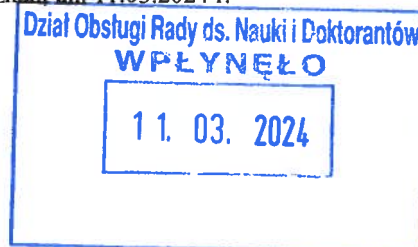




Prof. UAM dr hab. Robert Nawrot
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii, Zakład Wirusologii Molekularnej
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
e-mail: rnawrot@amu.edu.pl
tel. (61) 829-59-31

Poznań, dn. 11.03.2024 r.



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Małgorzaty Kołtun-Jasion

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

dla Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Praca doktorska Pani mgr farm. Małgorzaty Kołtun-Jasion pt. „Poszukiwanie związków pochodzenia naturalnego w terapii schorzeń o podłożu zapalnym” została wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Prof. dr hab. n. farm. Anny K. Kiss. Promotorem pomocniczym była dr n. farm. Agnieszka Filipek.

Pani mgr Kołtun-Jasion w marcu 2024 roku kończy studia doktoranckie na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej, które rozpoczęła w październiku 2018 roku. Wcześniej, w latach 2012-2018 wykonała pracę magisterską pod kierunkiem naukowym Pani dr hab. n. farm. Sylwii Talarek w Katedrze Farmakologii i Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. W latach 2021-2024 Doktorantka ukończyła 3 studia podyplomowe z zakresu prowadzenia i monitorowania badań klinicznych, elementów metodologii badań empirycznych w medycynie i zastosowania statystyki w badaniach biomedycznych oraz zarządzania projektami. Od dwóch lat jest w trakcie specjalizacji I stopnia z zakresu farmacji klinicznej na Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. Dodatkowo w ostatnich latach ukończyła 5 certyfikowanych kursów zarządzania projektami oraz umiejętności wykorzystania wybranych technik badawczych.

Przedstawiona do oceny praca dotyczy kompleksowej analizy składu fitochemicznego wyciągów z liści 4 gatunków roślin z rodziny Oleaceae, a także izolacji jednorodnych związków chemicznych dominujących w ich składzie. Autorka wykonała szczegółową ocenę aktywności biologicznej wyciągów z tych roślin oraz izolowanych z nich związków, co doprowadziło wybrania grupy produktów naturalnych roślin z najwyższym potencjałem przeciwzapalnym, a także wyjaśnienia molekularnych mechanizmów ich aktywności.

Praca dotyczy jednego z najważniejszych zagadnień współczesnej farmakoterapii, a mianowicie wykorzystania związków aktywnych występujących bogato w wielu roślinach rosnących powszechnie i łatwo dostępnych zarówno dla indywidualnego użycia, a także jako surowiec w



farmacji. Wiele roślin jest od wieków wykorzystywanych w tradycyjnym leczeniu ludowym, jednak brak jest wystarczających badań, które poprzez poznanie mechanizmów działania pozwoliłyby na użycie tych surowców w terapii. Dlatego tak ważne jest poznanie składu fitochemicznego już istniejących produktów zielarskich, a także ewentualne przypisanie znanym związkom nowych funkcji, jak i poszukiwanie całkowicie nowych aktywnych substancji i zrozumienie mechanizmów ich działania.

Praca w szczególności dotyczy analizy fitochemicznej LC-MS składu wyciągów przygotowanych z liści 4 gatunków roślin z rodziny Oleaceae, w tym 3 gatunków forsycji, zebranych w 2 różnych porach wegetacji oraz liści jesionu wyniosłego. Przeprowadzona analiza fitochemiczna wykazała wysoką zawartość polifenoli w wyciągach z liści forsycji zwisłej oraz forsycji pośredniej zebranych w maju, a także z jesionu wyniosłego. Z wybranych wyciągów wyizolowano jednorodne związki z grupy lignanów, fenyloetanoidów i sekoirydoidów, które wraz z wyjściowymi wyciągami posłużyły do zbadania ich cytotoksyczności, także wpływu na stopień wydzielania mediatorów prozapalnych (TNF- α , IL-6, IL-1 β , MPC-1) i przeciwzapalnych (IL-10, IL-10R, TGF- β) przy użyciu testów immunoenzymatycznych ELISA i cytometrii przepływowej. Następnie Autorka wybrała 7 najaktywniejszych struktur z grupy 19 lignanów i określiła ich wpływ na komórkowe ścieżki sygnalizacyjne (MAPK, NF- κ B) metodą western blot. Najaktywniejszymi związkami okazały się być arktyna i arktigenina, stanowiące parę glikozyd – aglikon. Dlatego kolejnym etapem było zbadanie wpływu tych 2 związków na modulację przekazywania sygnału za pośrednictwem receptorów TLR w komórkach makrofagów stymulowanych roztworem bakteryjnego lipopolisacharydu z wykorzystaniem metody Real-time PCR. Dodatkowo Doktorantka analizowała wpływ związków z grupy lignanów na proces akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów, za pośrednictwem receptora CD36 oraz transporterów ABCA-1 z towarzyszącą sygnalizacją HO-1/Nrf-2.

Uzyskane wyniki potwierdziły wysoką skuteczność przeciwzapalną preparatów przygotowanych z wybranych gatunków z rodziny Oleaceae: z liści gatunków forsycji (forsycji zwisłej i pośredniej) oraz jesionu wyniosłego. Dzięki temu poszerzyła się nasza wiedza pozwalająca na potencjalne wykorzystanie formułacji przygotowanych z tych roślin w terapii prewencyjnej przewlekłych chorób niezakaźnych (NCDs), stanowiących choroby o znaczeniu cywilizacyjnym.

Rozprawa doktorska Pani mgr farm. Małgorzaty Kołtun-Jasion ma typowy układ, składając się z rozdziałów zatytułowanych: Wstęp, Cel badania i główne hipotezy badawcze, Materiały i metody, Omówienie wyników, Dyskusja, Wnioski, Perspektywy i możliwe kierunki dalszych badań, Wykształcenie oraz dorobek naukowy, Spis rycin i tabel, Wykaz literatury. Przed wstępem Autorka zamieściła wykaz skrótów, streszczenia pracy w języku polskim i angielskim oraz spis treści. Całość dysertacji stanowi bardzo obszerne opracowanie liczące łącznie 238 stron, zawierające 300 pozycji piśmiennictwa, 27 tabel i 70 rycin.

W obszernym, 42-stronicowym **Wstępie** Doktorantka przedstawiła szczegółową charakterystykę roślin z rodziny Oleaceae stanowiących wyjściowy materiał badawczy w pracy z podziałem na rodzaje *Forsythia* Vahl. oraz *Fraxinus* L. Autorka skupia się na 4 gatunkach: forsycji pośredniej (*Forsythia* \times *intermedia*), forsycji zwisłej (*Forsythia suspensa* L.), forsycji europejskiej (*F. europaea*), jesionie wyniosłym (*Fraxinus excelsior*), przedstawiając ich charakterystykę botaniczną, profil fitochemiczny oraz działanie i wykorzystanie w terapii. Niezwykle ważne jest zwrócenie przez



Autorkę uwagi na aktualną szeroką dostępność liści gatunku *Forsythia* w klimacie umiarkowanym. To z kolei może stać się świetnym punktem wyjścia do możliwości wykorzystania preparatów z liści forsycji w ziołolecznictwie oraz jako elementy funkcjonalnych produktów żywnościowych. Następnie Doktorantka szczegółowo opisała przewlekłe choroby niezakaźne (NCDs), a także wyjaśniła rolę monocytów i makrofagów w przebiegu stanu zapalnego i w patogenezie miażdżycy, a także budowę i rolę receptorów TLR. Niezwykle ważne jest zwrócenie uwagi na przewlekły stan zapalny o niewielkim lub umiarkowanym nasileniu, który może być długotrwały, prawie niezauważalny, wywołując ewentualne niewielkie dolegliwości, jednak po długim czasie skutkującym rozwojem poważnych chorób, takich jak np. cukrzyca typu II, osteoporozy, alergii, schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (np. demencji, depresji, stanów lękowych), a nawet chorób nowotworowych. Dlatego tak ważne jest działanie prewencyjne i zdrowy tryb życia. Niezwykle pomocne w przeciwdziałaniu NCDs są różnego rodzaju leki pochodzenia naturalnego, jednak wiele jest tu jeszcze do nadrobienia w prowadzonych badaniach naukowych. Ważne jest zrozumienie szczegółowych mechanizmów działania surowców naturalnych, aby szerzej wykorzystać je w terapii. Doktorantka słusznie podkreśla, iż szczegółowa analiza składu fitochemicznego oraz badania *in vitro* i *in vivo* przyczyniają się do odkrywania nowych związków o skutecznych mechanizmach działania lub znalezienie nowych zastosowań dla znanych już związków.

W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na Rycinę 9 przedstawiającą schemat przekaźnictwa sygnałów za pośrednictwem receptorów TLR oraz szlaków pokrewnych. Jest to bardzo dobra, kompleksowa rycina. Szkoda, że jednak nie ma do niej pogłębionego opisu, a Autorka nie przywołuje niestety w tekście pracy odpowiednich części tej ryciny, co mogłoby pomóc odbiorcy podczas czytania tekstu.

Autorka postawiła **hipotezę badawczą** zakładającą, że rośliny z rodziny Oleaceae pełnią rolę jako źródło związków czynnych wykorzystywanych w pomocniczej terapii przewlekłych chorób o podłożu zapalnym. Aby zweryfikować tę hipotezę postawiła sobie dwa cele badawcze. Pierwszym była kompleksowa analiza składu fitochemicznego wyciągów przygotowanych z liści 4 gatunków roślin z rodziny Oleaceae oraz izolacja jednorodnych związków chemicznych dominujących w ich składzie. Drugim celem pracy była szczegółowa ocena aktywności przeciwzapalnej badanych wyciągów, a także pojedynczych związków. Ocena ta prowadziła do „wytypowania grupy wtórnych metabolitów roślinnych o najwyższym potencjale przeciwzapalnym i wyjaśnienia mechanizmów działania najaktywniejszych struktur.” **Cel pracy** jest zatem złożony i zależny od wielu czynników, ale ciekawy i jasno sformułowany. Do jego realizacji Doktorantka dążyła stawiając sobie 6 celów szczegółowych, które zostały jasno określone, będąc swego rodzaju planem dla realizacji dalszej części pracy.

W kolejnym rozdziale, na 38 stronach, Doktorantka opisuje **Materiały i metody** wykorzystane w pracy. Bardzo dobrze i przejrzysto opisany został materiał roślinny i używane w pracy związki, zebrane w klarowne tabele. Doktorantka korzystała w pracy z szerokiego zestawu technik hodowlanych, modeli komórkowych, metod oceny żywotności, cytotoxycywności komórek, cytometrii przepływowej, metod immunochemicznych, western blot, czy biologii molekularnej, jak Real-Time PCR i mikromacierzy. Do analizy składu fitochemicznego użyto metod ultrasprawnej chromatografii cieczowej, chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej, chromatografii

preparatywnej czy spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Nie mam zastrzeżeń co do stosowanych w pracy metod, są bardzo szczegółowo opisane, nowoczesne i właściwie użyte. Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie do analizy aktywności wyciągów i związków dwóch modeli komórkowych: prawidłowych komórek monocytów/makrofagów PBMC izolowanych z krwi obwodowej oraz makrofagów TDM, wraz z użyciem odpowiednich kontroli. Ocenę stopnia aktywności porównano do działania deksametazonu o udowodnionej skuteczności przeciwzapalnej oraz pitawastatyny o udowodnionej skuteczności hipolipemizującej.

Do tej części pracy mam kilka uwag:

- na stronie 63 w tabelach 5 i 6 widnieje nazwa pochodzenia części odczynników jako zakupionych w firmie „POCh, Gliwice, Polska”, jednak już od co najmniej kilku lat POCh nosi nazwę „Avantor Performance Materials Poland S.A.”,
- Rycina 15 przedstawia schemat rozkładu genów na płycie RT2 Profiler PCR Array TLR – mam pytanie czy wykonanie tylko 1 próby kontrolnej genomowego DNA (GDC) było wystarczające?
- Na str. 95 Autorka podaje informację: „Listę genów, których ekspresję oceniono z użyciem narzędzia RT2 Profiler PCR Array TLR, wraz z informacją na temat białek przez nie kodowanych, podano w poniższej tabeli (tabela 17). W kolumnie pierwszej (Nr) uwzględniono pozycję poszczególnych sond na płycie 96-dółkowej.” Niestety nagłówek tabeli 17 nie zawiera już tej informacji, chociaż powinna się ona tam znaleźć – wszelkie informacje dotyczące tabeli powinny znajdować się w jej nagłówku.
- Tabela 17 – zwraca uwagę bardzo duża liczba wykonanych analiz RT2 Profiler PCR Array TLR.

Doktorantka przedstawiła **Omówienie wyników** zebrane w najobszerniejszym rozdziale pracy, na 68 stronach. Rozdział ten podzielony jest na 17 podrozdziałów, w których w usystematyzowany sposób Autorka przedstawia kolejno analizę fitochemiczną wyciągów *F. suspensa*, *F. × intermedia*, *F. europaea*, *Fraxinus excelsior*, izolację jednorodnych związków z roślin z rodziny Oleaceae oraz ocenę właściwości przeciwzapalnych i wpływu wyciągów i/lub badanych związków na różne ścieżki regulacyjne czy ekspresję wybranych genów. Poszczególne badania prowadzono w bardzo usystematyzowany sposób, wykorzystując do poszczególnych analiz te same zestawy metod, co pozwala na łatwe i miarodajne porównywanie uzyskiwanych wyników. W pierwszej kolejności analizowane były wyciągi przygotowane z liści roślin z rodziny Oleaceae, a następnie analizowano aktywności przeciwzapalne jednorodnych związków w nich dominujących z podziałem na grupy: sekoirydoidów, fenyloetanoloidów, lignanów i ich metabolitów oraz przedstawicieli związków flawonoidowych – rutozydu (rutyny), a także glikozydów fenylopropanoidowych (syringiny). Określenie właściwości przeciwzapalnych wyciągów i związków prowadzono w każdym przypadku w trzech etapach:

- I. Ocena cytotoksyczności związków, wobec komórek monocytów/makrofagów PBMC.
- II. Ocena wpływu związków na uwalnianie cytokin prozapalnych: TNF- α , IL-6, IL-1 β , w modelu komórek monocytów/makrofagów PBMC.
- III. Ocena wpływu badanych związków na ekspresję receptora dla IL-10 na powierzchni



komórek monocytów/makrofagów PBMC.

Następnie Autorka wybrała 7 najaktywniejszych struktur (filirynę i filigeninę, arktynę, arktygeninę i diarktygeninę, pinorezynol i matairezynol) i określiła ich wpływ na komórkowe ścieżki sygnalizacyjne metodą western blot. Do dalszych, szczegółowych analiz wytypowano parę glukozyd – aglikon: arktynę i arktygeninę. Zbadano wpływ tych związków na modulację przebiegu sygnału za pośrednictwem receptorów TLR w komórkach makrofagów stymulowanych roztworem bakteryjnego LPS z wykorzystaniem metody Real-time PCR. Dodatkowo analizowano wpływ wybranych lignanów na proces akumulacji cholesterolu w komórkach makrofagów.

Wyniki analiz przedstawiono w przejrzystych tabelach i wykresach. W pracy zwraca uwagę komplikacja i wielość danych uzyskanych przez Doktorantkę wynikająca ze stopnia skomplikowania wykonanego układu eksperymentalnego, dzięki czemu udało się zrealizować założone cele w pracy. Wyniki są też przejrzyste przedstawione w postaci wykresów z drobiazgową legendą (np. ryc. 26). Czasem jednak podczas lektury daje się odczuć pewien przesyt jeśli chodzi o ilość informacji, które opisane są w tekście pracy bardzo szczegółowo, być może nawet zbyt szczegółowo (np. str. 101-104, może wystarczyłaby sama bardzo dobrze przygotowana tabela 20 i do tego krótki jej opis w tekście?). Podobny trend dał się zauważyć już podczas lektury rozdziału zawierającego metodykę, gdzie opisy poszczególnych metod są bardzo drobiazgowo. Nie jest to oczywiście błąd, jednak takie podejście spowodowało, iż praca ostatecznie ma bardzo dużą objętość.

Do części Wyników pracy mam następujące uwagi i pytania:

- Str. 101-103 – Autorka używa określenia „dominacja związku”, bez wyjaśnienia co dokładnie to określenie oznacza. Można zrozumieć to określenie niejako intuicyjnie, jednak powinno to zostać w pracy jednoznacznie wyjaśnione. Przykład: na str. 103 widnieje informacja "zaobserwowano porównywalną do wyciągu I (na podstawie wysokości pików) dominację..",
- Tabela 20 zawiera zgrubne oszacowanie ilości każdego ze związków obecnych w wyciągach. Czy możliwe było dokładniejsze określenie ich ilości? Na przykład poprzez porównanie powierzchni poszczególnych pików na uzyskanych chromatogramach?
- Ryciny 18-20 przedstawiają schematy frakcjonowania i analizy fitochemicznej wyciągów metanolowo-wodnego z forsycji i jesionu. Przebieg izolacji jest jak najbardziej prawidłowy i zgodny ze sztuką, chciałbym jednak zapytać jak wyglądała czystość poszczególnych frakcji? Czy nie było ryzyka zanieczyszczeń poszczególnych frakcji innymi związkami?
- Czego dotyczą wartości wyrażone w mg w poszczególnych subfrakcjach przedstawione na rycinach 18 i 19? Czy jest to w jakiś sposób powiązane z objętościami poszczególnych frakcji (8 ml)?
- Tabela 23 przedstawia „Jednorodne związki chemiczne wyizolowane z roślin rodziny Oleaceae lub pozyskane w ramach hydrolizy enzymatycznej”. W ostatniej kolumnie tabeli widnieje „ilość wyizolowanego związku”. Chciałbym zapytać, czy były to całkowite ilości poszczególnych związków uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej? Czy w jakiejś jednostce czasu?

- Na rycinie 46 przedstawiono „Porównanie zmian ekspresji genów dla każdej z grup komórek, w ujęciu ilościowym, w odniesieniu do grupy komórek stymulowanych LPS (KST) przedstawiono na poniższych wykresach słupkowych”. Jakie jest znaczenie tego porównania?
- Na str. 111 wzajemnie przedstawione są opisy Tabeli 22 i ryciny 21.
- Str. 152 – Po informacji "Jak zaprezentowano na poniższym wykresie..." brak jest numeru wykresu do którego to zdanie się odnosi.

Przeprowadzona na 35 stronach **Dyskusja** jest dojrzała, wyjaśnia wiele aspektów, które mogły być niejasne po przeczytaniu samych wyników. Na stronach dyskusji Autorka podsumowuje otrzymane wyniki, omawia je, konfrontując je także z danymi literaturowymi, co jest wykonane warsztatowo sprawnie. Autorka przedstawiła i przedyskutowała wiele nowych informacji na temat aktywności lignanów, a także wskazała najaktywniejsze związki z grupy lignanów, którymi okazały się: arktyina, arktygenina, diarktygenina, filiryna, filigenina, glukozyd pinorezynolu, pinorezynol, glukozyd matairezynolu oraz matairezynol. Szkoda jednak, że dyskusja nie została podzielona na podrozdziały, gdyż jest długa i bardzo szczegółowa, a taki podział pomógłby usystematyzować wiele informacji. W dyskusji zaskakuje przedstawienie pewnych wyników po raz pierwszy (np. ryc. 63, tabela 24, str. 174), a nie tylko ich omówienie, które powinny jednak być umieszczone w rozdziale z wynikami.

W tym miejscu mam następujące pytania i uwagi:

- na str. 171 czytamy: „Ocena zawartości poszczególnych grup związków polifenolowych w badanych wyciągach, przygotowana w ramach realizacji pracy dyplomowej w Katedrze Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, przedstawiona na poniższych wykresach kołowych (rycina 62), wskazywała na istotne zróżnicowanie procentowej zawartości związków z grupy lignanów, fenyloetanoloidów, flawonoidów oraz kwasów kawoilochinowych, w zależności od gatunku macierzystego oraz czasu zbioru surowca, co znalazło późniejsze przełożenie na różnice w ich aktywności biologicznej”. Chciałbym zapytać dlaczego to zróżnicowanie było wg Autorki istotne? Wydaje się że działanie tych związków było dość podobne, co jest wsparte w dalszej części tekstu „Każdy z czterech analizowanych wyciągów z liści forsycji, badany w stężeniu 50 µg/ml wykazywał znamienne wpływy hamujące wydzielanie wiodących mediatorów stanu zapalnego tj. TNF-α i IL-6 w modelu monocytów/makrofagów PBMC, stymulowanych roztworem bakteryjnego LPS (rycina 23 A, B)”.
- Rycina 62 opisana jest legendą „Procentowa zawartość wybranych grup polifenoli zidentyfikowanych w ekstraktach metanolowo-wodnych (75% v/v) przygotowanych z liści forsycji pośredniej oraz forsycji zwistej, zebranych we wrześniu (A) oraz w maju (B). Na podstawie: [19].” Szkoda, że przedstawione zestawienie nie zostało odniesione do właściwej ryciny z rozdziału z wynikami. Będę wdzięczny za weryfikację, czy właściwy punkt odniesienia to rycina nr 27A.
- Str. 192 – „...w stymulowanych komórkach makrofagów, co można zaobserwować na załączonej w rozdziale 4.7 mapie ciepła (rycina 49)” – nastąpiła najpewniej pomyłka, właściwą ryciną odniesienia powinna być rycina 48.



- Rycina 70 – rycina stanowi bardzo ciekawe opracowanie własne, jednak brak poszerzonego opisu pod ryciną/powiązane z ryciną, która pomogłaby w osobnym potraktowaniu całości przez czytelnika (zasada samo objaśniania rycin w dysertacjach).

Po dyskusji następuje 1-stronicowe przedstawienie najważniejszych **Wniosków** pracy oraz przedstawienie **Perspektywy i możliwych kierunków dalszych badań** na kolejnej stronie. Autorka wymieniła najważniejsze aspekty i wyniki pracy, przedstawione wnioski są jednoznacznie sformułowane.

W rozdziale **Wykaz literatury** przedstawionych jest 300 przypisów na 21 stronach, przedstawiających bogatą literaturę przedmiotu, w większości z ostatnich kilkunastu lat. Do większości pozycji oprócz pełnej informacji bibliograficznej dołączony jest link z numerem doi, co pozwala szybko znaleźć wybraną publikację z wersji elektronicznej pracy.

Dysertacja doktorska Pani mgr farm. Małgorzata Kołtun-Jasion napisana jest prawidłowo i drobiazgowo, kładąc nacisk na wiele szczegółów. Zawiera piękne ryciny, przejrzyste schematy i tabele. Jest pracą bardzo obszerną, stąd nieuniknione były pewne błędy językowe i interpunkcyjne. Dlatego z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na kilka kwestii.

Kwestie językowe:

1. Doktorantka w całej pracy przyjęła schemat odnoszenia się do konkretnej tabeli czy ryciny poprzez użycie sformułowania np.
 - „przedstawiono w poniższej tabeli (tabela 1)”,
 - str. 22 „W poniższej tabeli (tabela 2)”,
 - str. 31 „na poniższej rycinie (rycina 3).”,
 - str. 95 „Schematyczny przebieg analizy przedstawiono na rycinie 14 (rycina 14). Rozkład genów na płycie zilustrowano na poniższej rycinie (rycina 15).”Wydaje się, że lepiej byłoby napisać "przedstawiono w Tabeli 1", „przedstawiono na Rycinie 14”, nie powielając w nawiasie ponownie tej samej informacji oraz unikać słów „w poniższej/na poniższej”, gdyż może to być w różnych przypadkach mylące.
2. Doktorantka używała w wielu miejscach pracy słowa „cząstki” wymiennie ze słowem „cząsteczki”, np.
 - str. 42 „działających z rozpuszczalnymi cząstkami mostkującymi tj. MFGE8, białko S, C1Q”,
 - str. 47 „zmodyfikowane cząstki cholesterolu LDL”,
 - str. 52 „Obecność niektórych cząstek PAMP”,
 - str. 90 „Powstały kompleks jest efektem chelatowania dwóch cząstek BCA z jedną cząstką Cu..”.

Nie jest to jednoznacznie błędne, jednak słowo „cząstka” w wirusologii zarezerwowane jest do cząstek wirusowych, czyli wirionów, co powinno być zdaniem recenzenta odróżnione od słowa „cząsteczka” oznaczającego cząsteczkę właśnie związku chemicznego, substancji białka



itp. Zatem w każdym powyższym przykładzie rekomendowałbym użycie słowa „cząsteczka”, zamiast „cząstka”.

3. Jako „kalka” językowa z języka angielskiego lub pewien skrót myślowy od długiego już czasu w języku laboratoryjnym funkcjonuje błędne wyrażenie „ekspresja białek”, w którym oczywiście chodzi o „ekspresję genów kodujących białka” i w ten sposób powinno być używane, ewentualnie można mówić o „syntezie białek” lub „produkcji białek”. Niestety Doktorantka w pracy nie ustrzegła się w kilku miejscach tego błędu, np.
 - str. 42 „Dodatkowo, wysoka ekspresja białek głównego układu zgodności tkankowej...”,
 - str. 44 „w związku z powyższym, wstępne doniesienia korelujące aktywność surowców naturalnych ze wzrostem ekspresji białka HO-1”,
 - str. 89 „c) materiał do oceny wpływu związków na ekspresję białek ABCA1, HO-1, Nrf2”.

Doktorantka nie ustrzegła się niestety w pracy innych drobnych błędów – stylistycznych, literowych czy interpunkcyjnych. Wymienię niektóre z nich jako przykład, aby zwrócić uwagę na możliwe uniknięcie tego typu błędów w przyszłości:

- Str. 19 - „których zróżnicowana zawartość przedkłada się na..”, powinno być: „których zróżnicowana zawartość przekłada się na..”,
- Str. 44 - "Niektóre z doniesień spekulują także na temat..." – określenie potoczne,
- Str. 52 – „mitochondrialne DNA” – powinno być „mitochondrialny DNA”,
- Str. 52, Tabela 4 – „jednoniciowe RNA” – powinno być „jednoniciowy RNA”,
- Str. 93 „Zabezpieczone cDNA”, powinno być: „Zabezpieczony cDNA”,
- Str. 169 „coraz bardziej powszechne przenikanie się lecznictwa dalekiego wschodu do medycyny europejskiej”, powinno być „coraz bardziej powszechne przenikanie lecznictwa dalekiego wschodu do medycyny europejskiej”,
- Str. 184 „Przykładowe produkty spożywcze zawierające określone grupy związki z grupy lignanów” – powinno być: „... określone związki z grupy lignanów”,
- Str. 184 „...wraz ze wskazaniem ich zamiennego źródła w odpowiednim materiale roślinnym” - powinno być: „...materiale roślinnym”,
- Str. 203 „...w kontekście ich wykorzystania ich w terapii.” – powinno być „...w kontekście wykorzystania ich w terapii.”,
- Str. 12 „Z uwagi na obiecujące wyniki badań...”, powinno być: „Z uwagi na obiecujące wyniki badań...”,
- Str. 83 „3.6.5. Ocena stopnia wydzielanie mediatorów zapalnych metodą ELISA”, powinno być: „...wydzielania mediatorów zapalnych.”,
- Str. 126 „obniżając poziom sekresji tej cytokiny” - powinno być „sekrecji”,
- Str. 161 „W nawiązaniu wyników zaprezentowanych w poprzednich rozdziałach...” powinno być: „W nawiązaniu do wyników zaprezentowanych w poprzednich rozdziałach...”,
- Str. 169 „Jak wzmiankowano we wstępie do niniejszej pracy...”, powinno być „niniejszej”,



- Str. 45 „niektórych komórek niekrwiotwórczych np.” - przed „np.” powinien być przecinek,
- Str. 47 „których powikłania zakrzepowe tj. udar niedokrwienny” – przed „tj.” powinien być przecinek,
- Str. 52 „Co więcej wśród uczestników o wysokim ryzyku...”, po „co więcej” powinien być przecinek,
- Str. 91 „Procentowość żelu rozdzielającego była dobrana wg. masy..”, po „wg” nie powinno być kropki.

Przedstawione powyżej krytyczne uwagi i spostrzeżenia nie wpływają na końcową wysoką ocenę pracy, która ze względu dużą wartość naukową przedstawionych wyników i możliwość ich praktycznego wykorzystania zasługuje na wyróżnienie. Przedstawiona praca doktorska świadczy o tym, że Pani mgr farm. Małgorzata Kołtun-Jasion niezwykle sprawnie porusza się w wykorzystaniu szerokiej gamy technik hodowlanych, analitycznych, biologii molekularnej, proteomicznych, a także posiada ogromną wiedzę i umiejętność samodzielnego planowania i krytycznej analizy wyników badań, co jest świetnym prognostykiem dla dalszej pracy naukowej.

Na stronach 208-211 rozprawy Doktorantka przedstawiła swój dorobek naukowy, który jest bogaty. Znajdują się w nim 2 prace obejmujące tematykę będącą przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej, w których jest pierwszą oraz drugą autorką, opublikowane w międzynarodowych czasopismach punktowanych za 140 i 70 pkt. MNiSW. Poza tym legitymuje się Ona 3 innymi publikacjami w międzynarodowym czasopiśmie punktowanym (100 pkt. MNiSW) oraz w czasopismach o zasięgu krajowym (5 pkt. MNiSW). Kolejna praca jest w trakcie przygotowań do publikacji. Dodatkowo jest autorką 13 doniesień konferencyjnych na konferencjach krajowych i zagranicznych w formie posteru lub też prezentacji ustnej. Na uznanie zasługuje również fakt kierowania przez Nią projektem badawczym oraz wykonawstwo w dwóch innych (najprawdopodobniej były to projekty wydziałowe). Praca Pani mgr farm. Kołtun-Jasion została wyróżniona przyznaniem kilku nagród, w tym wyróżnieniami dla Autorów najlepszych posterów i wystąpień ustnych, dwoma grantami podróznymi na międzynarodowe konferencje naukowe oraz stypendium projakościowym dla najlepszych doktorantów w roku akademickim 2021/2022. Doktorantka spełniała się także w pracy dydaktycznej, prowadząc zajęcia dla III i IV roku farmacji, pełniła rolę opiekuna 4 prac magisterskich oraz pracowała z członkami Koła Naukowego „Herbarium” przy Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej, inspirując studentów do pracy badawczej.

Zakres i skala przeprowadzonych w pracy analiz wykracza poza typową pracę doktorską. Chciałbym w tym miejscu pogratulować Doktorantce za podjęcie się tak interesującego tematu i za konsekwencję w jego realizacji. Zrealizowany został wieloaspektowy projekt, który przyczynił się do rozwoju naszej wiedzy na temat składu fitochemicznego i aktywności biologicznej wyciągów i związków z wybranych gatunków roślin z rodziny Oleaceae.



Podsumowując, głównym osiągnięciem Pani mgr farm. Małgorzaty Kołtun-Jasion przedstawionym w recenzowanej pracy doktorskiej jest udowodnienie istotnego potencjału przeciwzapalnego liści forsycji, surowca szeroko rozpowszechnionego w Polsce i skorelowanie tego potencjału z czasem jego zbioru, a także potwierdzenie aktywności przeciwzapalnej liści jesionu wyniosłego, stosowanego tradycyjnie w medycynie, ale bez do tej pory wystarczających badań w tym zakresie. Równie ważne wyniki dotyczą istotnego znaczenia wybranych lignanów na akumulację cholesterolu w modelu komórek makrofagów w celu ich wykorzystania jako elementów żywności funkcjonalnej i suplementów diety. Wszystkie te wyniki mają ogromne znaczenie w kontekście potencjalnego wykorzystania lignanów jako elementów terapii prewencyjnej stanów zapalnych o niskim stopniu nasilenia, będących przyczyną wielu przewlekłych chorób niezakaźnych, jak np. schorzeń układu sercowo-naczyniowego, oddechowego, kostno-stawowego, chorób nowotworowych, miażdżycy, cukrzycy czy nawet otyłości.

Oświadczam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr farm. Małgorzaty Kołtun-Jasion spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie Pani mgr farm. Małgorzaty Kołtun-Jasion do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na dużą wartość poznawczą przedstawionych wyników, kompleksowość i złożoność przeprowadzonych analiz i możliwość ich praktycznego wykorzystania uważam, iż praca Pani mgr farm. Małgorzaty Kołtun-Jasion zasługuje na wyróżnienie.

Robert Nawrot

Poznań, 11.03.2024 r.