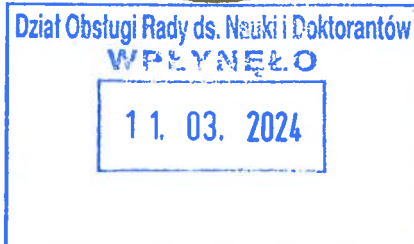




Zakład Farmakognozji  
z Ogrodem Roślin Leczniczych  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie  
ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin  
Tel. (+48 81) 448 70 80  
Faks: (+48 81) 448 70 80

Pharmacognosy  
Lublin



Prof. dr hab. n. farm. Wirginia Kukuła-Koch  
Zakład Farmakognozji  
z Ogrodem Roślin Leczniczych  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Lublin, 2022-03-08

**Ocena pracy doktorskiej  
na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu,  
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne  
wykonanej przez Panią magister Małgorzatę Kołtun-Jasion  
pt. „Poszukiwanie związków pochodzenia naturalnego w terapii schorzeń o podłożu  
zapalnym”  
pod opieką: promotora: Pani prof. dr hab. Anny K. Kiss  
oraz promotora pomocniczego: Pani dr n. farm. Agnieszka Filipek  
w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

Interdyscyplinarna rozprawa doktorska zestawia wyniki badań naukowych prowadzonych przez Panią magister farmacji Małgorzatę Kołtun-Jasion w latach 2018-2024 podczas studiów doktoranckich wykonywanych w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (dawniej Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii). Część z nich Doktorantka opublikowała w dwóch pracach naukowych o wysokiej wartości współczynnika IF:

1. Kołtun-Jasion M., Sawulska P., Patyra A., Woźniak M., Dudek MK., Filipek A., Kiss AK.; Bio-guided isolation of compounds from *Fraxinus excelsior* L. leaves with anti-inflammatory activity; International Journal of Molecular Sciences; 2023, 24(4), 3750; <https://doi.org/10.3390/ijms24043750>. IF = 6,208; Punkty MNiSW = 140

2. Patyra A., **Koltun-Jasion M.**, Jakubiak O., Kiss AK.; Extraction Techniques and Analytical Methods for Isolation and Characterization of Lignans; *Plants*, 11(17), 2023; <https://doi.org/10.3390/plants11172323>; **IF = 4.658; Punkty MNiSW = 70,**

a na zakończenie procesu publikacji czeka kolejna praca:

**Koltun-Jasion M.**, Patyra A, Dudek MK, Filipek A, Oiry C, Kiss AK.; Dietary lignans effect on inflammation underlying metabolic disorders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 202#, #(#), #. IF=6.1; MEiN=140.

Wyniki prowadzonych przez Panią magister badań naukowych prezentowane były także podczas dziesięciu zjazdów naukowych w postaci posterów i wystąpienia ustnego.

Doktorantka przedstawia do oceny solidnie przygotowaną rozprawę doktorską podzieloną na czytelne rozdziały. Rozprawę otwiera wykaz skrótów i streszczenia w języku polskim i angielskim, po których następują:

- część teoretyczna obejmującą wstęp, charakterystykę roślin z rodziny Oleaceae, z rodzaju *Forsythia* i *Fraxinus*, patogenezę chorób niezakaźnych o podłożu zapalnym, opis roli komórek monocytów i makrofagów w przebiegu procesu zapalnego i znaczenie receptorów TLR w procesie zapalnym,
- cele badań i hipotezy badawcze;
- materiały i metody wykorzystane podczas realizacji pracy doktorskiej, dotyczące badań chromatograficznych i oceny właściwości biologicznej ekstraktów, frakcji i izolatów, przedstawiające w sposób poprawny i bardzo skrupulatny zarówno materiał badawczy, jak i zastosowane procedury,
- dokładnie przygotowane omówienie wyników z licznymi figurami i tabelami
- dojrzała dyskusja otrzymanych rezultatów pokazująca najważniejsze osiągnięcia wypracowane w niniejszej pracy i ich zestawienie z dostępną już literaturą naukową
- wnioski, perspektywy przyszłych badań,

a także spis rycin i tabel, wykaz literatury i informacje nt wykształcenia i aktywności naukowej i dydaktycznej Doktorantki w formie dodatkowego rozdziału.

Oceniana rozprawa doktorska obejmuje 237 stron maszynopisu. Opracowanie mimo dużej objętości przygotowane jest bardzo czytelnie, schludnie i z należytą starannością. Posiada liczne figury i tabele, które ułatwiają zrozumienie podjętej ścieżki badawczej. Część teoretyczna pracy obejmuje ok. 40 stron. Na szczególne podkreślenie zasługuje opisana na kartach rozprawy charakterystyka roślin z rodzaju *Forsythia*. Zebrane informacje dotyczące

kompozycji i działania biologicznego wyciągów otrzymywanych z roślin należących do tego rodzaju mogą stać się tematem pracy przeglądowej. Część teoretyczna uwzględnia także ciekawe wprowadzenie do patogenezy chorób przebiegających z wytworzeniem stanu zapalnego oparte na najnowszej literaturze naukowej i uwzględniające charakterystykę i rolę komórek o kluczowym znaczeniu dla tego procesu. W moim odczuciu korzystna byłaby zmiana kolejności rozdziałów i przeniesienie celu i głównych hipotez pracy przed wstęp, aby - czytając część teoretyczną pracy - znać już założenia rozprawy doktorskiej. Piśmiennictwo obejmuje 300 pozycji literaturowych. Zbiór ten stanowi bardzo wartościowe zestawienie. Na liście tej znajdują się najnowsze i głównie anglojęzyczne prace opublikowane w czasopismach o międzynarodowym zasięgu. W treści pracy doktorskiej nie odnalazłam podsumowania wkładu Doktorantki w przeprowadzone badania, niemniej informacje o publikacjach i streszczeniach zjazdowych powstających na bazie niniejszej rozprawy pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że rola ta była wiodąca i że Pani magister w trakcie studiów doktoranckich nabrała samodzielności w prowadzeniu badań naukowych, posiada stosowną wiedzę w dziedzinie i umiejętność planowania doświadczeń badawczych, a także, że w Swojej pracy Doktorantka potrafi wykorzystać nowoczesną i specjalistyczną aparaturę badawczą oraz interpretować otrzymywane wyniki.

Swoimi zainteresowaniami badawczymi Pani mgr Małgorzata Kołtun-Jasion objęła gatunki roślin z rodziny Oleaceae – niewystarczająco przebadane dotąd gatunki forsycji i jesionu, dla których potwierdziła silne właściwości przeciwzapalne i hamujące procesy akumulacji cholesterolu. Zaprezentowane na kartach rozprawy wyniki badań naukowych obejmują szerokie działania związane zarówno z przygotowaniem wyciągów roślinnych, określeniem ich kompozycji przy pomocy technik chromatograficznych sprzężonych z detekcją UV oraz MS, izolację pojedynczych związków z bogatej matrycy przy pomocy technik podziału typu ciec-ciecz, metod chromatografii kolumnowej ze stałym adsorbentem i wysokosprawnej chromatografii preparatywnej, identyfikację izolowanych metabolitów przy pomocy techniki NMR, a także bardzo szeroko zakrojone studium właściwości biologicznych wyciągów, frakcji i izolatów prowadzonych w kierunku określenia potencjału przeciwzapalnego i cytotoksycznego w modelach m.in. komórek monocytów/makrofagów PBMS, makrofagów linii THP-1, z uwzględnieniem badania wpływu na regulację ścieżek sygnałowych MAPK i modulacji przekazywania sygnału za pośrednictwem receptorów TLR. Otrzymane wyniki badań posiadają wydźwięk praktyczny. Doktorantka pokazuje bogatą kompozycję badanych gatunków roślin, wskazuje optymalny czas zbioru substancji roślinnej

gwarantujący wysoki poziom cennych z farmakologicznego punktu widzenia metabolitów, opracowuje metodykę izolacji pojedynczych molekuł, które trudno jest pozyskać z komercyjnych źródeł, z całkowitych wyciągów (do badań wyizolowano m.in. aż 10 g forsytyzydu A i 0.5 g filiryiny), aby udowodnić im cenne właściwości biologiczne i przez to zwrócić uwagę na badane gatunki w kontekście ich dalszego stosowania w terapii chorób o podłożu zapalnym i do redukcji akumulacji złogów żylnych cholesterolu. Za najcenniejszy materiał uznano liście forsycji zwistej i forsycji pośredniej. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż Doktorantka prowadziła prace badawcze na wielu grupach metabolitów wtórnych syntetyzowanych przez wybrane gatunki roślin. Wyniki badań uzupełniają dotychczasową wiedzę o dane nt lignanów, flawonoidów, sekoirydoidów, fenyloetanoloidów i kwasów fenolowych z tak dużej grupy roślin, które Pani magister objęła swoimi badaniami. Każda rodzina związków posiada inny charakter chemiczny i wymaga innych procedur izolacji, które Pani magister musiała zgłębić w trakcie prowadzonych badań.

Pragnę podkreślić, iż mnogość prowadzonych przez Doktorantkę badań na bardzo wysokim poziomie zasługuje na wyróżnienie. W trakcie przygotowywania doktoratu Pani magister musiała podejmować liczne trudne i pionierskie decyzje, dzięki czemu oceniana rozprawa prezentuje bardzo szeroką wiedzę teoretyczną oraz praktyczną Doktorantki. W moim odczuciu zestawione w pracy doktorskiej rezultaty mogłyby stanowić dwie oddzielne prace doktorskie.

Dla mnie osobiście najbardziej ciekawe są osiągnięcia dotyczące izolacji pojedynczych związków z tak bogatych kompozycyjnie matryc. Doktorantka musiała sama wypracować unikalne warunki chemiczne, które umożliwiły rozfrakcjonowanie wyciągów. Ogrom przeprowadzonych prac obrazują figury 18-20, a rezultatem są duże ilości pojedynczych substancji, dla których nie określono dotychczas pełnego profilu działania biologicznego ani mechanizmów działania. Dzięki mrowczej pracy Pani magister luki w badaniach izolowanych związków mogły zostać wypełnione – szczególnie w kontekście działania przeciwwzapalnego.

Pośród wielu uzyskanych informacji, przeprowadzona izolacja pozwoliła też na uzupełnienie wiedzy z zakresu właściwości biologicznych lignanów. To bardzo cenne dane badawcze, które otrzymano, pracując zarówno na samych związkach, jak i na ich metabolitach. Przy dużym zróżnicowaniu strukturalnym przedstawicieli tej grupy, w literaturze naukowej wciąż brakuje informacji na temat ich profilu farmakologicznego i molekularnych mechanizmów działania.

Nie sposób odnieść się do wszystkich wyników opisanych w rozprawie przez Doktorantkę. Poniżej chciałam wyróżnić kilka osiągnięć wynikających z rozprawy:

- Określenie optymalnego czasu zbioru materiału roślinnego dzięki dogłębnej analizie fingerprint głównych metabolitów przy pomocy HPLC-MS
- Identyfikacja składowych wyciągów z jesionu odpowiedzialnych za działanie przeciwzapalne naparów/ekstraktów z tej rośliny (określenie potencjału biologicznego oleoakteozydu)
- W przypadku lignanów (aktygenina, arktyina, trachylogenina) – określenie molekularnych mechanizmów działania przeciwzapalnego; wśród nich: potwierdzenie zależności pomiędzy aktywnością przeciwzapalną a procesami akumulacji cholesterolu (hamowanie ekspresji receptora CD36 i aktywacja transportera ABCA-1), określenie hamującego wpływu na aktywność MAPK i NF- $\kappa$ B, modulacji ekspresji ścieżek sygnałowych aktywowanych za pośrednictwem receptorów TLR i przedstawienie wyników dotyczących wpływu na konkretne mediatory stanu zapalnego oraz genów odpowiedzialnych za ich syntezę.

Podsumowując, chciałam podkreślić, że zaprezentowane na kartach rozprawy wyniki w znaczący sposób poszerzają obecną wiedzę z zakresu kompozycji i zastosowania przedstawicieli rodziny oliwkowatych w chorobach o podłożu zapalnym. Autorka bardzo dojrzałe interpretuje zaobserwowane wielopłaszczyznowe mechanizmy działania, zestawia je w pracy z danymi dotyczącymi biodostępności związków w organizmie człowieka i analizuje możliwe sposoby wykorzystania Swoich wyników w praktyce, rozważając wprowadzenie badanych surowców jako alternatyw dla tradycyjnej farmakoterapii lub racjonalnej suplementacji.

Z obowiązku recenzenta pragnę wnieść kilka uwag do pracy. Na wstępie chciałam jednak podkreślić, że wymienione poniżej drobne uchybienia nie zmieniają bardzo wysokiej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej:

1) proszę o stosowanie w przyszłych pracach polskojęzycznych terminu ‘rozdzielanie chromatograficzne’ zamiast ‘rozdział chromatograficzny’

2) na kartach rozprawy nie odnajduję informacji na temat typu spektrometru mas zastosowanego do oznaczeń; tabele w pracy posiadają wartości  $m/z$  bardzo małej dokładności, a do pracy nie dołączono żadnego chromatogramu, widma masowego ani NMR; zarówno wartości przedstawione dla jonów molekularnych, jak i fragmentów zarejestrowanych na widmach MS/MS to wartości bardzo niedokładne, bez cyfr mniejszych od jedności; proszę serdecznie o komentarz odnośnie typu stosowanego analizatora i podstawy do identyfikacji poszczególnych metabolitów na podstawie tak niedokładnego pomiaru masy.

3) w rozdziale 3.3.1. opisano, iż do analiz wykorzystywana jest kolumna o średnicy ziarna 1,9  $\mu\text{m}$ , a w procesie przygotowania próbek do analiz stosowane są sączki strzykawkowe o średnicy porów 0,45  $\mu\text{m}$ ; czy tak duże pory sączka nie przyczyniały się do przytykania kolumny chromatograficznej? Serdecznie proszę o komentarz.

4) czy przeprowadzono wstępną optymalizację parametrów pracy spektrometru mas? Przedstawiona na kartach rozprawy wysoka temperatura gazu nośnego i duże napięcie kapilarne mogły prowadzić do rozkładu metabolitów o prostszej budowie – jeszcze w źródle.

W tym miejscu chciałam spytać o dalsze plany naukowe Pani magister. Czy zastanawiała się Pani nad opracowaniem protokołu do przemysłowego pozyskiwania najbardziej aktywnych metabolitów? Czy zasięg występowania forsycji i dostępny tonaż liści zaspokoiliby potrzeby rynku? Jak widzi Pani perspektywy włączenia badanych przez Panią gatunków do preparatów roślinnych?

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr Małgorzaty Kołtun-Jasion oceniam od strony merytorycznej bardzo wysoko. Treść rozprawy świadczy o bardzo dobrym warsztacie przekazanym Doktorantowi przez Promotorów, o przygotowaniu teoretycznym i manualnym Doktoranta, umiejętności organizowania pracy badawczej oraz planowania i rozwiązywania problemów naukowych. **Podkreślając, że badania prezentują wysoki poziom naukowy, dostarczają nowych istotnych danych wpływających na rozwój dyscypliny, mają charakter nowatorski i wykazują potencjał do praktycznego wykorzystania, wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego prośbę o dalsze procedowanie zmierzające do nadania mgr Małgorzacie Kołtun-Jasion stopnia naukowego **doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.**

Prof. dr hab. n. farm. Wirginia Kukuła-Koch,

*Wirginia Kukuła-Koch*

Wirginia  
Anna  
Kukuła-Koch

Elektronicznie  
podpisany przez  
Wirginia Anna Kukuła-  
Koch  
Data: 2024.03.11  
18:37:20 +01'00'