



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. Irma Podolak

Katedra i Zakład Farmakognozji

Kraków, 02. 01. 2023

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pani mgr Natalii Kłeczek

pt.

„Analiza fitochemiczna wybranych roślin z plemienia Inuleae – izolacja wtórnych metabolitów o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwzapalnym i cytotoksycznym oraz wstępna ocena ich aktywności”

zrealizowanej w Zakładzie Fitochemii Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej
Akademii Nauk w Krakowie

pod opieką naukową Promotora, dr hab. Anny Stojakowskiej

Uwagi dotyczące problematyki badawczej

Oceniana rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Kłeczek, złożona w toku postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauk medycznych, jest poświęcona istotnemu obszarowi badań, jakim jest poszukiwanie nowych substancji leczniczych w oparciu o przesłanki etnomedyczne. Historia medycyny i farmacji jest nierozdzielnie związana z lekami pochodzenia naturalnego, a współcześnie związki izolowane z roślin czy organizmów morskich mają znaczący udział w ogólnej puli zarejestrowanych środków terapeutycznych. Jest to szczególnie zauważalne w grupie leków przeciwnowotworowych, wśród których, wg. różnych szacunków literaturowych, ok. 60% to cząsteczki oryginalne lub półsyntetyczne modyfikacje naturalnych struktur. Klasycznymi przykładami są winkrystyna i winblastyna z *Catharantus roseus*, paklitaksel z *Taxus*

Katedra i Zakład Farmakognozji

30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 55 60, fax +48 12 620 55 75

e-mail: farmakog@cm-uj.krakow.pl, www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

brevifolia, czy półsyntetyczna pochodna kamptotecyny – irinotekan. Odzwierciedleniem nieustających poszukiwań nowych leków o naturalnym rodowodzie jest rejestracja w ostatniej dekadzie kilku kolejnych chemioterapeutyków, m.in., przeciwbiałaczkowej omacetaksyny w 2013 roku.

Sukces w tym obszarze badań jest ściśle związany z postępem metod analitycznych, zwłaszcza technik separacyjnych i spektralnych, jednak kluczową rolę odgrywa selekcja gatunku. Jednymi z najważniejszych strategii, które przynoszą spodziewany efekt, są selekcja oparta o przesłanki etnofarmakologiczne oraz selekcja botaniczna lub/i chemofenetyczna.

Takie właśnie podejście, zgodne ze światowymi standardami, przyjęła Pani mgr Natalia Kłeczek w swoich badaniach nad poszukiwaniem nowych, bioaktywnych związków o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwzapalnym i cytotoksycznym.

Wybór rodziny Asteraceae nie budzi żadnych wątpliwości. Jest to botanicznie ogromnie bogaty i szeroko rozpowszechniony takson, którego przedstawiciele mają znaczenie w fitoterapii, nie tylko europejskiej, ale też innych rejonów świata. Dodatkową, korzystną cechą rodziny Asteraceae jest wyraźna chemofenetyczna zależność, wyrażająca się specyficznym profilem fitochemicznym, m.in. obecnością laktonów seskwiterpenowych. Ta grupa naturalnych terpenoidów znajduje się w centrum zainteresowań fitofarmakologii ze względu na wysoką reaktywność. Liczne doniesienia literaturowe wskazują także na przeciwzapalny, cytotoksyczny, czy przeciwdrobnoustrojowy potencjał laktonów seskwiterpenowych, a jednym z najważniejszych leków o takiej strukturze jest obecna w *Artemisia annua* artemizynina, stosowana od 2006 r. jako środek przeciwmalaryczny.

Biorąc pod uwagę mnogość gatunków w obrębie rodziny Asteraceae, bardzo rozsądną decyzją Doktorantki było ograniczenie badań do jednego z plemion, gromadzącego uznane rośliny lecznicze, plemienia Inuleae. Racjonalnym wyborem, świadczącym o umiejętności krytycznej analizy danych literaturowych, była selekcja gatunków do dalszych, dogłębnych analiz fitochemicznych i farmakologicznych, tj. *Xerolekia speciosissima* (L.) Anderb. oraz *Carpesium divaricatum* Sieb. & Zucc.

Pierwszy z nich to endemit, o nieznanym do tej pory składzie fitochemicznym i aktywności, stąd wszelkie uzyskane w ramach badań wyniki mają walor poznawczy,



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

zwłaszcza w kontekście chemofenetyki. Przesłanką do selekcji tego właśnie, rzadkiego gatunku, z myślą o badaniach potencjału farmakologicznego, było jego bliskie pokrewieństwo taksonomiczne z leczniczymi roślinami rodzajów *Inula*, *Telekia* czy *Carpesium*. Drugi gatunek, będący przedmiotem badań, *Carpesium divaricatum*, to z kolei uznany lek Tradycyjnej Medycyny Chińskiej (TCM). Podstawowym zamierzeniem Doktorantki była w tym przypadku ocena podobieństw składu fitochemicznego surowca, uprawianego w warunkach krajowych, wobec surowca pochodzenia azjatyckiego. Należy podkreślić, że badania w tym zakresie mają ogromne znaczenie nie tylko dla oceny biokompatybilności wyciągów z roślin pozyskiwanych z różnych lokalizacji geoklimatycznych, lecz również oszacowania możliwości uprawy równocennego surowca leczniczego.

Reasumując, problematyka rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Kłeczek świetnie wpisuje się we współczesne trendy badań z zakresu fitochemii, chemofenetyki, fitofarmakologii i etnomedycyny. Chciałabym też wyrazić uznanie dla przemyślanego wyboru kierunku i przedmiotu podjętych badań własnych, świadczącego o znakomitej orientacji Doktorantki w obszarze aktualnego stanu wiedzy i potencjału leczniczego roślin z plemienia Inuleae.

Uwagi dotyczące strony formalnej

Recenzowana rozprawa doktorska ma kształt klasycznego opracowania o charakterze monografii. Przedstawione w niej wyniki badań, zgodnie z zamieszczoną informacją, zostały opublikowane w czterech pracach (w punktowanych czasopismach z listy MEiN, jak *Phytochemistry Letters* i *Molecules*), w których Pani mgr Natalia Kłeczek jest pierwszym autorem. Niniejsza recenzja odnosi się jednak wyłącznie do przedstawionej dysertacji.

Realizacja bardzo szeroko zaplanowanych prac była możliwa dzięki ogromnemu doświadczeniu w izolacji i analizach struktury metabolitów roślinnych i fitochemicznemu zapleczu badawczemu Zakładu Fitochemii Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, kierowanego przez Panią dr hab. Annę Stojakowską. Należy też zaznaczyć, że przedstawione w ocenianej rozprawie badania mają charakter multidyscyplinarny i wymagały współpracy Doktorantki z innymi ośrodkami badawczymi, w tym z kilkoma jednostkami Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, co zostało podkreślone w zamieszczonych w dysertacji podziękowaniach.



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Uwagi dotyczące strony merytorycznej oraz metodologii.

Główny trzon badań Pani mgr Natalii Kłeczek stanowią prace fitochemiczne, ukierunkowane na izolację i określenie struktury potencjalnie aktywnych metabolitów roślinnych, występujących w dwóch gatunkach plemienia Inuleae, tj. *Xerolekia speciosissima* (L.) Anderb. oraz *Carpesium divaricatum* Sieb. & Zucc. Ich dopełnieniem są analizy aktywności biologicznej wybranych izolatów, przeprowadzone w modelach *in vitro* działania przeciwbakteryjnego, przeciwzapalnego oraz cytotoksycznego wobec komórek nowotworowych i prawidłowych. Wytypowane kierunki badań aktywności są zgodne zarówno z tradycyjnym zastosowaniem (TCM) jak i danymi literaturowymi dotyczącymi działań metabolitów typowych dla plemienia Inuleae.

W poprzedzających opis samych eksperymentów rozdziałach rozprawy, Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy, odnoszący się do klasyfikacji botanicznej, chemizmu, zastosowań etnomedycznych i opublikowanych doniesień o kierunkach badań aktywności farmakologicznej, potwierdzając doskonałe przygotowanie teoretyczne do prowadzenia badań z tej tematyki.

W odniesieniu do samej części fitochemicznej Autorka wytyczyła sobie bardzo ambitne cele. W przypadku niezbadanego dotąd endemicznego gatunku *Xerolekia speciosissima*, identyfikację metabolitów zarówno z grupy terpenoidów jak i fenoli, w częściach nadziemnych i podziemnych rośliny oraz izolację potencjalnie aktywnych związków. Dodatkowym zamierzeniem było potwierdzenie usytuowania taksonomicznego tego rzadkiego endemitu poprzez porównanie profilu fitochemicznego blisko spokrewnionych filogenetycznie gatunków, tj. *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. oraz *Buphthalmum salicifolium* L.

Z kolei azjatycki gatunek, będący lekiem Tradycyjnej Medycyny Chińskiej, *Carpesium divaricatum*, znany jest głównie z zawartości bioaktywnych laktonów seskwiterpenowych. Zatem podstawowym celem analiz fitochemicznych, podjętych przez Doktorantkę, było w pierwszej kolejności ustalenie, czy profil terpenoidowy surowca pochodzącego z uprawy w warunkach krajowych jest porównywalny, a zatem czy możliwa jest introdukcja tego gatunku jako rośliny leczniczej w fitoterapii europejskiej. Drugim celem była identyfikacja i izolacja z tego gatunku metabolitów nie będących terpenami.



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
W Krakowie

Wydział Farmaceutyczny

Pani mgr Natalia Kłeczek w pełni zrealizowała te ambitne plany. Uzyskane wyniki pozwoliły określić, po raz pierwszy na świecie, nieznany dotąd profil terpenoidów i fenoli w różnych częściach morfotycznych *Xerolekia speciosissima*. Doktorantce udało się wyizolować i określić struktury aż dziesięciu związków, m.in. jednego apokarotenoidu i czterech laktonów seskwiterpenowych. Na szczególne podkreślenie zasługuje wyodrębnienie pięciu monoterpenów pochodnych tymolu, w tym dwóch nowych, nie opisanych w literaturze światowej. Są to 8-hydroksy-9-izobutyryloksy-10-izowaleryloksytymol oraz 8-hydroksy-9,10-di-izowaleryloksy-tymol. Ponadto, Doktorantka wykazała obecność w tym endemicznym gatunku licznych pochodnych fenolowych, jak flawonoidy, lignany czy kwasy kawoilochinowe i kawoiloheksarowe oraz ich estry.

Efekty prac fitochemicznych nad *Carpesium divaricatum* są podobnie imponujące. Wyizolowano bowiem pięć laktonów seskwiterpenowych typu germakranu oraz związek z grupy oksylipin – kwas *trans*-12-oksofitodienowy. Zidentyfikowano ponadto lololid, izolololid, pochodną tymolu oraz 17 fenolokwasów, w tym głównie kwasy kawoiloochinowe, kawoiloheksarowe i ich estry.

Z punktu widzenia taksonomii roślin bardzo ciekawe poznawczo są uzyskane w ramach pracy wyniki analizy porównawczej składników polifenolowych *Xerolekia speciosissima* w odniesieniu do gatunków uznawanych za pokrewne, tj. *Telekia speciosa* oraz *Buphthalmum salicifolium*. Doktorantka wnikliwie prześledziła dane fitochemiczne, dowodząc słuszności przyjętej w oparciu o badania filogenetyczne klasyfikacji wyodrębniającej rodzaj *Xerolekia*.

Wymienione powyżej osiągnięcia są niewątpliwym sukcesem Pani mgr Natalii Kłeczek i stanowią oryginalne rozwiązanie podjętych zadań badawczych, wnosząc przy tym istotny zasób nowej wiedzy o chemizmie gatunków z plemienia Inuleae.

Chcę zarazem podkreślić, że ogrom pracy fitochemicznej oraz wysokie umiejętności Doktorantki, widoczne w swobodzie z jaką korzysta z nowoczesnych metod analitycznych, separacyjnych i spektralnych, oraz we właściwej interpretacji wyników, zasługują na najwyższe uznanie. W toku izolacji i identyfikacji związków zastosowała całe spektrum podejść analitycznych, jakimi operuje współczesna fitochemia, począwszy od ekstrakcji i doboru odpowiednich ekstrahentów, poprzez odpowiednio kojarzone techniki separacyjne, w których wykorzystwała eksperymentalnie dobrane nośniki i fazy ruchome.



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Poza preparatywną chromatografią cienkowarstwową i konwencjonalną chromatografią kolumnową, Doktorantka posługiwała się wysokosprawną chromatografią cieczową, analityczną i preparatywną, oraz ultrasprawną chromatografią cieczową, sprzężoną ze spektrometrią mas.

Proces izolacji pojedynczych metabolitów z tak złożonej matrycy chemicznej, jaką jest każda roślina, jest żmudny i czasochłonny. Wymaga przy tym precyzji, umiejętności podejmowania decyzji, dotyczących warunków separacji na każdym etapie eksperymentu – nie ma bowiem identycznego schematu, który można by było zastosować do każdej partii materiału roślinnego. Izolacja czystego związku i wydajność tego procesu jest przy tym niezbędna dla ustalenia pełnej struktury chemicznej, a także możliwości prowadzenia badań farmakologicznych, określających kierunek działania i mechanizm. Efekty pracy Pani mgr Natalii Kłeczek są, z punktu widzenia fitochemii, ogromnym osiągnięciem.

Siedem wyodrębnionych z obu gatunków związków, zgodnie z koncepcją ewaluacji ich potencjału jako roślin leczniczych, poddano w dalszej części badań analizom aktywności biologicznej. Badania te wykonano we współpracy z wyspecjalizowanymi jednostkami badawczymi, wykorzystując ich doświadczenie metodyczne. Bardzo pozytywnie oceniam umiejętności Pani mgr Kłeczek w zaplanowaniu badań aktywności biologicznej, szczególnie w odniesieniu do wyboru związków. Doktorantka kierowała się nie tylko założeniami wynikającymi z przesłanek literaturowych, lecz także wnioskami z przeprowadzonych badań izolacyjnych, tj. realnych możliwościach wydajnego pozyskania tych związków w przyszłości, w przypadku stwierdzenia ich bioaktywności.

W toku pracy wykazano, że żaden z testowanych związków, pochodnych tymolu, nie posiada aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepów *Staphylococcus aureus*. Natomiast działanie przeciwzapalne, oceniane poprzez wpływ na uwalnianie reaktywnych form tlenu (ROS) oraz prozapalnych cytokin (IL-8, IL-1 β , TNF α) przez stymulowane LPS lub f-MLP ludzkie neutrofile, potwierdzono zarówno dla pochodnej tymolu (izomaślan 7,10-diizobutyryloksy-8,9-epoksy-tymolu), jak i dla dwóch laktonów seskwiterpenowych oraz kwasu *trans*-12-oksofitodienowego. Tym samym, Doktorantce udało się wyjaśnić molekularne mechanizmy działania, stojące za tradycyjnym wykorzystaniem przetworów z *Carpesium divaricatum* w leczeniu dolegliwości o podłożu



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
W Krakowie

Wydział Farmaceutyczny

zapalnym w systemie TCM. Jest to bardzo cenny wynik badań, współczesna fitoterapia wymaga bowiem weryfikacji tradycyjnych zastosowań badaniami farmakologicznymi.

W ocenie aktywności cytotoksycznej, opierając się na danych literaturowych, dotyczących aktywności cytotoksycznej laktonów z grupy germakranolidów, podjęto słuszną decyzję o ewaluacji tego kierunku działania dla trzech izolatów o takiej budowie chemicznej. Na podkreślenie zasługuje podjęcie oceny selektywności w odniesieniu do prawidłowych linii komórkowych, czego brakuje w większości doniesień literaturowych, dotyczących cytotoksyczności *in vitro* związków naturalnych oraz próba określenia mechanizmu działania cytotoksycznego poprzez ocenę roli białka p53 w odpowiedzi komórkowej. Badane germakranolidy wykazały w efekcie umiarkowaną i nieselektywną aktywność, niezależną od białka p53.

Doktorantka w obszernej dyskusji omówiła uzyskane wyniki badań fitochemicznych i badań aktywności na tle danych literaturowych, a następnie sformułowała dziesięć wniosków, podsumowujących najważniejsze obserwacje. Przebieg analiz, przedstawiony w części eksperymentalnej pracy, jest skrupulatny i rzetelny, umożliwiający odtworzenie działań. W tym miejscu mam kilka uwag. Zarówno w opisie prac fitochemicznych, jak i w omówieniu wyników, Autorka posługuje się określeniem „części nadziemne”, które, zwłaszcza w odniesieniu do gatunku *Xerolekia speciosissima*, stosuje niekonsekwentnie, co może wprowadzać czytelnika w błąd. Za części nadziemne, w przypadku roślin zielnych, uważa się łodygi wraz z liśćmi, a w znaczeniu farmaceutycznym, najczęściej wraz z kwiatami, gdyż zbiera się je w okresie kwitnienia. W rozdziale 4.1, w którym opisany jest materiał roślinny, tak określono materiał dla gatunku *Carpesium divaricatum*, cyt. „badanym surowcem były części nadziemne zebrane we wczesnej fazie kwitnienia” (str.116). Natomiast, w przypadku *X. speciosissima* podano wyraźnie, że zebrano korzenie, liście i kwiatostany tej rośliny, bez łodyg. Zatem trzy odrębne surowce. Z kolei, dla gatunków użytych do badań porównawczych, tj. *Telekia speciosa* i *Buphthalmum salicifolium*, zebrano cyt. „pojedyncze liście” (str. 117), tymczasem w tytule rozdziału 8.3 widnieje, cyt. „Wyniki analizy porównawczej polifenolowych metabolitów wtórnych części nadziemnych *T. speciosa*, *B. salicifolium* i *X. speciosissima*.” Zatem budzi się wątpliwość, które konkretnie surowce były porównywane.

Drugie pytanie dotyczy powodów decyzji o porównaniu w obrębie tych trzech gatunków wyłącznie metabolitów z grupy polifenoli. Dlaczego zrezygnowano z analizy



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
w Krakowie

Wydział Farmaceutyczny

związków terpenowych oraz z porównania profilu fitochemicznego korzeni? W dyskusji (rozdz. 13) Doktorantka omawia wprawdzie kwestie obecności seskwiterpenów w gatunkach referencyjnych w oparciu o dane literaturowe, ale biorąc pod uwagę zmienność profilu fitochemicznego, zależnie od warunków glebowo-klimatycznych szkoda, że zrezygnowano z szerszej analizy porównawczej mając do dyspozycji materiał roślinny pochodzący z tej samej lokalizacji. Wszystkie trzy gatunki roślin pozyskano bowiem z uprawy w Ogrodzie Roślin Leczniczych przy Zakładzie Fitochemii Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie.

Kolejne pytanie dotyczy wyników badań fitochemicznych *Carpesium divaricatum*. Jednym z celów badań tego gatunku była ocena ewentualnych różnic jakościowych w obrębie gerkranolidów, w warunkach uprawy na terenie Polski. W dyskusji Doktorantka powołuje się na dane literaturowe, dotyczące składu rośliny pochodzenia azjatyckiego, mówiące o występowaniu czterech grup związków o szkielecie gerkranu. Cztery z pięciu wyizolowanych z surowca krajowego laktonów seskwiterpenowych to związki jednego typu strukturalnego (poch. 4,5,8,9-tetrahydroksy-3okso-germakran-6,12-olidu). Czy, niezależnie od izolacji, Doktorantka nie stwierdziła obecności przedstawicieli pozostałych grup? Zabrakło też szerszego komentarza, podsumowującego w jakim stopniu profil fitochemiczny surowców z różnych lokalizacji jest rozbieżny, zwłaszcza, że brak jest danych ilościowych. Czy w ogóle *Carpesium divaricatum* wyhodowany w warunkach europejskich może dostarczyć równocennego surowca leczniczego?

Z kolei w odniesieniu do badań aktywności cytotoksycznej nasuwa się pytanie o kryterium selekcji do badań selektywności tylko jednego z gerkranolidów, a także czym kierowano się przy wyborze linii komórkowych.

Powyższe uwagi nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną niniejszej rozprawy doktorskiej. Na podstawie zakresu badań, ich planowania i sposobu realizacji można jednoznacznie stwierdzić, że Pani mgr Natalia Kłeczek jest w pełni przygotowana do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Uzyskane wyniki badań są nowatorskie, stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i mają istotny wkład w poszukiwania nowych leczniczych substancji pochodzenia naturalnego.



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Uwagi dotyczące układu pracy i podziału treści oraz strony edytorskiej.

Recenzowana rozprawa jest bardzo obszerna, obejmuje 300 stron, wraz z literaturą (aż 539 pozycji) oraz spisem tabel, rysunków i schematów. Układ pracy jest klasyczny, obejmuje wstęp, cel, część teoretyczną, część eksperymentalną, dyskusję, wnioski oraz dwujęzyczne streszczenie (polski i angielski). Autorka bardzo drobiazgowo przedstawia skomplikowaną systematykę plemienia *Inuleae* oraz poszczególne grupy metabolitów wtórnych, zarówno terpenowych, jak i fenolowych, a następnie aktywność i zastosowania lecznicze najważniejszych przedstawicieli, tj. roślin z rodzaju *Inula* i *Blumea*.

W mojej opinii, ta część jest nadmiernie rozbudowana i jednocześnie trudna w lekturze, szczególnie gdy Autorka skrupulatnie wymienia wszystkie opisane w literaturze związki i ich rozpowszechnienie. Znacznie korzystniej byłoby ująć większość informacji fitochemicznych w formie tabelarycznej, a z niektórych wątków w ogóle zrezygnować. Podobny schemat powtarza się przy omawianiu gatunków będących przedmiotem badań oraz całego rodzaju *Carpesium* i *Xerolekia*. Ujęcie tabelaryczne niektórych treści nadałoby pracy przejrzystości.

Jednocześnie, przy całej swojej drobiazgowości, Autorka opuszcza pewne istotne kwestie, a inne upraszcza. Przykładowo, w kontekście późniejszych dywagacji dotyczących pokrewieństwa taksonomicznego rodzajów *Xerolekia*, *Telekia*, *Buphthalmum* i *Carpesium* pomocny byłby jakiś schemat obrazujący ich pozycję systematyczną opartą o analizy filogenetyczne. Z kolei w rozdziale 1.3.1 Terpenoidy, Autorka zaznacza cyt. „uwzględniono te rodzaje, u których dane związki występują w największej ilości”, jednak przy braku danych ilościowych trudno się domyślić o co chodzi. Wreszcie, omawiając grupę laktonów seskwiterpenowych, trudno nie wspomnieć o ich potencjale alergizującym, który ma znaczenie dla późniejszego rozpatrywania tych związków jako potencjalnych leków. Tę kwestię, wraz z zależnościami strukturalnymi, jednak zupełnie pominięto, co, w mojej opinii, jest niedopatrzeniem.

Do części eksperymentalnej nie mam większych zastrzeżeń, jak wspominałam wcześniej, precyzyjny opis wszystkich procedur umożliwia odtworzenie eksperymentów. Tekst jest dobrze zilustrowany tabelami, schematami, wykresami, zdjęciami oraz wydrukami chromatogramów i widm ^1H NMR. W odniesieniu do związków nr 1-5



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
w Krakowie

Wydział Farmaceutyczny

brakuje natomiast widm ^{13}C NMR oraz 2D NMR, o wyniki których Autorka opiera analizę struktur. Uważam, że szczególnie w przypadku dwóch nowo zidentyfikowanych związków, tj. nr 1 i 2, widma te powinny być zamieszczone. Choć dla związku nr 1 (XeK10) szersze dane NMR są umieszczone w tabeli (tab. 8.1, str.158), to dla związku nr 2 (XeK6=Xek11), tabelarycznie zestawiono wyłącznie sygnały widma protonowego ^1H NMR.

Kolejna uwaga dotyczy powtarzania pewnych treści omówionych w wydzielonych na wstępie metodach chromatograficznych TLC, CC czy HPLC w części szczegółowej, odnoszącej się do procesu izolacji. Ponadto, schematy od 5.1 do 5.6 powinny raczej podsumowywać fitochemiczną część eksperymentalną dla poszczególnych gatunków, a nie ją rozpoczynać.

Praca jest stylistycznie poprawna, z niewielką ilością nieprecyzyjnych sformułowań, najczęściej pojawia się „aktywność przeciwnowotworowa” zamiast aktywność cytotoksyczna lub antyproliferacyjna w odniesieniu do badań *in vitro* (np. str. 107, rozdz. 3.5.1.1). Zauważyłam też kilka przykładów żargonu technicznego (np. str. 143. „frakcji otrzymanych metodą CC na **silikażelu**”) oraz fragmentów pisowni angielskiej w nazwach związków, „oxo” czy „hydroxy”. W spisie treści błędnie ponumerowano części pracy, powinno być sześć a nie dziewięć. Są to jednak minimalne uchybienia, biorąc pod uwagę objętość recenzowanej rozprawy.

Podsumowanie i wnioski końcowe.

Wszystkie komentarze dotyczące niedociągnięć nie mają wpływu na bardzo wysoką ocenę wartości naukowej rozprawy Pani mgr Natalii Kłeczek. Tematyka badań jest aktualna i bardzo istotna z punktu widzenia nauk medycznych. Uzyskane wyniki znacząco poszerzają wiedzę fitochemiczną i fitofarmakologiczną, potwierdzając celowość badań bazujących na danych etnomedycznych w poszukiwaniu nowych bioaktywnych struktur. Waleń naukowy przeprowadzonych badań potwierdzają opublikowane już artykuły w renomowanych czasopismach z bazy JCR, oparte o uzyskane w ramach pracy doktorskiej wyniki. Zawarte w rozprawie treści świadczą o bardzo szerokiej wiedzy Doktorantki, dotyczącej waleńów leczniczych, chemizmu i aktywności farmakologicznej



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

roślin plemienia Inuleae i całej rodziny Asteraceae oraz o doskonałej orientacji w skomplikowanych kwestiach taksonomiczno-fitochemicznych.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Natalii Kłeczek spełnia warunki 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 (tj. Dz.U. z 2017 r., poz. 1789).

Jednocześnie zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Natalii Kłeczek do dalszych etapów przewodu doktorskiego *[wszczętego na podstawie przepisów Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1669, art. 179, ust. 2) i Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018, poz. 261)]*.

Ponadto wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, co zawarłam w odrębnym piśmie skierowanym do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk.


Irma Podolak



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. Irma Podolak

Katedra i Zakład Farmakognozji

Kraków, 02. 01. 2023

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Natalii Kłeczek

pt.

„Analiza fitochemiczna wybranych roślin z plemienia Inuleae – izolacja wtórnych metabolitów o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwzapalnym i cytotoksycznym oraz wstępna ocena ich aktywności”

Niniejszym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o przyznanie wyróżnienia przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Kłeczek pt. „Analiza fitochemiczna wybranych roślin z plemienia Inuleae – izolacja wtórnych metabolitów o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwzapalnym i cytotoksycznym oraz wstępna ocena ich aktywności”.

Uzasadnienie:

Tematyka ww. rozprawy doktorskiej świetnie wpisuje się we współczesne trendy badań z zakresu fitochemii, chemofenetyki, fitofarmakologii i etnomedycyny. Szczególne znaczenie ma tu selekcja gatunków o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym oraz rewizja tradycyjnych kierunków stosowania surowców wraz z identyfikacją głównych składników odpowiedzialnych za określony profil aktywności. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę pozwoliły prześledzić te kwestie dla dwóch gatunków plemienia Inuleae, tj. *Xerolekia speciosissima* (L.) Anderb. oraz *Carpesium divaricatum* Sieb. & Zucc. Skoncentrowano się w nich na izolacji metabolitów wtórnych z grupy terpenów i fenoli

Katedra i Zakład Farmakognozji

30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 55 60, fax +48 12 620 55 75

e-mail: farmakog@cm-uj.krakow.pl, www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

oraz analizie aktywności *in vitro* ukierunkowanej na działanie przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych.

Zakres przeprowadzonych badań jest bardzo szeroki, a uzyskane wyniki są nowatorskie, posiadają wysokie walory poznawcze oraz potencjał aplikacyjny.

Wyizolowano aż piętnaście związków, w tym 9 laktonów seskwiterpenowych. Na szczególne podkreślenie zasługuje wyodrębnienie dwóch strukturalnie nowych monoterpenów pochodnych tymolu, nie opisanych dotąd w literaturze światowej. Doktorantka określiła wielokierunkową aktywność siedmiu izolatów potwierdzając zasadność stosowania *Carpesium divaricatum* we wskazaniach wykorzystywanych w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej.

Ważnym efektem aplikacyjnym badań jest wykazanie podobieństwa profilu fitochemicznego surowca uprawianego w warunkach krajowych wobec surowca pochodzenia azjatyckiego. Daje to podstawy do rozpatrywania uprawy *Carpesium divaricatum* w celu pozyskania równocennego surowca leczniczego, a ponadto ma ogromne znaczenie dla oceny biokompatybilności wyciągów z roślin pozyskiwanych z różnych lokalizacji geoklimatycznych.

Na wyróżnienie zasługuje umiejętność planowania eksperymentu, wnikliwej interpretacji wyników i związanej z tym modyfikacji zakresu badań. Zwraca uwagę również biegłość Doktorantki w korzystaniu z nowoczesnych metod analizy fitochemicznej.

Uzyskane w ramach pracy doktorskiej wyniki stanowią przedmiot czterech artykułów oryginalnych, w których Pani mgr Natalia Kłeczek jest pierwszym autorem. Wszystkie publikacje ukazały się w renomowanych czasopismach z bazy JCR, wysoko punktowanych przez MEiN, tj. *Molecules* i *Phytochemistry Letters*.

Jako recenzent, z pełną odpowiedzialnością stwierdzam, że całokształt prac badawczych wykonanych przez Panią mgr Natalię Kłeczek wyraźnie przewyższa wymagania stawiane pracom doktorskim i zasługuje na wyróżnienie.


Irma Podolak