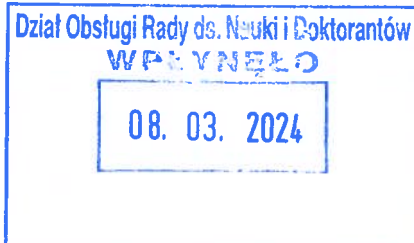




UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE



Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. Irma Podolak
Katedra i Zakład Farmakognozji

Kraków, 08. 03. 2024

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr farm. Małgorzaty Kołtun-Jasion

pt.

„Poszukiwanie związków pochodzenia naturalnego w terapii schorzeń o podłożu zapalnym”

zrealizowanej w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

pod opieką naukową Promotora, prof. dr hab. n. farm. Anny Kiss
oraz Promotora pomocniczego, dr n. farm. Agnieszki Filipek

Uwagi dotyczące strony formalnej

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska jest klasycznym opracowaniem o charakterze monografii naukowej, zawierającym stosowne streszczenie w języku angielskim i polskim co jest zgodne z aktualnymi wymaganiami ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 (z późn. zm.), artykuł 187, pkt. 3 i 4.

Częściowe wyniki eksperymentalne oraz treści teoretyczne, związane bezpośrednio z tematyką rozprawy, zgodnie z zamieszczoną przez Autorkę informacją, zostały opublikowane w punktowanych czasopismach z listy MEiN. Artykuł oryginalny w *International Journal of Molecular Sciences* (IF 6,208), przeglądowy – w *Plants* (IF 4,658). Pani mgr Małgorzata Kołtun-Jasion jest w nich wymieniona, odpowiednio, jako pierwszy i drugi autor.

Niniejsza recenzja odnosi się wyłącznie do tekstu dysertacji.

Uwagi dotyczące problematyki badawczej

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Kołtun-Jasion jest poświęcona istotnemu obszarowi badań w naukach farmaceutycznych, jakim jest poszukiwanie efektywnych leków bazujących na substancjach roślinnych. Wartość fitoterapeutyków jest zależna od standaryzacji procesu wytwarzania, zapewniającego maksymalną powtarzalność profilu



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

fitochemicznego oraz od potwierdzonej klinicznie skuteczności, która wynika z określonego mechanizmu działania bioaktywnych związków i ich biodostępności.

Mając na uwadze złożoność chemiczną każdej substancji roślinnej, bardzo ważną rolę odgrywają więc badania podstawowe, które pozwalają na etapie przedklinicznym wyselekcjonować, spośród wielu wyspecjalizowanych metabolitów obecnych w danej substancji roślinnej, fitoskładniki o pożądanej aktywności i zdefiniowanym molekularnym mechanizmie działania. W efekcie, możliwe jest określenie korelacji między ich zawartością a działaniem substancji roślinnej. W procesie rozwoju nowego leku, dane te przekładają się z kolei na wypracowanie odpowiednich protokołów ekstrakcji i frakcjonowania, ukierunkowanych na wytypowane związki, jak również na wytyczenie zasadnych wymogów standaryzacyjnych ujętych w monografiach farmakopealnych.

Badania mgr Małgorzaty Kołtun-Jasion doskonale wpisują się w te potrzeby. Ich atutem jest weryfikacja analizowanych substancji roślinnych i zawartych w nich związków w kontekście potencjału przeciwzapalnego, poprzez szczegółowe prześledzenie mechanizmów działania na poziomie *in vitro*. Stan zapalny, szczególnie przewlekły, odgrywa kluczową rolę w patogenezie licznych schorzeń. Szczególnie choroby nowotworowe i neurodegeneracyjne, rozwijają się miesiącami czy latami, zanim wystąpią objawy kliniczne, podczas gdy w organizmie postępują subtelne wieloukładowe zmiany, wynikające z trwającego metazapalenia. Zatem poszukiwania substancji roślinnych i ich składników oddziałujących na różne elementy tej złożonej reakcji obronnej organizmu, jest w pełni uzasadnione i jak najbardziej wskazane.

Doktorantka skupiła się na wybranych gatunkach forsycji i jesionów, należących do rodziny *Oleaceae*, którą cechuje specyficzny i złożony chemizm, obejmujący szereg grup metabolitów aktywnych biologicznie. Są to m.in. lignany, fenyloetanydy, irydoidy, flawonoidy, triterpeny czy kumaryny. Wybór materiału badawczego jest w moim odczuciu bardzo ciekawy, dał on Doktorantce możliwość prześledzenia różnic aktywności dla wachlarza strukturalnie odmiennych związków.

W kontekście badań nad innowacyjnymi produktami leczniczymi roślinnymi, jak również izolowanymi związkami pochodzenia naturalnego, mogącymi stanowić samodzielne leki, kluczowe znaczenie ma dostępność gatunku oraz dogłębne poznanie profilu fitochemicznego. Umożliwia to obserwację zmian jakościowo-ilościowych, zależnych od uwarunkowań glebowo-klimatycznych, okresu wegetacyjnego czy wieku rośliny, co przekłada się na wybór optymalnego czasu zbioru. Również ten aspekt został ujęty w badaniach prowadzonych przez Doktorantkę, co uważam za bardzo cenne.

Reasumując, problematyka rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Kołtun-Jasion doskonale wpisuje się we współczesne trendy badań z zakresu fitochemii i fitofarmakologii.

Uwagi dotyczące strony merytorycznej oraz metodologii.

Praca doktorska mgr Małgorzaty Kołtun-Jasion stanowi przykład scalonych badań fitochemiczno-fitofarmakologicznych, co jest podejściem przyjętym jako pewnego rodzaju



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

standard w światowych badaniach nad roślinami leczniczymi. Choć z reguły jedne z tych badań dominują, w tym przypadku mamy do czynienia z sytuacją, w której obie części są całkowicie równoważne i bardzo rozbudowane. Zakres przeprowadzonych eksperymentów jest imponujący, a ich poziom merytoryczny budzi ogromne uznanie. Bez wątplenia przyczyniło się do tego ogromne doświadczenie badawcze Promotora prof. dr hab. Anny Kiss oraz wsparcie metodyczne Promotora pomocniczego, dr Agnieszki Filipek.

Podstawowym zamierzeniem Doktorantki było uzyskanie dowodów eksperymentalnych, służących zweryfikowaniu hipotezy o potencjale roślin z rodziny *Oleaceae* jako rezerwuarze związków, mogących wspomagać terapię przewlekłych schorzeń o podłożu zapalnym. W tym celu, w badaniach aktywności *in vitro*, uwzględniono zarówno wyciągi z wybranych substancji roślinnych, jak i znaczący zestaw 33 izolowanych związków z grupy lignanów, fenyloetanoloidów, sekoirydoidów, glikozydów fenylopropanoidowych i flawonoidów, w tym aż 14 pozyskanych w ramach niniejszej pracy. Na wyróżnienie zasługuje dążenie Doktorantki do nakreślenia możliwie dokładnej sieci potencjalnych punktów uchwytu badanych związków, poprzez analizę całego szeregu mechanizmów działania na poziomie molekularnym.

Materiał roślinny stanowiły liście trzech przedstawicieli rodzaju *Forsythia* Vahl, tj. *F. suspensa* (Thunb.) Vahl (forsycja zwisła), *F. x intermedia* Zabel (f. pośrednia), *F. europaea* Degen&Bald (f. europejska) oraz gatunek rodzaju *Fraxinus* L. – *F. excelsior* L. (jesion wyniosły). Selekcję gatunków uzasadniono przesłankami etnofarmakologicznymi i chemofenetycznymi, przytaczając także opublikowane dane wskazujące na ich potencjał przeciwzapalny *in vitro*. Ponadto, wzięto pod uwagę rozpowszechnienie w Europie oraz status EMA.

Prace eksperymentalne są dobrze skonstruowane, kolejne ich etapy wynikają z logicznego wnioskowania i zawężania analiz do związków najbardziej aktywnych. Zgodnie z przyjętymi celami szczegółowymi, w pierwszej kolejności określono profil fitochemiczny wyciągów z analizowanych substancji roślinnych, dla forsycji dodatkowo z uwzględnieniem dwóch różnych okresów zbioru oraz oceniono ich wpływ na produkcję mediatorów stanu zapalnego (THF- α , IL-6, IL-1 β , TGF- β) i ekspresję receptora dla IL-10 w modelu fizjologicznych komórek układu odpornościowego, monocytów/makrofagów PMBC, stymulowanych lipopolisacharydem (LPS). W kolejnym etapie z aktywnych wyciągów i subfrakcji izolowano dominujące związki, przeprowadzając ponownie analizę w ww. modelu, oraz oceniając efekt w zależności od grupy chemicznej (tj. m.in. lignanów, fenyloetanoloidów, sekoirydoidów), poprzez uzupełnienie zestawu związków badanych o zbliżone struktury. Najbardziej aktywną grupą wyspecjalizowanych metabolitów okazały się lignany, dla których następnie poszerzono zakres badań określających mechanizmy molekularne o analizę wpływu na wydzielanie cytokin w modelu makrofagów linii THP-1 (wywodzącej się od pacjentów z ostrą białaczką monocytarną) oraz regulację ścieżek sygnałowych MAPK. Na koniec, dwa lignany – arktyine i arktygenine, oceniono pod



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

kątem wpływu na przekaznictwo sygnału za pośrednictwem receptorów TLR, a także regulację ścieżek sygnałowych NF- κ B i MAPK. Dodatkowym elementem badań była obserwacja stopnia akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów pod wpływem lignanów, w odniesieniu do pitawastatyny jako substancji referencyjnej, oraz wyjaśnienie mechanizmu tego procesu oceniając modyfikacje ekspresji białek określonych receptorów (CD36, ABCA1, HO-1).

Doktorantka zrealizowała wszystkie wytyczone cele, co świadczy o jej ambicji naukowej i ogromnej pracowitości. Skala badań, jak już nadmieniałam powyżej, robi wrażenie a pula uzyskanych wyników może stanowić podstawę co najmniej kilku kolejnych publikacji.

W mojej opinii do najważniejszych osiągnięć o charakterze aplikacyjnym i poznawczym można zaliczyć:

- i. przeprowadzenie szerokiej analizy profilu fitochemicznego i aktywności przeciwzapalnej substancji roślinnych dotąd nie wykorzystywanych w medycynie europejskiej, tj. liści forsycji zwisłej (*Forsythia suspensa*) i pośredniej (*F. x intermedia*), wraz ze wskazaniem związków aktywnych, określeniem molekularnego mechanizmu działania oraz optymalnej pory zbioru, co może stanowić podstawę do ich wykorzystania we wspomaganiu terapii schorzeń o podłożu zapalnym
- ii. dostarczenie nowych danych eksperymentalnych uzasadniających oraz mogących poszerzyć dotychczasowe wskazania zgodne z wytycznymi EMA do stosowania liści jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior*) wraz z identyfikacją związków aktywnych i określeniem ich mechanizmu działania
- iii. przebadanie w tym samym modelu eksperymentalnym przedstawicieli kilku grup wyspecjalizowanych metabolitów roślinnych typowych dla rodziny *Oleaceae*, w tym lignanów (aż 19 związków), sekoirydoidów (7 związków) i fenyloetanoidów (5 związków), co pozwoliło na porównanie ich potencjału przeciwzapalnego i mechanizmów działania
- iv. wykazanie, że metabolity roślinne o strukturze lignanów (np. arktygenina, filiryina), sekoirydoidów (np. oleuropeina, hydroksyoleinuzhenid), fenyloetanoidów (np. forsytozydy A i B) mogą stanowić związki wiodące w poszukiwaniach efektywnych leków przeciwzapalnych o zróżnicowanych molekularnych punktach uchwytu
- v. zwrócenie uwagi na zależności struktura-aktywność przeciwzapalna, szczególnie w grupie sekoirydoidów, pochodnych nuzhenidu
- vi. wykazanie, w oparciu o kompleksową analizę mechanizmów procesu akumulacji cholesterolu w modelu z użyciem makrofagów, że lignany roślinne, szczególnie arktygina, arktygenina, trachelogenina, mogą być rozpatrywane jako substancje wiodące w dalszych badaniach ukierunkowanych na potencjalne wykorzystanie w terapii zaburzeń lipidowych i profilaktyce miażdżycy



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Imponujące są efekty samych prac fitochemicznych, szczególnie izolacyjnych. W ramach swoich badań Doktorantka wyodrębniła i potwierdziła struktury aż 14 jednorodnych związków, w tym 9 lignanów z liści *Forsythia spp.* (arktyina, filiryna, filigenina, a także matairezynol, pinorezinol i epipinorezinol oraz ich glukozydy), 3 fenylotanoidów z liści forsycji i jesionu wyniosłego (werbaskozyd, forsytozyd A, oleoaktozyd) oraz dwóch sekoirydoidów z liści *F. excelsior* (8E-formozyd, 8E-ligstrozyd).

Wymienione powyżej osiągnięcia są niewątpliwym sukcesem Doktorantki i stanowią oryginalne rozwiązanie podjętych zadań badawczych, wnosząc przy tym istotny zasób nowej wiedzy o potencjale terapeutycznym analizowanych gatunków z rodziny *Oleaceae*. W tym aspekcie rozprawa mgr Małgorzaty Kołtun-Jasion całkowicie spełnia wymaganie sformułowane w artykuł 187, pkt. 2 Ustawy.

Strona metodologiczna nie budzi żadnych zastrzeżeń, kilka niedociągnięć, które zauważyłam (wymienionych w dalszej części recenzji) nie wpływa na jakość badań. Doktorantka potwierdziła swoje wysokie umiejętności, korzystając zarówno z nowoczesnych metod analitycznych, separacyjnych i spektralnych, jakimi operuje współczesna fitochemia, oraz badań z wykorzystaniem modeli komórkowych *in vitro* i metod immunochemicznych. W toku analiz profilu fitochemicznego, izolacji i identyfikacji związków, posługiwała się ultrasprawną chromatografią cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (UHPLC-DAD-ESI-MS/MS), konwencjonalną chromatografią kolumnową, preparatywną wysokosprawną chromatografią cieczową, korzystała z danych 1D i 2D NMR. Prowadząc badania biologiczne wykorzystowała całe spektrum metod, m.in. spektrofotometrycznych (testy MTT, LDH, ELISA), cytometrię przepływową, real-time PCR, western blot, elektroforezę, mikroskopię fluorescencyjną.

Było to możliwe dzięki bardzo dobremu wyposażeniu macierzystej jednostki, w której mgr Małgorzata Kołtun-Jasion realizowała studia doktoranckie, tj. Katedrze Biologii Farmaceutycznej WUM oraz szerokiej współpracy, co zostało podkreślone w zamieszczonych w dysertacji podziękowaniach (w obrębie WUM: Środowiskowe Laboratorium MicrobiotaLab oraz Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej, ponadto Katedra Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska Akademia Nauk w Łodzi). Umiejętność kooperacji jest bardzo cenna i bez wątpienia wpłynęła na ukształtowanie Doktorantki jako młodej badaczki.

Należy też podkreślić, że mgr M. Kołtun-Jasion inwestowała w podnoszenie swoich kompetencji, koniecznych do wykonania zaplanowanych badań, jak wynika z zamieszczonych w dysertacji informacji o wykształceniu i odbytych szkoleniach oraz kursach (m.in. dotyczących zasad hodowli komórek eukariotycznych, metody elektroforezy i cytometrii przepływowej). Szczególnie wartościowe jest, że ukończyła studia podyplomowe z zastosowania statystyki w badaniach biomedycznych, co bez wątpienia przyczyniło się do prawidłowego przedstawienia danych eksperymentalnych,



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

które opracowano korzystając z dobrze dobranych metod statystycznych, a nie zawsze jest to regułą.

Wyniki badań zostały wyczerpująco skomentowane w obszernej Dyskusji, które nawiązuje do treści przedstawionych we wstępie i wątków prowadzących do postawienia hipotez i założeń badawczych pracy. Omawiając efekty badań fitochemicznych i badań aktywności, Doktorantka zwraca uwagę na pewne prawidłowości, uwypukla dane, które wyróżniają poszczególne związki i stanowią element nowości, a swoje obserwacje konfrontuje z wynikami badań innych autorów.

Lektura rozprawy nasunęła mi kilka komentarzy i uwag. W odniesieniu do zamierzeń badawczych, niezależnie od podziwu dla bardzo ambitnych planów Doktorantki, miałam poczucie pewnego nadmiaru. W mojej opinii korzystniejsze byłoby skupienie się wyłącznie na rodzaju *Forsythia*, z racji pokrewieństwa chemofenetycznego gatunków i możliwości oceny, czy któraś z forsycji występujących w Europie cechuje optymalny profil i aktywność, czy też materiał roślinny można traktować jako równocenny i niezależny od źródła botanicznego. Uwzględnienie jako przedmiotu badań także liści jesionu wyniosłego *Fraxinus excelsior* wydaje się nieco sztucznym zabiegiem, zwłaszcza, że mógłby on stanowić odrębną „opowieść”, zarówno w kontekście fitochemicznym, jak i badań aktywności. W konsekwencji brakuje nieco spójności, jeśli chodzi o konstrukcję badań, szczególnie fitochemicznych.

Na przykład, choć jednym z ważnych celów pracy było porównanie profilu fitochemicznego materiału pochodzącego z dwóch terminów zbioru, badania wykonano jedynie dla forsycji zwisłej i pośredniej. Liście forsycji europejskiej zostały zebrane wyłącznie w maju, natomiast w przypadku liści jesionu nie podano w ogóle okresu zbioru. Nasuwa się też pytanie, dlaczego we wstępnych badaniach aktywności przeciwzapalnej wyciągów zrezygnowano z oceny forsycji europejskiej. Przedstawione chromatogramy (ryc. 16, str.102) pokazują, że profil fitochemiczny dla tego gatunku wyróżnia obecność, a patrząc na proporcje pików także znacząca zawartość, dwóch związków, których nie zaobserwowano ani w przypadku forsycji zwisłej ani pośredniej, tj. 19 i 22. Ciekawe byłoby więc porównanie aktywności i być może izolacja właśnie tych związków, zwłaszcza, że nie udało się ich jednoznacznie zidentyfikować na podstawie fragmentacji MS/MS. Oczywiście zdając sobie sprawę z problemów, związanych z pozyskaniem wystarczających ilości substancji roślinnej z tak rzadkiego gatunku jakim jest *F. europaea*.

Poniżej kilka uwag wynikających z obowiązku recenzentki, a dotyczących nie doprecyzowania w tekście dysertacji pewnych kwestii, które są istotne dla oceny uzyskanych wyników badań.

W odniesieniu do analizy profilu fitochemicznego i różnic zależnych od czasu zbioru, brakuje informacji czy liście ww. gatunków były zbierane z kilku czy jednego egzemplarza rośliny na danym stanowisku, czy w kilku terminach majowych i wrześnieowych czy np. w tym samym dniu.



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Zbyt ogólny jest też opis przygotowania wyciągów. W p. 3.2.1 pojawia się informacja o ilości materiału wyjściowego dla *Forsythia suspensa* i *F. x intermedia* (odpowiednio 100 i 300 g), nie ma wzmianki o *F. europaea*. Nigdzie w pracy nie znalazłam informacji odnoszących się do ilościowych kwestii wykonania naparu z liści jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior*), którego użyto do badań biologicznych. Ponieważ w tabeli 23 pojawiają się ilości izolowanych z tego ekstraktu związków, zatem dane te byłyby ciekawe także dla oceny wydajności procesu izolacji z tej substancji roślinnej. Dla żadnego z wykonanych ekstraktów użytych do badań biologicznych nie podano współczynnika DER (*drug extract ratio*), a, jak słusznie zauważa Autorka we wstępie, cyt. „jakość preparatów zawierających substancje roślinne...występujących w polskim obrocie farmaceutycznym jako suplementy diety lub wyroby medyczne pozostaje niestety wątpliwa, przez wzgląd na brak standaryzacji czy informacji o wartości współczynnika DER” (str. 34).

Wreszcie, dwie uwagi dotyczące jednorodnych związków. Jak wspomniałam wyżej Doktorantka wyizolowała ogółem 14 związków, których struktury, jak wynika z przedstawionych informacji „potwierdzono metodą LC-DAD-ESI-MS/MS oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego NMR (widma ^1H , ^{13}C i dwuwymiarowe)”. Wprawdzie wszystkie związki są znane, ale uważam, że powinno się zamieścić w aneksie, tabelaryczne zestawienie kluczowych danych przesunięć NMR, czego w rozprawie zabrakło. W tabeli 23 (str.113), choć podane zostały ilości w mg wyodrębnionych związków, nie ma z kolei informacji o stopniu czystości izolatów, co z punktu widzenia opisywanych w rozprawie badań biologicznych ma znaczenie.

Podobnie, w tabeli 9 (str.66), gdzie zestawiono 24 związki dodatkowe, użyte do badań biologicznych, również nie podano informacji o stopniu czystości. Tymczasem jedynie trzy z nich pozyskano komercyjnie, pozostałe to izolaty. W większości przypadków wymieniono surowiec służący do izolacji, wraz z odniesieniem do właściwej publikacji źródłowej opisującej ten proces, lecz dla 5 związków brak jest nawet referencji do literatury.

W odniesieniu do dyskusji i wyciągniętych wniosków, raczej ogólnych, zabrakło mi podsumowującego wyrażenia opinii, którą z przebadanych substancji roślinnych warto by szczególnie promować jako składnik preparatów wspomagających terapię schorzeń o podłożu zapalnym? Czy w oparciu o uzyskane w pracy wyniki, większy sens miałyby stosowanie izolowanych dominujących związków, tj. werbaskozydu (w przypadku *F. excelsior*) i forystozydu A (*F. suspensa*, *F. x intermedia*), a nie wyciągów? Który z wszystkich przebadanych w ramach niniejszych badań związków miałby szansę na rejestrację jako lek, biorąc pod uwagę aktywność, możliwości izolacyjne, biodostępność, trwałość i metabolizm?

Powyższe uwagi nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Kołtun-Jasion. Na postawie zakresu badań i sposobu ich



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

realizacji można jednoznacznie stwierdzić, że jest ona w pełni przygotowana do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Zawarte w rozprawie treści jednoznacznie świadczą o szerokiej wiedzy teoretycznej mgr Małgorzaty Kołtun-Jasion w dyscyplinie, którą reprezentuje. Uzyskane wyniki badań są nowatorskie, stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i mają istotny wkład w poszukiwania nowych substancji roślinnych i związków pochodzenia naturalnego w terapii schorzeń o podłożu zapalnym. Reasumując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że oceniana rozprawa spełnia tym samym wymóg zawarty w art. 187, pkt.1 Ustawy.

Uwagi dotyczące układu pracy i podziału treści oraz strony edytorskiej.

Rozprawa mgr Małgorzaty Kołtun-Jasion obejmuje 217 stron, wraz z wykazem skrótów, spisem rycin, tabel oraz literatury (300 pozycji). Biorąc pod uwagę wspomniany wyżej, bardzo szeroki zakres przeprowadzonych prac eksperymentalnych, doceniam umiejętność skondensowanego, a jednocześnie szczegółowego przedstawienia przebiegu analiz oraz klarownego omówienia treści teoretycznych. Układ rozprawy można uznać za klasyczny; otwiera ją dwujęzyczne streszczenie (polski i angielski), po którym następują rozdziały właściwe: *Wstęp, Cel badania i hipotezy badawcze, Materiały i metody, Omówienie wyników, Dyskusja, Wnioski*. Na uwagę zasługuje kolejny, osobny rozdział, w którym Autorka krótko przedstawia perspektywy i możliwe kierunki dalszych badań, potwierdzając tym samym umiejętność obiektywnego spojrzenia na wartość uzyskanych przez siebie wyników. Dodatkowo w rozprawie zamieszczono informację dotyczącą wykształcenia i dorobku naukowego Doktorantki.

Pozytywnie oceniam proporcje między zasadniczymi rozdziałami rozprawy, teoretyczne wprowadzenie stanowi ok. 20% natomiast omówienie wyników wraz z dyskusją ok. 55%. Treści zawarte we wstępie w sposób wyczerpujący wprowadzają w tematykę badawczą. Autorka podsumowuje najbardziej istotne dane dotyczące usytuowania botanicznego, rozpowszechnienia, fitochemii i aktywności gatunków będących przedmiotem badań, przedstawia przewlekłe choroby niezakaźne oraz szczegółowo omawia rolę monocytów i makrofagów w przebiegu stanu zapalnego i patogenezie miażdżycy, co ułatwia ocenę wyboru modeli eksperymentalnych.

Rozprawa jest stylistycznie poprawna i dopracowana pod względem edytorskim. Szczególnie zwraca uwagę dbałość o szatę graficzną. Wyniki ujęte w wykresy, tabele, schematy, a także liczne rysunki i fotografie, dopełniające omawiane treści, zdecydowanie wpływają na przyjemność lektury i stanowią bezsprzeczny walor rozprawy. Autorka posługuje się klarownym językiem naukowym, unikając żargonu technicznego, skomplikowane kwestie przedstawia zrozumiale, akcentując to, co istotne. Na podkreślenie zasługuje skrupulatność w opisie wszystkich procedur, co umożliwia odtworzenie eksperymentów. Autorka drobiazgowo wymienia w tabelach wszystkie odczynniki i inne materiały oraz ich źródło, sprzęt laboratoryjny czy aparaturę, z której



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

korzystała. Dyskusja jest rzeczowa, a mając na względzie ogrom wyników eksperymentalnych, ujęcie tego rozdziału w zwięzłą formę nie było łatwe.

Poza uwagami, które wyraziłam już wcześniej, zauważyłam tylko niewielkie błędy wynikające prawdopodobnie z przeoczenia podczas redakcji tego szerokiego opracowania, które wymieniam poniżej:

- i. W części farmakognostyczno-fitochemicznej (rozdział Wstęp oraz Dyskusja) Autorka często zamiennie stosuje słowa „rodzaj” i „gatunek”, co może wprowadzać czytelnika w błąd (np. str. 26, 28, 30, 170, 171).
- ii. Omawiając skład fitochemiczny *Forsythia suspensa* (str.26, akapit poświęcony pochodnym triterpenowym) niektóre nazwy nie odpowiadają związkom wymienionym w odnośniku literaturowym, tj. kwas korsolidowy (powinno być korozolowy ang. *corosolic acid*), eskuletynowy (powinno być eskulentowy, ang. *esculentic acid*), uważam też, że niefortunnie wymieniono w jednym szeregu zarówno związki wolne (polihydroksylowe) jak i zglikozydowane.
- iii. W podrozdziale 3.2, dane zawarte w tabeli 8 są częściowo sprzeczne. W kolumnie opisującej wyciąg z liści forsycji pośredniej jako źródło materiału wymieniono Ogród Botaniczny w Łodzi oraz Arboretum w Rogowie, podczas gdy powyżej, w tej samej tabeli, widnieje informacja, że gatunek ten pochodził ze stanowisk w Legionowie i Chełmie.
- iv. W legendzie ryc. 30-43 nie wyjaśniono skrótów SDG i SECO
- v. Schemat izolacji na ryc. 20 jest niekompletny (vs. podobne schematy na ryc. 18 i 19), tzn. brakuje w nim danych ilościowych. Z kolei na ryc. 18 i 19, ilości wyjściowych substancji roślinnych są inne niż wymienione w opisie przygotowania ekstraktów do izolacji jednorodnych związków w p. 3.2.1.

Pod względem edytorskim niefortunne było wybranie dwóch zbliżonych odcieni niebieskiego dla prezentacji wyników sekoirydoidów i fenyloetanoloidów (ryc. 31-33), gdyż trudno je odróżnić. W mojej opinii bardziej czytelne byłoby też przedstawienie chromatogramów na ryc. 16, kierując się gatunkiem, a nie terminem zbioru.

Wreszcie, końcowa uwaga odnosi się do tytułu rozprawy, który jest bardzo ogólnie sformułowany. Wydaje mi się, że można było uściślić przedmiot badań tj. związki typowe dla rodziny *Oleaceae* lub uszczegółwić grupy strukturalne, oraz podkreślić, że badania potencjału terapeutycznego dotyczą modeli *in vitro*.

Są to jednak minimalne uchybienia, biorąc pod uwagę objętość recenzowanej rozprawy.



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Podsumowanie i wnioski końcowe.

Oceniam bardzo wysoko wartość naukową rozprawy mgr Małgorzaty Kołtun-Jasion. Tematyka badań jest istotna z punktu widzenia nauk farmaceutycznych, a uzyskane wyniki znacząco poszerzają wiedzę fitochemiczną i fitofarmakologiczną dotyczącą wyspecjalizowanych metabolitów roślinnych rodziny *Oleaceae*, szczególnie w kontekście działania przeciwzapalnego.

Doktorantka udowodniła doskonałą orientację w światowych badaniach z tego zakresu i przygotowanie teoretyczne związane z tematyką pracy. W przeprowadzonych badaniach własnych, które są wysoce specjalistyczne, zarówno w obszarze fitochemicznym jak i badań aktywności, wykazała się samodzielnością i opanowaniem wielu zróżnicowanych technik. Uzyskane w ramach pracy doktorskiej wyniki zostały częściowo opublikowane w renomowanych czasopismach z bazy JCR (2 artykuły, sumaryczny IF=10,866, p.MEiN 210), były także prezentowane jako komunikaty zjazdowe (10) na konferencjach międzynarodowych i krajowych.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr Małgorzaty Kołtun-Jasion spełnia warunki określone w artykule 197 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 (z późn, zm.). Zwracam się więc do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Małgorzaty Kołtun-Jasion do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.


Katedra i Zakład
Farmakognozji UJ CM
prof. dr. hab. Irma Podolak
Irma Podolak kierownik