hamowania kolagenazy oraz tyrozynazy.

Najważniejszym osiągnięciem, w tym obszarze badań Doktorantki, jest izolacja i podanie struktur czterech nowych w świecie roślinnym związków flawonoidowych, w tym 3 z *S. annuus* : 8-C- β -D-ksylopiranozydo-2''-O-glukopiranozydu 5,7,3'-trihydroksy-4'-acetoksyflawonu, 8-C- β -D-ksylopiranozydo-2''-O-glukopiranozydu 5,7,3'-trihydroksy-4'-metoksyflawonu, 8-C- β -D-ksylopiranozydo-2''-O-(4'''-acetoksy)-glukopiranozydu 5,7-dihydroksy-3'-metoksy-4'-acetoksyflawonu, i 1 z *S. perennis* 8-C- β -D- arabinopiranozydo-2''-

O-(4'''-acetoksy)-glukopiranozydu 5,7-dihydroksy-3'-metoksy-4'-acetoksyflawonu, którym nadała nazwy zwyczajowe, odpowiednio sklerantozyd A - D.

Obecność sklerantozydów A-C w częściach nadziemnych *S. perennis* potwierdziła metodą LC-PDA-MSⁿ. Ponadto ujawniła po raz pierwszy w rodzinie Caryophyllaceae obecność apiopeanozydu - diglikozydu fenolowego, wykrytego dotychczas jedynie w gatunku *Paeonia suffruticosa*. Wyodrębnienie nowych związków i ustalenie ich struktur (w oparciu o analizę danych widm UV, IR, MS, ¹H, ¹³C NMR, DEPT, COSY, HSQC, HMBC) jest niewątpliwie bardzo wartościowym wkładem Doktorantki do chemotaksonomii rodziny Caryophyllaceae oraz nosi znamiona odkrycia naukowego. Ponadto ujawniła, poprzez izolację i przeprowadzenie w pełnym zakresie badań strukturalnych, obecność w ziele *S. perennis* luceniny-1, wiceniny 2, chryzoeriolu-6-C-β-D-glukopiranozydu-8-C-α-arabinofuranozydu oraz 8-C-β-D-ksylopiranozydo-2''-O-glukozydu 5,7-dihydroksy-3'-metoksy-4'-acetoksyflawonu, zidentyfikowanego dotychczas tylko w gatunku *S. uncinatus* i jednocześnie stanowiącego dominujący flawonoid w ziele *S. perennis*. Wcześniej w rodzinie Caryophyllaceae wykazano obecność wielu różnorodnych C – glikozydowych pochodnych apigeniny i luteoliny o charakterze mono-, di- C-glikozydów i C- glikozydoestrów oraz O-glikozydów C-glikozydów flawonowych. W warunkach opracowanej metody LC-PDA-MSⁿ w ziele *S. perennis* wykazała obecność dodatkowych 14 związków z grupy di-C-glikozydów flawonowych, O-glikozydów-C-glikozydów dla których podała przypuszczalne struktury. Spośród nich 4 związki flawonowe uznała za pochodne luteoliny, przy czym w tekście publikacji (pozycja 2; *Molecules*, 2022, 27, 2015) oraz rozdziale „4.4.4. Analiza profili fitochemicznych ekstraktów (SP1-SP3, SA1-SA3) oraz frakcji (SP4-SP6, SA4-SA6)” str. 16 brakuje szczegółowych danych, co było podstawą uznania 5,7,3',4'-tetrahydroksyflawonu (luteoliny) za aglikon związków XIX-XXI oraz związku XXIII. Odnotować należy również pewną niezgodność w nazwie chemicznej wiceniny 2, która jest pochodną apigeniny i posiada grupę OH w bocznym fenylu w pozycji C-4' a nie w pozycji C-3', jak podano na str. 16 oraz w tekście publikacji (pozycja 2; *Molecules*, 2022, 27, 2015).

W obszarze badań aktywności biologicznej związków flawonoidowych, nie tylko tych wyodrębnionych z badanych surowców – łącznie przebadano 44 związki reprezentujące różne grupy flawonoidowe, Doktorantka odniosła kolejny sukces naukowy, wyjaśniając i opisując zależności między strukturą chemiczną flawonoidu a aktywnością inhibitującą tyrozinazę, przede wszystkim oceniła wpływ obecności lub braku grup hydroksylowych lub ich metylacji/acetylacji/glikozylacji przy wszystkich węglach pierścienia B szkieletu

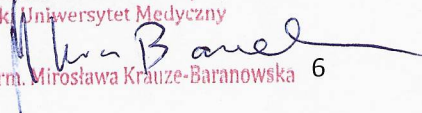
flawonoidowego, a także przy węglach C3, C5, C6, C7 i C8 pierścienia benzo- γ -pironu. Spośród badanych związków wyselekcjonowała flawonoidy o najsilniejszej aktywności inhibitującej – mianowicie izookaninę, luteolinę i kwercetynę. W oparciu o przeprowadzone badania kinetyczne oraz komputerowe w modelu *in silico* określiła typy inhibicji dla izookaniny, luteoliny oraz robininy jako niekonkurencyjne hamowanie enzymatyczne natomiast dla kwercetyny, kemferolu i tylirozydu wskazała na inhibicję konkurencyjną z miejscem aktywnym enzymu. Doktorantka jako pierwsza określiła typ inhibicji enzymatycznej dla izookaniny i robinetyny.

Przedstawiona rozprawa doktorska mgr Katarzyny Jakimiuk, w formie cyklu publikacji, stanowi wnikliwe studium oceny farmakognostycznej badanych gatunków i jej realizacja wymagała od Doktorantki ogromnego zaangażowania i nakładu pracy oraz opanowania nowych narzędzi i technik badawczych, szczególnie w obszarze badań biologicznych i dokowania molekularnego. Niewątpliwie osiągnięty sukces naukowy mgr Katarzyna Jakimiuk zawdzięcza promotorowi rozprawy dr hab. n. farm. Michałowi Tomczykowi, wybitnemu specjalście z dziedziny farmakognozji.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Jakimiuk stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim są badania farmakognostyczne dwóch gatunków z rodzaju *Scleranthus*, mianowicie czerwca trwałego (*Scleranthus perennis* L.) oraz czerwca rocznego (*Scleranthus annuus* L.), rozszerza zakres wiedzy o kompozycjach związków czynnych w czerwcach, ich potencjale terapeutycznym i wnosi nowe dane do chemotaksonomii rodziny Caryophyllaceae. Dostarcza nowych, cennych informacji o aktywności biologicznej związków flawonoidowych, w tym przede wszystkim w obszarze badań aktywności hamującej kolagenazę i tyrozynazę. Kandydatka wykazała się specjalistyczną wiedzą teoretyczną oraz praktyczną w dyscyplinie naukowej farmakognozja.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Jakimiuk spełnia wymagania Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dn. 20.07.2018r. (dział V, rozdział 1 i 2, art. 186,187 pkt.1-4). Na tej podstawie wnioskuję do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o nadanie mgr Katarzynie Jakimiuk stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne oraz o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

prof. dr hab. n. farm. Mirosława Krauze-Baranowska
Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL
Gdański Uniwersytet Medyczny

Kierownik
Katedra i Zakład Farmakognozji
Z Ogrodem Roślin Leczniczych
Gdański Uniwersytet Medyczny

prof. dr hab. n. farm. Mirosława Krauze-Baranowska 6