



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

dr hab. Irma Podolak
Katedra i Zakład Farmakognozji
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
ul. Medyczna 9
30-688 Kraków

Kraków, dn. 28.05.2019

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pani mgr Izabeli Nawrot-Hadzik

pt.

„Różnorodność fitochemiczna kłączy inwazyjnych roślin leczniczych z rodzaju *Reynoutria* oraz ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa i przeciwutleniająca”

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Farmakognozji

Uwagi ogólne

Na przedłożoną do oceny rozprawę doktorską pani mgr Izabeli Nawrot-Hadzik składa się liczący 49 stron tekst, stanowiący opracowanie teoretyczne podjętego tematu, oraz kopie trzech spójnych z nim publikacji, które ukazały się w latach 2018-2019. Prace te są wieloautorskie, czego wymagały szeroko zakrojone badania podjęte przez Doktorantkę ale we wszystkich jest ona pierwszym autorem. Ponadto, dołączone do dysertacji oświadczenia współautorów potwierdzają Jej wiodącą rolę w koncepcji i przeprowadzeniu badań ujętych w przedstawiony cykl prac. Czasopisma, w których pani mgr Nawrot-Hadzik opublikowała prezentowane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki, tj. *Planta Medica*, *Molecules* i *Medical Science Monitor*, znajdują się w wykazie *Journal Citation Reports (JCR)* i należy odnotować ich wysoki łączny współczynnik oddziaływania *impact factor* wynoszący 7,486.

Badania stanowiące podstawę ww. publikacji zostały wykonane w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, pod kierownictwem naukowym Promotora, pana prof. dr. hab. Adama Matkowskiego oraz Promotora pomocniczego, pana dr Sylwestra Ślusarczyka. Były one częściowo finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantów PRELUDIUM i OPUS, a także wsparte współpracą z innymi ośrodkami naukowymi, zarówno w obrębie macierzystej uczelni jak i poza nią. Doktorantka współpracowała m.in. z Instytutem Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa (IUNG) w Puławach, Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu, z Technicznym Uniwersytetem w Dreźnie. Dwie prace powstały w kooperacji z Katedrą Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii w Warszawie.

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 (12) 620 55 60

fax +48 (12) 620 55 75

farmakog@cm-uj.krakow.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

We wstępie dysertacji Autorka zacytowała 91 pozycji literaturowych z lat 1954-2019 w bezpośredni sposób odnoszących się do tematyki prowadzonych badań własnych. Wybór piśmiennictwa, a także sposób ujęcia omawianych treści, w tym usystematyzowane przedstawienie *state of the art* wraz z wypukleniem niejasności i niespójności wyników literaturowych i ich wnikliwą dyskusją, świadczą o bardzo szerokiej i dogłębnej orientacji Doktorantki w zagadnieniach taksonomii, fitochemii i farmakologii rdestowców.

Praca jest dobrze napisana i zilustrowana fotografiami, mapkami, tabelami i schematami co ułatwia lekturę. Dodatkowym walorem jest umieszczenie zwięzłego i klarownego streszczenia. Poza kilkoma błędami literowymi nie dostrzegłam większych uchybień edytorskich. W mojej opinii, opracowanie umieszczone w rozprawie doktorskiej pani mgr Izabeli Nawrot-Hadzik w sposób wyczerpujący traktuje założony problem badawczy, uzupełniając i scalając treści ujęte w cyklu trzech zawartych w niej opublikowanych prac.

Ocena merytoryczna

Rdestowce – *Reynoutria* są wieloletnimi roślinami o dużej ekspansywności, stąd ich zasięg, ograniczony pierwotnie do Azji wschodniej, wtórnie objął inne rejony świata, zwłaszcza Europę i Amerykę Północną. Głównym obszarem zawartych w pracy doktorskiej zainteresowań badawczych mgr Izabeli Nawrot-Hadzik było komparatystyczne spojrzenie na fitochemię oraz aktywność biologiczną przedstawicieli rodzaju *Reynoutria* w kontekście ich wartości jako surowców farmakopealnych. Doktorantka zajęła się gatunkiem o ugruntowanej pozycji w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej, a mianowicie rdestowcem ostrokończystym *Reynoutria japonica* Houtt. traktując go jako modelowy. Ponadto, wytypowała blisko spokrewniony takson jakim jest rdestowiec sachaliński *R. sachalinensis* [F.Schmidt] Nakai oraz hybrydę obu wymienionych wyżej – rdestowiec pośredni *R. x bohemica* Chrtek & Chrtkova.

Wybór gatunków do badań nie był przypadkowy i miał racjonalne przesłanki, oparte dodatkowo na dogłębnej analizie danych literaturowych. Punktem wyjścia był fakt włączenia w roku 2017 kłączy rdestowca ostrokończystego do Farmakopei Europejskiej i wynikająca z tego konieczność potwierdzenia w sposób jednoznaczny tożsamości surowca. Poza oceną cech morfologicznych, wymagane monografią analizy służące identyfikacji kłączy *R. japonica* opierają się aktualnie na ocenie dwóch związków, tj. polidatyny (znanej pod częściej używaną synonimiczną nazwą piceid) i emodyny. Reprezentują one dwie grupy fitoskładników o znaczeniu chemotaksonomicznym dla rodzaju, czyli stilbeny oraz antrachinony. Analiza oparta o te związki pozwala względnie jednoznacznie wyeliminować ewentualne pomyłki z rdestowcem sachalińskim, którego skład, w odniesieniu do wymienionych wyżej grup metabolitów, odbiega jakościowo i ilościowo od gatunku farmakopealnego, lecz pomija hybrydy, na temat których fitochemicznych danych literaturowych jest niewiele.

Problem substytucji lub zanieczyszczenia surowca leczniczego kłączami rdestowca pośredniego może być szczególnie ważny właśnie w Europie,

gdzie występowanie tego oktoploidalnego mieszańca zostało opisane znacznie wcześniej niż na obszarze macierzystym dla gatunku farmakopealnego. Autorka we wstępie swojej rozprawy zwraca uwagę na ogromną inwazyjność *R. x bohemica*, co przekłada się na rosnącą liczbę stanowisk oraz możliwość kolejnych krzyżówek. To z kolei wpływa na wątpliwości identyfikacyjne związane ze zbliżonymi do farmakopealnego gatunku (*R. japonica*) cechami morfologicznymi.

Zatem pierwszy cel, który założyła sobie Doktorantka, obejmował wytypowanie bardziej specyficznego zestawu fitoskładników, pozwalającego w sposób uniwersalny i jednoznaczny określić tożsamość surowca pozyskanego z badanych gatunków *Reynoutria*. Dodatkowym wyzwaniem było opracowanie i walidacja odpowiedniej metody analitycznej, umożliwiającej ich jednoczesne oznaczenie ilościowe.

Drugim celem było zrewidowanie literaturowych doniesień wiążących efekty terapeutyczne kłączy *Reynoutria japonica* z ich aktywnością antyoksydacyjną, a tę z kolei, albo z zawartością stilbenów albo innych, niesprecyzowanych związków. Kolejnym, istotnym zagadnieniem badawczym było porównanie potencjału antyoksydacyjnego niefarmakopealnych rdestowców, sachalińskiego i pośredniego oraz powiązanie go z ich profilem fitochemicznym.

Wreszcie jako trzeci cel, który Doktorantka wytyczyła w oparciu o tradycyjne wskazania dla rdestowca ostrokończystego, stosowanego w Korei w higienie jamy ustnej, postanowiono określić potencjał przeciwbakteryjny wszystkich analizowanych surowców rodzaju *Reynoutria* wobec kilku patogennych szczepów *Streptococcus* odpowiedzialnych za zmiany próchnicze.

Chciałabym wyrazić uznanie dla przemyślanego wyboru założonych celów badawczych, które bardzo dobrze odzwierciedlają oblicze współczesnej farmakognozji. Łączą bowiem w sobie tradycyjny obszar działań związanych z towaroznawstwem oraz nowoczesne, wyspecjalizowane podejście metodologiczne i koncepcyjne. Na wyróżnienie zasługuje też logiczne i przejrzyste uzasadnienie podjętych celów badawczych. Doktorantka szczegółowo omawia kwestie związane z biologią i fitochemią rdestowców będących przedmiotem badań, ich usytuowanie taksonomiczne, szlaki hybrydyzacji, zróżnicowanie cech morfologicznych i chemicznych, wyraźnie akcentując literaturowe niespójności oraz „białe plamy”.

Realizację badań rozpoczęto od analiz fitochemicznych zebranych surowców, wykorzystując metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym i masowym (HPLC-DAD-MS³). Doktorantka zidentyfikowała 25 związków, z których dziewięć zostało wyizolowanych, a ich pełną strukturę ustalono w oparciu o dalsze analizy NMR. Warto podkreślić, że udało się zaobserwować szereg nie odnotowanych do tej pory w badanych rdestowcach fitoskładników, należących do różnorodnych grup chemicznych, w tym stilbenów, antrazwiązków, procyjanidyn czy pochodnych kwasu hydroksycynamonowego. Na szczególną uwagę zasługują pionierskie wyniki w odniesieniu do oligomerów ligniny, jak i

disacharydowych estrów fenylopropanoidów, na temat których doniesień innych autorów jest bardzo niewiele.

Uzyskane dane stanowiły bazę do realizacji podstawowego celu podjętych badań, umożliwiając Doktorantce wytypowanie sześciu związków, jako optymalnego zestawu, w założeniu pozwalającego na jednoznaczne potwierdzenie tożsamości surowca. Poza objętymi aktualnymi wymogami farmakopealnymi piceidem i emodyną, zaproponowano kolejne dwa związki reprezentujące te same klasy chemiczne, tj. resweratrol i fiscjon, oraz dwóch przedstawicieli grupy disacharydowych estrów fenylopropanoidowych, mianowicie wanikozydy A i B. Opracowano i zwalidowano metodę oznaczania ilościowego ww. fitoskładników, a potwierdzeniem jej przydatności było określenie różnic między farmakopealnym gatunkiem *R. japonica* pochodzącym z pierwotnego i wtórnego obszaru występowania oraz pokrewnym rdestowcem sachalińskim i hybrydą wyżej wymienionych, tj. *R. x bohemica*. Ważnym wnioskiem uzyskanym na podstawie tych badań jest wykluczenie możliwości stosowania analizowanych rdestowców jako substytutów surowca farmakopealnego. Potwierdzono ponadto, że materiał pochodzący z Chin był bogatszy w resweratrol i piceid niż ten zebrany w Polsce.

W kolejnym etapie badań, zgodnie z przyjętymi założeniami, Doktorantka zajęła się weryfikacją ugruntowanego poglądu wiążącego wysoką aktywność antyoksydacyjną rdestowca ostrokończystego z występującymi w nim stilbenami. W tym celu uzyskane dane LC-MS, dotyczące ogółem 171 związków obecnych w badanych przez Doktorantkę wyciągach, korelowano z wynikami testów *in vitro* aktywności antyoksydacyjnej wykorzystując takie narzędzia statystyczne jak analiza czynników głównych (PCA). W ten sposób ustalono, iż obserwowana aktywność *in vitro* zależy w głównej mierze od galoilowanych procyjanidyn. Poza rozwiązaniem niejasności literaturowych dotyczących tej kwestii, istotnym wkładem w poznanie profilu farmakologicznego rdestowców było wykazanie równocześnie potencjału antyoksydacyjnego ekstraktów acetonowych z modelowego surowca, jakim są kłącza *R. japonica*, oraz nieprzebadanych w tym zakresie *R. sachalinensis* i *R. x bohemica*. Wyniki te stwarzają możliwość wykorzystania w celach leczniczych również tych taksonów.

Ostatnim etapem badań było określenie aktywności bakteriostatycznej i bakteriobójczej wyciągów z wszystkich trzech analizowanych rdestowców wobec czterech patogennych szczepów *Streptococcus*, związanych z rozwojem próchnicy zębów. Dodatkowo sprawdzono, czy w stężeniach na poziomie wartości MIC i MBC wyciągi te nie uszkadzają prawidłowych fibroblastów, będących izolatami z jamy ustnej. Takie kompleksowe podejście do zagadnienia zasługuje na duże uznanie.

W mojej opinii najistotniejszymi efektami prowadzonych badań są:

- i. określenie profilu fitochemicznego, uwzględniającego aż 171 związków, dla trzech przedstawicieli rodzaju *Reynoutria*, w tym gatunku farmakopealnego;
- ii. izolacja i ustalenie struktury 4 związków stwierdzonych po raz pierwszy w rdestowcach, w tym jednego uprzednio nie opisanego w światowej literaturze

naukowej. Jest to 3,6-*O*-di-*p*-kumarylo)- β -fruktofuranozylo-(2 \rightarrow 1)-(2'-*O*-acetylo-6'-*O*-feruloilo)- β -glukopiranozyd,

iii. zdefiniowanie zestawu fitoskładników, pozwalającego na jednoznaczne odróżnienie farmakopealnego surowca, jakim są kłącza *Reynoutria japonica*, od spokrewnionych i morfologicznie zbliżonych *R. sachalinensis* i hybrydy *R. x bohémica*,

iv. opracowanie zwalidowanej metody HPLC-DAD-MS do oznaczania ilościowego ww. składników, przydatnej zarówno do celów farmaceutycznych, jak i badań poznawczych w zakresie bioróżnorodności rdestowców,

v. wykazanie niezbędności analiz zmierzających nie tylko do potwierdzenia tożsamości surowców farmakopealnych, ale także zróżnicowań między poszczególnymi sortami, wynikających z uwarunkowań siedliskowych,

vi. rozwiązanie niejasności dotyczących grup związków odpowiedzialnych za potwierdzoną w literaturze wysoką aktywność antyoksydacyjną *R. japonica*,

vii. ocena aktywności antyoksydacyjnej oraz przeciwbakteryjnej wykonana dla ściśle zdefiniowanych fitochemicznie wyciągów, co ułatwi porównywanie wyników z badaniami farmakologicznymi prowadzonymi przez innych autorów.

Chciałam w tym miejscu wyrazić uznanie dla ogromu wykonanej pracy fitochemicznej i wysokich umiejętności pani mgr Izabeli Nawrot-Hadzik, widocznych w swobodzie z jaką korzysta z nowoczesnych metod analitycznych oraz we właściwej interpretacji danych. Możliwość współpracy z innymi jednostkami pozwoliła Doktorantce szerzej zarysować podjęty problem badawczy, czego efektem jest wymieniona wyżej wielość osiągnięć naukowych.

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi kilka komentarzy.

Ocena profilu fitochemicznego mieszańca *Reynoutria x bohémica* wydaje mi się na tym etapie jedynie szacunkowa. Materiał do badań został zebrany tylko z jednego stanowiska. W przypadku gatunków macierzystych, tj. rdestowca ostrokończystego oraz sachalińskiego, dostępność danych literaturowych pozwala na prześledzenie i oszacowanie różnic w składzie wynikających m.in. z czynników środowiskowych. Jak wspomniano wyżej, Doktorantka w badaniach własnych również zaobserwowała, że surowiec pozyskany z *R. japonica* pochodzącego z Chin i z Polski nie jest równocenny. Tak więc dysponując już przetestowaną metodyką można by w przyszłości porównać zbiór różnych populacji rdestowca pośredniego aby móc ocenić, czy opisany w ramach niniejszej pracy doktorskiej profil fitochemiczny tego mieszańca jest cechą gatunkową czy osobniczą, uwarunkowaną w większym stopniu czynnikami środowiskowymi niż genetycznymi. Autorka zresztą w dysertacji wspomina o planach wykorzystania opracowanej metody do rozróżniania gatunków rdestowców z uwzględnieniem ich ploidalności oraz krzyżówek wtórnych.

Związane z powyższym wątkiem pytanie dotyczy analizowanego w pracy rdestowca ostrokończystego. We wstępie rozprawy Doktorantka wyszczególnia, że znanych jest pięć odmian *Reynoutria japonica*, czy

wiadomo, która z nich została zebrana jako materiał do badań w Polsce oraz zakupiona w Chinach?

Kolejna uwaga dotyczy aktywności antyoksydacyjnej. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania i opracowanie wyników z użyciem analizy PCA wykazały, że istotny wpływ na obserwowany efekt mają przede wszystkim galoilowane procyjanidyny. Należy podkreślić, że wynik ten zrewidował pogląd o decydującym wpływie związków stilbenowych, co stanowi cenny wkład w wiedzę o zależnościach między chemizmem a aktywnością rdestowców. Czy jednak można wiązać potencjał antyoksydacyjny zależny od procyjanidyn z przełożeniem na aktywność farmakologiczną i szersze wykorzystanie nie uznawanych do tej pory za surowce farmakopealne kłączyc rdestowców sachalińskiego i pośredniego, co sugeruje Autorka, jest kwestią dyskusyjną. Niezależnie od obiecujących wyników *in vitro* procyjanidyny dimeryczne i trimeryczne wykazują się słabą biodostępnością i efekt obserwowany *in vivo* będzie raczej zależny od ich metabolitów.

W omówieniu teoretycznym stanowiącym część rozprawy doktorskiej zabrakło mi też szerszego komentarza dotyczącego zaobserwowanej aktywności przeciwbakteryjnej wobec patogennych szczepów *Streptococcus* odpowiedzialnych za rozwój próchnicy zębów oraz innych schorzeń w obrębie jamy ustnej. W odnośnej publikacji (C) jest on z racji wymogów czasopisma ograniczony i ukierunkowany na niezaprzeczalnie ciekawą dyskusję odnoszącą się do składu chemicznego. Porównano tu wyniki innych autorów uzyskane dla wyciągu metanolowego z *R. japonica* oraz dla izolowanych związków typowych dla rdestowców, jak emodyna czy stilbeny. Natomiast w tekście rozprawy, Autorka komentuje uzyskane przez siebie wyniki wyłącznie dla analizowanych trzech rdestowców konstatując, że „wyciąg z *R. japonica* można uznać za potencjalny antybakteryjny środek, pomocny w prewencji i leczeniu próchnicy”. Wniosek ten wydaje się nie do końca przekonujący. Uzyskane wartości MIC i MBC dla ww. wyciągu, które mieściły się w granicach 1000-2000 µg/ml, nie przewyższają tych opisanych w literaturze dla wielu innych surowców fenolowych (np. *Camelia sinensis*). W tym zakresie proponowany gatunek wydaje się też mało konkurencyjny w stosunku do innych, tradycyjnie wchodzących w skład preparatów do higieny jamy ustnej, jak np. *Salvia officinalis* czy *Zingiber officinale* (MIC 256 µg/ml wobec *S. mutans* w Hasan S et al. BMC Microbiol. 2015,15,1).


Natomiast bardzo ciekawym elementem badań własnych Doktorantki była równoczesna ocena wpływu wyciągów z analizowanych rdestowców na żywotność fibroblastów jamy ustnej. To podejście dostarcza istotnych informacji związanych z bezpieczeństwem stosowania. Sugerowany przez Doktorantkę stymulujący wpływ niskich stężeń ekstraktu z *Reynoutria japonica* na żywotność ludzkich fibroblastów i proponowane wykorzystanie go w leczeniu uszkodzeń dziąseł należałoby potwierdzić testami oceniającymi wpływ na proliferację tych komórek.

Powyższe komentarze są jedynie głosem w dyskusji i nie wpływają na moją bardzo pozytywną opinię o pracy doktorskiej pani mgr Izabeli Nawrot-Hadzik.

Zarówno pod względem merytorycznym jak i formalno-językowym spełnia ona wszelkie wymagania stawiane doktoratom z zakresu nauk farmaceutycznych. Zawarte w rozprawie treści świadczą o wysokim poziomie wiedzy i umiejętności Autorki. Jest to dodatkowo poparte znaczącym dorobkiem nie wchodzącym w zakres recenzowanej pracy doktorskiej, obejmującym 11 publikacji oryginalnych i poglądowych o łącznym IF = 10,146 oraz 30 doniesień konferencyjnych.

Tematyka ocenianej rozprawy jest bardzo aktualna, a ponadto ma wyraźny walor aplikacyjny. Wszystkie założone cele zostały zrealizowane, a wyniki opublikowano na łamach renomowanych czasopism z bazy JCR, co potwierdza walor naukowy prowadzonych przez Doktorantkę badań i stanowi istotny wkład w literaturę światową z obszaru farmakognozji i fitochemii.

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie pani magister Izabeli Nawrot-Hadzik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, co zawarłam w odrębnym piśmie skierowanym do Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UM we Wrocławiu.


Katedra i Zakład
Farmakognozji UJ CM
Irma Podolak *dr hab. Irma Podolak*
p.o. Kierownik