



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL

Gdańsk, 12.03.23

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Hanny Nikolaichuk

pt: „Effect-Directed Analysis of *Rhodiola Rosea* L. based on Planar Chromatography: the Search for Bioactive Components”

**wykonanej pod kierunkiem promotora dr hab. Ireny Chomy, prof.
UMCS**

i promotora pomocniczego dr Marka Studzińskiego

przedstawionej

**Wysokiej Radzie Instytutu Nauk Chemicznych Uniwersytetu Marii
Curie-Skłodowskiej w Lublinie**

Pragnę złożyć podziękowania Wysokiej Radzie Instytutu Nauk Chemicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie za powierzenie mi zaszczytu recenzowania rozprawy doktorskiej mgr Hanny Nikolaichuk zatytułowanej „Effect-Directed Analysis of *Rhodiola rosea* L. based on Planar Chromatography: the Search for Bioactive Components” przygotowanej w Katedrze Chromatografii Instytutu Nauk Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem promotora dr hab. Ireny Chomy, prof. UMCS i jako promotora pomocniczego dr Marka Studzińskiego.

Rośliny są źródłem zróżnicowanych strukturalnie różnych grup związków czynnych biologicznie - metabolitów wtórnych, decydujących o ich działaniu i zastosowaniu w lecznictwie. Ich obecność determinuje dwie podstawowe właściwości leków roślinnych – synergizm i poliwalencję. Celem osiągnięcia powtarzalnego efektu terapeutycznego lecznicze produkty roślinne są kontrolowane w zakresie zawartości związków czynnych – standaryzacja, jak i tych, które mogą obniżać jakość produktu ziołowego lub powodować działania niepożądane. Wymagania jakościowe odnoszące się do wszystkich kategorii leków roślinnych

- tradycyjnych oraz o ugruntowanym zastosowaniu, nie obowiązują w stosunku do pozostałych kategorii produktów ziołowych – ziołowych suplementów diety, ziołowych produktów spożywczych obecnych na rynku, i dostępnych w sklepach zielarskich czy w sprzedaży internetowej. Stanowi to duże zagrożenie dla zdrowia, głównie konsumentów tych produktów.

Produkty lecznicze roślinne zarówno tradycyjne jak i o ugruntowanym zastosowaniu, mają potwierdzoną skuteczność i bezpieczeństwo stosowania, w oparciu o badania naukowe – farmakognostyczne, farmakologiczne, biochemiczne czy z obszaru biologii molekularnej i badania kliniczne, w tym przeglądy systematyczne i meta-analizy. Ponadto prowadzone w stosunku do znanych i stosowanych już leczniczych produktów roślinnych, nowe badania kliniczne, uwzględniające wyniki badań eksperymentalnych, pozwalają na poszerzenie ich zakresu wskazań klinicznych.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska wpisuje się w te obszary badawcze - poszukiwanie nowych kierunków aktywności dla znanych już i wykorzystywanych leczniczo surowców roślinnych, oraz ocenę ich skuteczności i bezpieczeństwa stosowania.

Pracę doktorską mgr Hanny Nikolaichuk stanowi cykl 5 prac eksperymentalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach w latach 2019-2023 o łącznej wartości współczynnika wpływu IF₂₀₂₁ – 15.882, i punktacji MEiN₂₀₂₁ 460, mianowicie

1. H. Nikolaichuk, J.M. Choma, TLC screening in searching for active components in *Rhodiola rosea* L. roots. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Lublin - Polonia. Section AA-Chemia LXXIV* (2019), pp. 55-64 (IF-; pkt. MEiN: 20)

2. H. Nikolaichuk, M. Studzinski, I.M. Choma, Effect directed detection of *Rhodiola rosea* L. root and rhizome extract. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 43 (2020), pp. 361-366 (IF 1.467; pkt. MEiN: 40) (kwartyl 2)

3. H. Nikolaichuk, R. Typek, S. Gnat, M. Studzinski, I.M. Choma, Effect-directed analysis as a method for quality and authenticity estimation of *Rhodiola rosea* L. preparations. *Journal of Chromatography A*, 1649 (2021) 462217 (IF 4.601; pkt. MEiN: 100) (kwartyl 1)

4. H. Nikolaichuk, M. Studzinski, M. Stankevic, I.M. Choma, Qualitative and quantitative evaluation of rosavin, salidroside, and p-tyrosol in artichoke root products via TLC-screening, HPLC-DAD, and NMR spectroscopy. *Molecules* 27 (2022) 8299 (IF 4.927; pkt. MEiN: 140) (kwartyl 2)

5. H. Nikolaichuk, I.M. Choma, G.E. Morlock, Bioactivity profiles on 15 different effect mechanisms for 15 golden root products via high-performance thin-layer chromatography, planar assays, and high-resolution mass spectrometry. *Molecules* 28 (2023) 1535 (IF 4.927; pkt. MEiN: 140)

oraz 1 pracy przeglądowej, stanowiącej rozdział w książce J.M. Choma, H. Nikolaichuk, TLC-bioprofiling - A tool for quality evaluation of medical plants, in: Pulok Mukherjee (Ed.) Evidence-based validation of herbal medicine. Translational research on botanicals. Second edition, Elsevier 2022, pp. 407-422 (IF-; pkt. MEiN: 20). Większość czasopism w których zostały opublikowane wyniki prac Doktorantki należy do kwartyła 2, a jedna do kwartyła 1, co potwierdza wysoką wartość naukową przedstawionej dysertacji.

We wszystkich pracach eksperymentalnych Doktorantka jest pierwszą autorką, natomiast w rozdziale w książce, koncentrującym się na zagadnieniach związanych z bioprofilowaniem TLC jako narzędziem do oceny jakości roślin leczniczych, „stanowiącym bardzo dobre odniesienie do podjętej tematyki badawczej, jest drugim w stosunku do pozostałych. Do rozprawy dołączono oświadczenia wszystkich współautorów (6 współautorów) publikacji objętych cyklem, określające ich udział w pracach. Doktorantka opisała swój wkład jako główny lub równy, w porównaniu do pozostałych współautorów, w następujących obszarach: sformułowanie problemu naukowego, planowanie eksperymentów i metodologii badań, przeprowadzenie analizy danych, interpretacja rezultatów, przygotowanie pierwszego draftu manuskryptu oraz finalizację manuskryptu i jego wysłanie do czasopisma. Na tle przedstawionych i załączonych pozostałych deklaracji, udział Doktorantki można uznać za wiodący.

Przedmiotem badań Doktorantki jest znany jako adaptogen w medycynie tradycyjnej Wschodu różeniec lekarski – *Rhodiola rosea* L. (Crassulaceae), a twórcami opatentowanego, standaryzowanego m. in. na rozawiny czy salidrozyd, wyciągu z korzeni/kłączy - ekstraktu WS® 1375, rejestrowanego w Europie jako produkt leczniczy roślinny z bardzo dużą liczbą badań klinicznych, są niemieccy naukowcy. Skład chemiczny surowca w zakresie związków determinujących jego zastosowanie w leczeniu jest w dużym stopniu rozpoznany. Przeprowadzone w ramach niniejszej dysertacji eksperymenty chromatograficzne, z użyciem głównie chromatografii planarnej, wnoszą nowe informacje na temat aktywnych biologicznie związków, jako składników chemicznych *R. rosea*, poprzez otrzymanie różnych bioprofilu TLC wyciągów z surowca, z zastosowaniem ukierunkowanych i nieukierunkowanych na efekt testów biologicznych i odczynników wywołujących. Autorka z użyciem bioautografii oceniła aktywność biologiczną składników fitochemicznych surowca (pojedynczych - rozawiny, rozaryny, rozyrydiny, wirydozydu i rozyny, rodiolozydu D, salidrozydu, p-tyrozolu, hydrochinonu, kwasu palmitynowego i stearynowego, jako wyselekcjonowanych składników ekstraktów - przetworów poprzez oznaczenie hamowania aktywności enzymatycznej α -glukozydazy, β -glukuronidazy, α -amylazy, lipazy i tyrozynazy, butyrylocholinoesterazy (BChE), acetylocholinoesterazy (AChE). Oznaczyła również z użyciem testów planarnych potencjał antyoksydacyjny (test DPPH) wyciągów z różenia, który jest i stanowi element

działania przeciwzapalnego ekstraktów i związków pochodzenia roślinnego. Aktywność hamująca oksydazę ksantyny nie została potwierdzona przez Autorkę w odniesieniu do przetworów z różeńca, jako potencjalnie blokujących wytwarzanie kwasu moczowego. Scharakteryzowała przeciwdrobnoustrojowe efekty wobec szczepów bakterii Gram-ujemnych *Allivibrio fischeri* i Gram-dodatnich *Bacillus subtilis*, potencjalną aktywność hormonalną – estrogenową i androgenową oraz genotoksyczność. Do identyfikacji związków – składników przetworów z różeńca o wykazanej aktywności użyła stosowanych powszechnie w badaniach fitochemicznych chromatograficznych metod sprzężenia - off- line HPLC-ESI-MS, jak również HPTLC-HPLC-HESI -HRMS online z mikropreparacją składników stref na chromatogramach TLC wykazujących badaną aktywność biologiczną. Umożliwiło to identyfikację około 29 składników badanych substancji roślinnych, z grupy fenylopropanoidów, flawonoidów, kwasów fenolowych i alkoholi, kwasów tłuszczowych, cukrów i innych. Przeprowadzenie testów było możliwe poprzez optymalizację warunków rozdzielania metodą TLC składników przetworów z różeńca. Jakkolwiek należy zauważyć, że TLC jest techniką o słabszej sprawności i efektywności separacji niż HPLC w analizie złożonych matryc pochodzenia roślinnego. Na podstawie przeprowadzonych testów ukierunkowanych na efekt (biologiczny) można wnioskować, że wzbogacone w te związki ekstrakty z różeńca mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w terapii zespołu metabolicznego, cukrzycy, chorób demencyjnych i in. W toku prac, przeprowadziła ocenę jakościową i ilościową podstawowych związków czynnych surowca - rozawiny, salidrozydu i p-tyrozolu z wykorzystaniem HPLC-DAD i ¹H NMR, przy czym obecność rozawiny wykazała tylko w trzech badanych materiałach roślinnych, natomiast salidrozydu i p-tyrozolu tylko u czterech z siedmiu badanych. Nasuwa się pytanie, dlaczego Autorka nie przeprowadziła pełnej walidacji opracowanej metody ilościowego oznaczania. W oparciu o wypracowane procedury wykazała słabą jakość, dostępnych na rynku, produktów z różeńcem o charakterze suplementów diety i innych. Ambitnie zaplanowane i zrealizowane zadania badawcze, przeprowadzenie wielu różnorodnych testów aktywności biologicznej, badania identyfikacyjne z wykorzystaniem spektrometrii mas i magnetycznego rezonansu jądrowego wymagało od Doktorantki bardzo dużego nakładu pracy, podjęcia i utrzymywania współpracy z wieloma ośrodkami naukowymi, w tym m.in. z prof. dr hab. Gertrudą Morlock – kierownikiem Food Science w Institute of Nutritional Science Uniwersytetu Justusa Liebiga w Giessen (Niemcy). Niewątpliwie, w ukierunkowaniu poczynań badawczych Doktorantki, ogromne znaczenie miały doświadczenie naukowe promotora pracy, dr hab. Ireny Chomy, prof. UMCS i jej kontakty oraz współpraca z najwybitniejszymi europejskimi specjalistami w obszarze chromatografii planarnej.

Doktorantkę bardzo pozytywnie charakteryzuje jej dorobek spoza realizacji pracy doktorskiej, jest ona współautorką jeszcze 4 prac eksperymentalnych opublikowanych (3)/ oraz w trakcie druku (1) na łamach takich czasopism jak *Molecules* (2), *Food chemistry* (1), *Food control* (1), znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports (JCR)*. Ponadto jest autorką i współautorką 41 doniesień zjazdowych, w dużej części stanowiących prezentacje ustne wygłoszone na konferencjach zagranicznych jak i krajowych. Odbyła 6- miesięczny staż naukowy w Justus Liebig University Giessen (Giessen, Germany), w ramach którego wykonywała eksperymenty związane z realizowanym tematem badawczym. Uczestniczyła w dwóch szkołach letnich - Summer School in Pharmaceutical Analysis (Bologna, Italy) i UMCS Summer School for PhD Students (Lublin, Poland). Ponadto bierze udział w realizacji projektu „Identyfikacja lipidomicznych biomarkerów rozpoznawania autentyczności olejów jadalnych wsparta profilowaniem DSC i chemometrią” Grant OPUS 16 2018/31/B/NZ9/02762. Doktorantka posiada umiejętność pracy w interdyscyplinarnych zespołach naukowych, zarówno z ośrodków krajowych: (Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Katedra Chemii Fizycznej i Katedra Chemii Organicznej Wydziału Chemii UMCS w Lublinie) jak i zagranicznych (Chair of Food Science, Institute of Nutritional Science, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany).

Przedstawiona do recenzji rozprawa została przygotowana z bardzo dużą starannością i nie odnotowałam w niej od strony redakcyjnej i edytorskiej obecności jakichkolwiek błędów. Zawarte na 4 stronach krótkie wprowadzenie teoretyczne do rozprawy, nakreśla tło podjętej tematyki badawczej, charakteryzując: aktualny stan wiedzy o produktach ziołowych, badany gatunek, w zakresie znaczenia leczniczego, technikę TLC , w tym chemiczne i biologiczne profilowanie z rozszerzeniem detekcji ukierunkowanej na efekt (*effect- directed detection* EDD) i techniki sprzężenia TLC (TLC-MS, TLC-NMR). Cel pracy został precyzyjnie określony, jako poszukiwanie bioaktywnych związków *Rodiola rosea* z zastosowaniem ukierunkowanej na efekt analizy opartej na separacjach osiągniętych techniką chromatografii planarnej. W kolejnych częściach, Doktorantka przedstawiła metodykę badawczą, omówienie wyników (18 stron) , wnioski końcowe i streszczenie.

Rozprawa doktorska mgr Hanny Nikolaichuk spełnia wymogi formalne i warunki określone w Ustawie 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 Wysokiej Rady Instytutu Nauk Chemicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Hanny Nikolaichuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie będąc przekonaną o wysokiej wartości naukowej przedstawionej dysertacji, jej wkładu w rozwój

wiedzy o produkcji ziołowym, w tym szczególnie badań jego jakości oraz poszukiwań nowych zastosowań w oparciu o badania aktywności biologicznej, oraz uwzględniając całokształt dorobku naukowego Doktorantki, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Hanny Nikolaichuk.

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