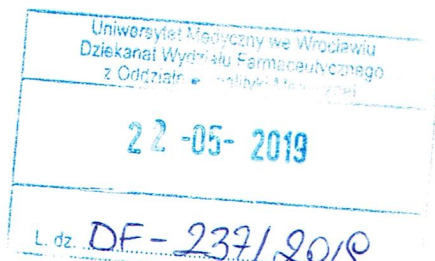




**dr hab. n. farm. Katarzyna Szewczyk**  
**UNIwersytet Medyczny w Lublinie**  
**KATEDRA I ZAKŁAD BOTANIKI FARMACEUTYCZNEJ**  
ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin, tel. (81) 81448 7060, fax (81) 81448 7060

---

Lublin, 17.05.2019



**Recenzja**

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Izabeli Nawrot-Hadzik pt. „Różnorodność fitochemiczna  
kłączy inwazyjnych roślin leczniczych z rodzaju *Reynoutria* oraz ich aktywność  
przeciwdrobnoustrojowa i przeciwutleniająca”.**

Przedłożona do oceny praca doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pod kierunkiem Promotora, Pana prof. dr. hab. Adama Matkowskiego oraz Promotora pomocniczego, Pana dr. Sylwestra Ślusarczyka.

Wyniki pracy doktorskiej stanowią istotny wkład w cykl 3 spójnych tematycznie publikacji o łącznym współczynniku oddziaływania  $IF=7.486$ . Badania prowadzone przez Doktorantkę były finansowane z ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji nr. DEC-2012/07/N/NZ7/02420 w ramach grantu PRELUDIUM oraz w ramach grantu OPUS 2011/03/B/NZ9/04763.

Głównymi kierunkami zawartych w pracy doktorskiej zainteresowań badawczych Pani mgr Izabeli Nawrot-Hadzik było opracowanie i zwalidowanie metody analitycznej do jednoczesnego oznaczenia ilościowego związków istotnych dla różnicowania *Reynoutria japonica*, *R. sachalinensis* i *R. x bohemica*, oznaczenie składu fitochemicznego otrzymanych wyciągów i frakcji z kłączy rdestowców z jednoczesnym zbadaniem ich aktywności antyoksydacyjnej oraz wykorzystanie metod statystycznych w celu wyjaśnienia wpływu zidentyfikowanych związków na aktywność antyoksydacyjną ekstraktów i frakcji, jak również zweryfikowanie, w oparciu o tradycyjne zastosowanie w ziołolecznictwie Azji Wschodniej, działania przeciwbakteryjnego ekstraktów z kłączy rdestowców wobec szczepów bakterii odpowiedzialnych za powstawanie

próchnicy oraz określenie ich cytotoksyczności w stosunku do fibroblastów pozyskanych z jamy ustnej pacjenta.

W ostatnich latach ponownie wzrosło zainteresowanie substancjami pochodzenia roślinnego, które mogą być potencjalnymi, obiecującymi terapeutykami w profilaktyce i leczeniu między innymi chorób infekcyjnych (bakteryjnych, wirusowych), pasożytniczych czy grzybiczych. Wchodzące w skład wyciągów roślinnych metabolity są zróżnicowane zarówno pod względem aktywności jak i budowy chemicznej, dlatego w określeniu składu jak i standaryzacji i kontroli jakości produktów pochodzenia roślinnego kluczową rolę odgrywa analiza fitochemiczna. Opracowanie odpowiedniej metodyki, która pozwoliłaby na identyfikację i/lub wyizolowanie jak największej ilości związków biologicznie czynnych, a także możliwość zastosowania jej przy prawidłowej identyfikacji materiału roślinnego stosowanego w lecznictwie, jest niezwykle istotne. Kłaczę rdestowca ostrokończystego (*Reynoutria japonica* Houtt.) jest dobrze poznanym fitochemicznie surowcem farmakopealnym, stosowanym w leczeniu chorób o podłożu zapalnym w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej. Na terenie Polski, oprócz *R. japonica* występują *R. sachalinensis* i mieszańce *R. x bohemica*, wykazujące duże podobieństwo morfologiczne do taksonu farmakopealnego. Farmakopea Europejska przy identyfikacji surowca przewiduje oznaczenie zawartości tylko dwóch związków – emodyny i polidatyny dwiema metodami chromatograficznymi.

Podjęcie przez mgr Izabelę Nawrot-Hadzik badań nad zoptymalizowaniem metodyki analitycznej pozwalającej na oznaczenie w surowcach większej ilości związków służących do potwierdzenia tożsamości i standaryzacji badanych gatunków, jak również analizy składu fitochemicznego i zweryfikowania działania przeciwbakteryjnego wyciągów z kłaczy rdestowców, należy uznać za uzasadnione.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska stanowi 121 stronicowy maszynopis podzielony na cztery główne rozdziały, w ramach których Autorka wyodrębniła odpowiednio zaplanowane podrozdziały. Uzupełnieniem opisu są 3 rysunki i 11 tabel opracowanych w sposób przejrzysty, logiczny i estetyczny. Tekst napisany jest poprawnie zarówno pod względem stylistycznym, jak i logicznej kompozycji.

Oceniana dysertacja zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, stanowiące zwięzły i usystematyzowany opis, który pozwala na zapoznanie się ze stawianą hipotezą badawczą, celem i wynikami badań.

We Wstępie stanowiącym część teoretyczną, Doktorantka zapoznaje czytelnika z gatunkami *Reynoutria*, akcentując braki w dotychczas przeprowadzonych badaniach. Następnie, na 28 stronach

Autorka umiejętnie przedstawiła charakterystykę botaniczną badanych gatunków z uwzględnieniem pozycji taksonomicznej i obszarem występowania, a także dotychczasowy stan badań odnośnie składu chemicznego oraz właściwości i zastosowań w lecznictwie. Istotnym elementem tej części rozprawy jest podrozdział dotyczący różnorodności fitochemicznej, w którym Pani magister dokonała dokładnego podsumowania literatury dotyczącej chemizmu kłączy rdestowców zamieszczając własne wyniki w tym kierunku.

Doktorantka odwołała się do 91 pozycji literaturowych, nie licząc łącznie 98 cytacji w trzech publikacjach tworzących cykl. Piśmiennictwo zostało dobrane w sposób odpowiedni, pochodzi z lat 1954 – 2019 i dotyczy badań podjętych w dysertacji.

W kolejnym rozdziale Pani mgr I. Nawrot-Hadzik zamieściła kopie trzech publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, poprzedzone zwięzłym i przejrzystym omówieniem metodyki, dostosowanej do postawionego celu pracy, oraz wyników badań. Doktorantka zaplanowała i przeprowadziła analizę fitochemiczną kłączy gatunku farmakopealnego *Reynoutria japonica* oraz morfologicznie podobnych, słabo poznanych *R. sachalinensis* i mieszańca *R. x bohemica*. Opracowała zwalidowaną metodę analityczną umożliwiającą jednoczesne oznaczenie ilościowe związków istotnych dla różnicowania badanych taksonów, w tym również zbadanie równoważności surowca farmakopealnego pochodzącego z Chin i z Polski. Zbadła ponadto aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z kłączy i wpływ poszczególnych związków chemicznych na całkowity potencjał antyoksydacyjny z wykorzystaniem metod statystycznych, a także aktywność przeciwbakteryjną wyciągów acetonowych.

W materiał do badań Autorka zaopatrzyła się samodzielnie na stanowiskach naturalnych (materiał porównawczy surowca farmakopealnego został zakupiony w aptece w Chinach), zgodnie z najlepszą metodyką botaniczną, z zachowaniem informacji o stanowisku, rewizją oznaczenia gatunków oraz zdeponowaniem okazów dowodowych w zielniku Ogrodu Botanicznego Roślin Leczniczych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, co zostało każdorazowo zaznaczone w metodyce manuskryptów.

Lista nowości w ocenianej rozprawie doktorskiej jest pokaźna. Przede wszystkim zaliczyć tu należy stwierdzenie po raz pierwszy w badanych gatunkach związków z klasy glikozydów diantronów, disacharydowych estrów fenylopropanoidów, pochodnych kwasu hydroksycynamonowego i oligomerów ligniny. Doktorantka po raz pierwszy zidentyfikowała również procyjanidyny o wysokim stopniu polimeryzacji w kłączach *R. sachalinensis* i *R. x bohemica*, a także potwierdziła ich obecność w kłączach *R. japonica*. Na dodatkowy komentarz zasługuje wyizolowanie przez mgr Nawrot-Hadzik czterech związków chemicznych, po raz pierwszy stwierdzonych w badanych surowcach – hydropiperozydu, wanikozydu C, tatarozydu B i nowopoznanego (3,6-*O*-di-*p*-kumarylo)- $\beta$ -fruktofuranozylo-(2 $\rightarrow$ 1)-(2'-*O*-acetylo-6'-*O*-feruloilo)-

$\beta$ -glukopiranozydu. Dla wszystkich wyizolowanych związków starannie zostały przeanalizowane widma magnetycznego rezonansu jądrowego  $^1\text{H-NMR}$  i  $^{13}\text{C-NMR}$ .

W ramach badań własnych, Pani mgr Izabela Nawrot-Hadzik przeprowadziła niezwykle szczegółową charakterystykę fitochemiczną ekstraktów wykonaną z zastosowaniem metody HPLC/UV/ESI-MS i HPLC-DAD-MS. Powyższą metodą scharakteryzowała całkowicie lub częściowo struktury ponad 130 związków z różnych grup chemicznych, które przedstawiła w opracowanych interesująco trzech pracach opublikowanych na łamach renomowanych czasopism JCR. Ten fakt świadczy o wysokich walorach naukowych prowadzonych przez Doktorantkę badań, wnoszących istotny wkład w światową literaturę naukową z obszarów fitochemii. O poziomie ekspertyzy badawczej Pani magister świadczy również zaplanowanie i wykonanie badań *in vitro* w kierunku aktywności antyoksydacyjnej i przeciwgrzybiczej kłączy badanych gatunków. Godnym uwagi jest wykazanie przez Autorkę, że za silną aktywność antyoksydacyjną odpowiedzialne są nie tylko, jak dotąd sądzono, stilbeny, ale także proantocyjanidyny obecne zarówno w surowcu farmakopealnym jak i dwóch pozostałych surowcach. Biorąc pod uwagę tradycyjne wykorzystanie kłączy rdestowca ostrokończystego do utrzymania higieny jamy ustnej, kolejnym zrealizowanym z sukcesem celem badań Doktorantki była ocena aktywności przeciwbakteryjnej wyciągów acetonowych z kłączy *R. japonica*, *R. sachalinensis* i *R. x bohemica* wobec czterech szczepów patogennych odpowiedzialnych za choroby w obrębie jamy ustnej, w tym za rozwój próchnicy zębów. Dzięki uzyskanym wynikom badań, Pani magister wskazała ekstrakt *R. japonica* jako potencjalny środek antybakteryjny, który mógłby się okazać pomocny w prewencji i leczeniu próchnicy, jak również w leczeniu chorób i uszkodzeń dziąseł.

Ostatni rozdział rozprawy doktorskiej stanowią Załączniki, w których Pani magister zamieściła oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w przedstawiony do oceny cykl, jak również wykaz wszystkich publikacji Autorki. Dowiadujemy się w nim, że całkowity dorobek naukowy Doktorantki stanowi 14 pełnotekstowych prac w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Pani mgr Izabela Nawrot-Hadzik jest również współautorem 30. doniesień prezentowanych na konferencjach międzynarodowych i krajowych. Sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor równy jest 17,632, co odpowiada 247 punktom MNiSW.

Całokształt wyników ujętych w przedstawionej do oceny dysertacji jednoznacznie dowodzi, że przedsięwzięcie badawcze, jakiemu stawiała czoła Doktorantka, zakończyło się dużym sukcesem. Dysertacja przygotowana jest starannie, opatrzona odpowiednią szatą graficzną ułatwiającą lepsze przyswojenie dużej ilości danych.

Reasumując, zarówno pod względem merytorycznym, jak i graficznym praca spełnia wszelkie wymagania stawiane doktoratom z zakresu nauk farmaceutycznych, a zawarta w niej treść

świadczy o poziomie wiedzy i umiejętności Pani mgr Izabeli Nawrot-Hadzik, w pełni kwalifikującym ją do ubiegania się o stopień doktora.

Czytając przedłożoną do oceny pracę doktorską nasunęło mi się następujące pytanie i uwaga:

1. Na podstawie otrzymanych wyników badań biologicznych dotyczących aktywności przeciwbakteryjnej, Doktorantka mogła pokusić się o wyznaczenie indeksu terapeutycznego IT, będącego wskaźnikiem bezpieczeństwa potencjalnego leku. Autorka wspomina ponadto o silnej aktywności bójczej wyciągów *R. japonica*. Czy w związku z tym podjęto jakieś działania w celu oceny ich bezpieczeństwa i profilu farmaceutycznego (właściwości ADME-Tox)?

Natknęłam się również na kilka drobnych uchybień redakcyjnych:

1. Strona 15 akapit 2 wiersz 8 – rdestwoców, powinno być rdestowców, str. 17 akapit 1 wiersz 1 – wydajnemy winno być wydajnemu, str. 18 akapit 2 wiersz 5 – rdestwca powinno być rdestowca, str. 20 akapit 1 wiersz 20 – identyfikowanego zamiast identyfikowanego, str. 27 akapit 1 wiersz 5 – procyanidyn powinno być procyjanidyn, str. 29 akapit 1 wiersz 2 – badany powinno być badanych, str. 47 akapit 1 wiersz 6 – alkohol sinapylwy winno być sinapylowy, str. 47 akapit 1 wiersz 17 - (3,6-*O*-di-*p*-kumarylo)- $\beta$ -fruktofuranosylo-(2 $\rightarrow$ 1)-(2'-*O*-acetylo-6'-*O*-feruloilo)- $\beta$ -glukopyranozyd powinno być (...) - $\beta$ -glukopiranozyd.

Te drobne niedostatki nie wpływają na moją wysoce pozytywną opinię na temat niniejszej pracy doktorskiej.

### **Podsumowanie**

Rozprawa doktorska Pani mgr Izabeli Nawrot-Hadzik składa się z trzech prac naukowych opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej, a ich sumaryczny współczynnik oddziaływania IF wynosi 7.486. Osiągnięcie jako całość można określić jako nowatorskie i interdyscyplinarne, a tym samym świadczące o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Wysoko oceniam przedłożoną mi do oceny rozprawę doktorską i stwierdzam, że spełnia ona wszystkie wymogi zarówno merytoryczne jak i formalne wynikające z ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie Pani magister Izabeli Nawrot-Hadzik do dalszych etapów postępowania w ubieganiu się o stopień naukowy doktora, a następnie przyznanie Jej rzonego stopnia. Równocześnie, ze względu na wysoki poziom rozprawy, wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie opiniowanej pracy.

17.05.2018

Katarzyna Szaryn