



**Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych
UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO w LUBLINIE**

ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin

tel./fax +48 81 448 7080; e-mail: gzgorka@pharmacognosy.org

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Magdaleny Kulig

pt.

**„Ocena aktywności przeciwnowotworowej i przeciwinfekcyjnej składników olejku
eterycznego z *Citrus hystrix* D.C.”,**

zrealizowanej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Jagiellońskiego - *Collegium Medicum* w Krakowie

Promotor naukowy: dr hab. Irma Podolak

Pomocniczy promotor naukowy: dr Agnieszka Galanty

1. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

1.1. Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

Problematyka badawcza zawarta w dysertacji doktorskiej Pani mgr Magdaleny Kulig obejmowała w wiodącym zakresie ocenę (na modelach doświadczalnych *in vitro*) aktywności przeciwnowotworowej i przeciwdrobnoustrojowej olejku eterycznego, otrzymanego metodą hydrodestylacji z owocni gatunku cytrusa *Citrus hystrix* D.C. (OECh), oraz jego dominujących składników: D-limonenu, β -pinenu oraz terpinen-4-olu. Badano także działanie pro- i przeciwzapalne OECh i ww. związków terpenowych oraz ich wpływ na aktywność enzymów: tyrozynazy i hialuronidazy, odgrywających istotną rolę w procesach fizjologicznych, zachodzących w skórze. Ponadto, wykonano podstawową analizę jakościową i ilościową OECh z wykorzystaniem sprzężonych techniki chromatograficznych (GC, LC) i spektroskopowych (PDA, MS). Prace doświadczalne prowadzono w ramach kooperacji z japońską firmą Apipol Farma Japan z Tokio, która dostarczyła OECh do badań.

Cele naukowe dysertacji zostały zrealizowane przez Autorkę w oparciu o szczegółową analizę danych literaturowych, którą zaprezentowano w części rozprawy opatrzonej tytułem „Wstęp teoretyczny”. Obejmowała ona m.in. charakterystykę chemizmu i aktywności biologicznej składników występujących w substancjach i przetworach roślinnych otrzymywanych z gatunków roślin należących do rodzaju *Citrus* L., w tym *C. hystrix*. Ze względu na tematykę prowadzonych badań, przegląd danych z piśmiennictwa naukowego odnosił się w szerokim zakresie do cytrusowych olejków eterycznych. Autorka dysertacji zaprezentowała tabelaryczne zestawienia fitoskładników, zidentyfikowanych we frakcjach olejkowych różnych gatunków, odmian oraz hybryd międzygatunkowych cytrusów. Przedstawiła także dane literaturowe odnoszące się do badań aktywności

przeciwnowotworowej, przeciwdrobnoustrojowej, przeciwzapalnej oraz melanotropowej (związanej ze zdolnością inhibicji enzymu tyrozynazy), wykazywanej zarówno przez zespoły, jak i pojedyncze składniki olejków cytrusowych. Na podstawie zgromadzonych danych z piśmiennictwa, uwzględniając nieliczne badania fitochemiczne i biologiczne, prowadzone dla frakcji olejkowej owoców *C. hystrix* oraz jej terpenowych komponentów, można stwierdzić, że problematyka badawcza realizowana przez Panią mgr Magdalenę Kulig posiada niewątpliwy aspekt oryginalności naukowej. Dotyczy to zwłaszcza przeprowadzonych badań aktywności cytostatycznej OECh na ludzkich liniach komórek nowotworowych i referencyjnych liniach komórek prawidłowych, a także oceny hamującego wpływu OECh na aktywność enzymu tyrozynazy.

1.2. Ocena kluczowych rezultatów badań i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Główne wyniki badań eksperymentalnych, przeprowadzonych w ramach niniejszej dysertacji doktorskiej, odnoszą się do oceny biologicznych efektów OECh i jego składników w warunkach *in vitro*. Badania aktywności biologicznej poprzedziła analiza fitochemiczna OECh, obejmująca ocenę składu jakościowego oraz zawartości poszczególnych komponentów olejkowych metodą chromatografii gazowej (GC), sprzężonej ze spektrometrią mas (MS). Na podstawie uzyskanych wyników ustalono, że dominujące ilościowo związki w OECh stanowią D-limonen, β -pinen oraz terpinen-4-ol. Potwierdziło to wcześniejsze doniesienia literaturowe, dotyczące badań fitochemicznych frakcji olejkowych z owoców *C. hystrix*, pozyskanych z drzew rosnących na obszarze Tajlandii. Dodatkowym elementem badań fitochemicznych była ocena toksykologiczna OECh pod kątem obecności fotosensybilizujących związków z grupy furanokumaryn. Analiza, przeprowadzona metodą TLC i HPLC z detekcją UV oraz wykorzystaniem substancji referencyjnej (bergamotyny), nie potwierdziła obecności fototoksycznych związków furanokumarynowych i, tym samym, udokumentowała bezpieczeństwo stosowania OECh, otrzymanego metodą destylacji z parą wodną, jako potencjalnego środka dermatologicznego.

W badaniach biologicznych OECh i jego składników zastosowano modele komórkowe, które odzwierciedlały określone typy schorzeń skóry, w tym te o etiopatogenezie nowotworowej (czerniak o różnym stopniu złośliwości), drobnoustrojowej (infekcje grzybicze i bakteryjne) czy zapalnej, związanej ze zwiększoną aktywnością hialuronidaz i następczym wzrostem przepuszczalności tkanki łącznej oraz promowaniem migracji patogennych drobnoustrojów z wrót zakażenia w głąb skóry i sąsiadujących tkanek.

Wyniki badań aktywności przeciwnowotworowej OECh, głównych składników (D-limonenu, β -pinenu oraz terpinen-4-olu) i ich dwóch mieszanin na ludzkich liniach komórkowych czerniaka, analizowane pod kątem działania cytotoksycznego (w teście z LDH i błękitem trypanu) wykazały zróżnicowany wpływ tych substancji na żywotność komórek rakowych. Najwyższą wrażliwością na działanie OECh odznaczała się linia komórek czerniaka WM793, pochodząca z ogniska pierwotnego nowotworu. Podobne, lecz nieco słabsze efekty, uzyskano dla pojedynczych związków, spośród których najbardziej aktywny był D-limonen. Z kolei w przypadku mieszanin głównych składników olejku, bardziej efektywna była ta

o składzie zbliżonym do występującego w OECh, przy czym najsilniejszy efekt cytotoksyczny uzyskano dla linii HTB140, zapoczątkowanej z komórek wywodzących się z metastaz czerniaka do węzłów chłonnych. Ocenę działania przeciwnowotworowego OECh i jego składników prowadzono także pod kątem ich wpływu na zdolność proliferacji komórek nowotworowych czerniaka. W teście inkubacji linii komórkowych nowotworu z OECh, wykonywanym przy użyciu fioletu krystalicznego, jako barwnika jądrowego DNA, wykazano najwyższy spadek liczby proliferujących komórek czerniaka WM793, wywodzących się z ogniska pierwotnego nowotworu. Obserwowany efekt cytostatyczny był najsilniejszy dla dla OECh, słabszy zaś dla pojedynczych związków i ich mieszanin. Z kolei w teście inkubacji linii komórkowych czerniaka z OECh, prowadzonym z wykorzystaniem bromodeoksyurydyny (BrdU), jako wskaźnika replikacji DNA, wykazano najsilniejsze zahamowanie procesów podziałowych w linii komórek czerniaka A375, wywodzących się z litego guza nowotworowego. Podobne, lecz słabsze efekty hamujące uzyskano w tej samej linii komórkowej dla D-limonenu, β -pinenu oraz terpinen-4-olu oraz ich mieszanin.

Podsumowując wyniki szeroko zakrojonych badań aktywności przeciwnowotworowej OECh, przeprowadzone przez Doktorantkę z wykorzystaniem testów *in vitro* żywotności komórek czerniaka złośliwego oraz testów oceniających ich zdolność proliferacyjną, należy podkreślić, że tego typu badania nie były dotychczas prowadzone, zarówno na ludzkich, jak i zwierzęcych liniach komórkowych tego nowotworu. Tak więc uzyskane wyniki stanowią oryginalny wkład Pani mgr Magdaleny Kulig w istniejący stan wiedzy naukowej na temat wpływu olejków eterycznych oraz ich składników na żywotność i zdolności podziałowe komórek czerniaka złośliwego.

W powiązaniu z oceną aktywności przeciwnowotworowej, stosując analogiczną metodologię badań, przeprowadzono analizę wpływu OECh, głównych składników (D-limonenu, β -pinenu oraz terpinen-4-olu) oraz ich mieszanin na żywotność i proliferację ludzkich linii komórek prawidłowych skóry, w tym keratynocytów (HaCaT), melanocytów (HEM) i fibroblastów (HSF). Ponieważ w dostępnej literaturze naukowej brak jest doniesień prezentujących ocenę wpływu olejków eterycznych na żywotność i proliferację aż trzech typów komórek prawidłowych skóry, eksperymenty te mają charakter całkowicie nowatorski. W przypadku pierwszej grupy badań, wykazano bardzo niską wrażliwość wszystkich trzech typów komórek prawidłowych na działanie OECh, jego składników oraz mieszanin, czego wyrazem było uzyskanie wysokich wartości parametru IC_{50} , znacznie przekraczających poziomy stężeń hamujących żywotność komórek czerniaka. Pozwoliło to sformułować wniosek końcowy o selektywnej cytotoksyczności OECh i jego składników w stosunku do komórek tego nowotworu. Zdecydowanie silniejsze efekty działania udokumentowano w badaniach związanych z oceną wpływu OECh i jego składników na proliferację ww. linii komórek prawidłowych skóry. W obu testach (z użyciem fioletu krystalicznego i BrdU), stosując OECh w najwyższym badanym stężeniu (300 μ g/ml), zaobserwowano m.in. zmniejszenie liczby proliferujących keratynocytów i fibroblastów w granicach od 73 do 24%, zaś dla melanocytów - o ok. 70% w stosunku do grupy kontrolnej. Uzyskane wyniki badań wskazują jak istotne było zaplanowanie i prowadzenie równoległej

oceny aktywności cytotoksycznej i cytostatycznej OECh dla linii komórkowych czerniaka oraz komórek prawidłowych skóry, co pozwoliło Doktorantce ustalić bezpieczne zakresy stężeń olejku, lokujące się poniżej progu toksyczności komórkowej na potrzeby dalszych badań biologicznych.

Równie szeroki zakres miały badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej OECh wobec patogenów, wywołujących infekcje powłok skórnych, w tym grzybów pleśniowych i drożdży, dermatofitów oraz bakterii z rodzaju *Acinetobacter baumannii*. Wykorzystując metodę dyfuzyjno-krażkową oraz metodę seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym, Autorka dysertacji wytypowała najbardziej wrażliwe na działanie OECh szczepy grzybów pleśniowych (w tym: *Aspergillus fumigatus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, szczepy z rodzaju *Fusarium* i *Acremonium*), szczepy drożdży (w tym *Candida albicans*), a także szczepy dermatofitów (m.in. *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*), dla których ustalona aktywność przeciwgrzybicza była najbardziej porównywalna do substancji referencyjnych – odpowiednio: itrakonazolu, flukonazolu i amorfoliny. Na podkreślenie zasługuje fakt, że dla przeważającej większości badanych szczepów grzybów (z wyjątkiem *Aspergillus fumigatus*) nie opublikowano dotychczas wyników badań, dotyczących oceny aktywności przeciwgrzybiczej OECh. Analogiczną metodykę badawczą zastosowano do oceny aktywności przeciwbakteryjnej OECh wobec 9 szczepów z rodzaju *A. baumannii*. Badania dowiodły, że OECh charakteryzuje się wysoką zdolnością hamowania wzrostu wszystkich badanych szczepów tego rodzaju. Jest to tym bardziej istotne, że *A. baumannii* wywołuje zakażenia oportunistyczne u ludzi, identyfikowane m.in. w warunkach klinicznych i prowadzące do groźnych powikłań w postaci sepsy. Ponadto, poprzez tworzenie struktur biofilmu i szybki rozwój oporności na antybiotyki oraz środki antyseptyczne, szczep ten zalicza się obecnie do grupy bakterii trudnych do eradykacji. Tak więc wyniki aktywności przeciwdrobnoustrojowej OECh, uzyskane przez Autorkę dysertacji, mogą stanowić przyczynek do dalszych, pogłębionych badań, które byłyby ukierunkowane na ocenę działania hamującego/bójkowego pojedynczych składników OECh wobec ww. grup patogenów, a także ocenę efektów synergicznych mieszanin ww. składników.

W obszarze zagadnień związanych z bezpieczeństwem stosowania OECh na zdrową skórę oraz skórę objętą stanem zapalnym lokują się badania doświadczalne, dotyczące oceny aktywności pro- i przeciwzapalnej tego przetworu, jego głównych składników i mieszanin. W pierwszym przypadku, testy wykonane na ludzkich komórkach keratynocytów HaCaT, w których jako wskaźnik aktywności prozapalnej zastosowano oznaczenie poziomu kaspazy-1 metodą luminescencji, wykazały m.in., że zmierzona aktywność tego enzymu była o 70% niższa dla OECh w stosunku do substancji referencyjnej o właściwościach prozapalnych – lipopolisacharydu (LPS). Przeprowadzone eksperymenty badawcze są oryginalne w sensie naukowym i dokumentują bezpieczeństwo naskórnej drogi podania OECh. Z kolei w badaniach aktywności przeciwzapalnej tego przetworu, w teście *in vitro* hamowania denaturacji termicznej albuminy, wykazano stosunkowo wysoką aktywność przeciwzapalną

OECh, wynoszącą 50% wartości wskaźnika inhibicji, uzyskanego dla substancji referencyjnej (diklofenaku sodu).

W ramach badań aktywności biologicznej OECh i jego składowych, wykonano również testy *in vitro* oceniające wpływ tego przetworu na funkcję fizjologiczną dwóch enzymów, istotnych dla procesów metabolicznych i/lub promujących rozwój określonych patomechanizmów w komórkach skóry. Badano m.in. wpływ OECh i jego komponentów na proces melanogenezy, związany z funkcją enzymu tyrozynazy. Wyniki przeprowadzonych testów wykazały silnie działanie hamujące OECh wobec tego enzymu, które dość dobrze korelowało z aktywnością substancji referencyjnej (kwasu kojowego), reprezentującej grupę inhibitorów tyrozynazy. Ponieważ dotychczas w literaturze naukowej nie opisano tego typu aktywności dla OECh, wyniki badań dobrze rokują co do potencjalnej możliwości wykorzystania tego przetworu roślinnego w dermokosmetologii w celu łagodzenia zmian pigmentacyjnych w postaci przebarwień skóry. W drugim z przeprowadzonych testów, oceniano wpływ OECh, jego wiodących składników oraz mieszanin na aktywność hialuronidazy, odpowiedzialnej m.in. za depolimeryzację spoiwa tkanki łącznej w skórze. Nie wykazano jednakże znaczącego działania hamującego aktywność tego enzymu, ani dla OECh, ani jego składowych, nawet w najwyższym badanym stężeniu (300 µg/ml).

Oceniając kluczowe rezultaty badań doświadczalnych, zaprezentowane w niniejszej dysertacji doktorskiej, należy stwierdzić, że mają one istotne znaczenie naukowe ze względu na oryginalność tematyki badawczej, obejmującą przeważającą część prac doświadczalnych dotyczących aktywności biologicznej OECh, jego głównych składników (D-limonenu, β-pinenu oraz terpinen-4-olu) oraz ich mieszanin. Część wyników badań została już zresztą z powodzeniem opublikowana w 2017 r. w *ScienceAsia* - anglojęzycznym czasopiśmie posiadającym IF, wydawanym przez *The Science Society of Thailand*.

Odnosząc się do praktycznych aspektów, związanych z rezultatami badań, należy zwrócić uwagę, iż obecnie, w tradycyjnej medycynie azjatyckiej, wykorzystuje się przetwory z owoców i liści *C. hystrix* jako środki dermatologiczne o działaniu przeciwzapalnym i przeciwobrzękowym, przeciwłupieżowym oraz stymulującym wzrost włosów, a także insektobójczym. W oficynalnym leczeniu europejskim i etnomedycynie tego typu zastosowania nie są znane. Dotyczy to także grupy dermokosmetyków. Z tego względu, wyniki badań doświadczalnych, uzyskane w ramach niniejszej dysertacji doktorskiej, mogą stanowić przyczynek do dalszych prac o charakterze wdrożeniowym, które mogłyby skutkować w przyszłości np. opracowaniem produktów dermatologicznych, o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, zawierających w swoim składzie OECh.

1.3. Poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Język rozprawy doktorskiej jest w przeważającej mierze poprawny stylistycznie i zrozumiały. Z obowiązku recenzenckiego, chciałabym jednakże przytoczyć kilkanaście najbardziej zauważalnych nieścisłości formalno-językowych lub nieprawidłowych sformułowań, które powtarzały się wielokrotnie w tekście dysertacji, zwłaszcza części teoretycznej pracy:

- s. 1: Tytuł rozprawy doktorskiej: „Ocena aktywności przeciwnowotworowej i przeciwinfekcyjnej składników olejku eterycznego z *Citrus hystrix* D.C.”, zawiera nieprecyzyjny termin: „przeciwinfekcyjnej”, który należałoby zastąpić bardziej poprawnym wyrażeniem: „przeciwdrobnoustrojowej”. Dotyczy to również innych fragmentów tekstu dysertacji.
- s. 11 (oraz w innych miejscach) – jest: „olejek eteryczny wydestylowany ze skórek owoców” – powinno być: „olejek eteryczny otrzymany metodą destylacji z parą wodną z owocni zewnętrznej i środowocni”
- s. 19 – jest: „Grzyby pleśniowe *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* oraz *Acremonium*” – powinno być: „Grzyby pleśniowe z rodzajów: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* oraz *Acremonium*”
- s. 19 – jest: „mikotoksyn” – powinno być: „mykotoksyn”
- s. 23 – jest: „wytwarzanie enzymów inaktywacyjnych przy udziale β -laktamaz” – powinno być: „wytwarzanie enzymów z grupy β -laktamaz”
- s. 25 – jest: „promienie UVA (280-320 nm) i UVB (320-400 nm)” – powinno być: „promienie UVA (320-400 nm) i UVB (280-320 nm)”
- s. 33 – jest: „generowanie polem mikrofalowym wzrostu temperatury cząsteczek wody” – powinno być: „generowanie, z udziałem mikrofal, drgań rotacyjnych cząsteczek wody, którym towarzyszy wzrost temperatury”
- s. 36 (oraz dalej w tekście dysertacji) – jest: „bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy” – powinno być: „bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy”
- s. 44 (oraz dalej w tekście dysertacji) – jest: „Rodzaj *Citrus*” – powinno być: „Rodzaj *Citrus* L.”
- s. 45 – jest: „4.2 Etymologia” – powinno być: „4.2 Etymologia nazwy rodzaju *Citrus* L.”
- s. 48 – jest: „naringina” – powinno być: „naryngina”; jest: „sinensetyna” – powinno być: „synensetyna”
- s. 70 – jest: „Ryc. 15. Botanika rośliny *Citrus hystrix*” – powinno być: „Ryc. 15. Morfologia gatunku *C. hystrix*”
- s. 86 – jest: „Aktywność przeciwrepelentna” – powinno być: „Aktywność repelentna”
- s. 87 – jest: „Ekstrakt octanowo-etylowy” – powinno być: „Ekstrakt octanowy”
- s. 103 – jest: „aktywności terpinen-4-olu wobec szczepów grzybiczych, drożdżowych i dermatofitów” – powinno być: „aktywności terpinen-4-olu wobec szczepów grzybów pleśniowych, drożdży i dermatofitów”
- s. 103 – jest: „aktywności terpinen-4-olu wobec szczepów grzybiczych, drożdżowych i dermatofitów” – powinno być: „aktywności terpinen-4-olu wobec szczepów grzybów pleśniowych, drożdży i dermatofitów”
- s. 108 – jest: „Spektrometr masowy sprzężony z chromatografem gazowym” – powinno być: „Spektrometr mas sprzężony z chromatografem gazowym”

Uwagi ogólne do zapisów w tekście dysertacji oraz tabelach:

- Gatunki roślin, wymieniane po raz pierwszy w tekście dysertacji, powinny zawierać w nazwie skrótową informację o autorze/autorach opisu botanicznego (systematycznego), np. „*Citrus sinensis* (L.) Osbeck”, zamiast „*Citrus sinensis*”.
- W zapisie nazw rodzin botanicznych nie stosuje się kursywy.
- Zgodnie z nową nomenklaturą farmakognostyczną, zawartą w FP X i XI, zamiast nazwy „surowiec roślinny” stosuje się termin „substancja roślinna”.
- Dla wartości liczbowych badanych wskaźników (prezentowanych m.in. w tabelach), które są wyrażone liczbami całkowitymi z rozwinięciem dziesiętnym, setnym, itp., stosuje się separatory w postaci przecinków, a nie kropek.

2. Ocena metodologiczna rozprawy doktorskiej

2.1. Dobór piśmiennictwa, umiejętność wykorzystania źródeł

W rozprawie doktorskiej wykorzystano bogate i aktualne piśmiennictwo naukowe (ponad 400 pozycji). Cytowane prace są głównie anglojęzyczne. W przeważającej większości przypadków przedstawione są w formie ujednoliconej, zgodnej ze standardami bibliometrycznymi. Dane zawarte w publikacjach, zacytowano prawidłowo w tekście dysertacji. Umiejętność wykorzystania materiałów źródłowych jest szczególnie zauważalna w dyskusji uzyskanych wyników, gdzie zagadnienia, dotyczące m.in. badań własnych aktywności przeciwnowotworowej, przeciwdrobnoustrojowej, przeciwzapalnej OECh, jego składników i mieszanin, zostały w sposób krytyczny skonfrontowane z danymi literaturowymi i opatrzone własnym komentarzem Autorki dysertacji.

2.2. Poprawność formułowania problemów i hipotez (założenia badawcze)

Problematyka badawcza oraz główne cele pracy zostały sformułowane we wprowadzeniu do dysertacji oraz odrębnym rozdziale, otwierającym część eksperymentalną, zatytułowanym: „Główne cele badawcze”. Autorka przedstawiła naukowy aspekt zaplanowanych i zrealizowanych badań *in vitro*, związany z obserwowanym wzrostem ilości doniesień literaturowych, dotyczących m.in. aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej olejków eterycznych oraz ich składników, a także braku tego typu badań dla olejku z owoców *C. hystrix*. Na tej podstawie, sformułowano hipotezy badawcze, które zakładały występowanie podobnych właściwości biologicznych dla OECh i jego składników. Dodatkowo, w celu oceny bezpieczeństwa stosowania tego przetworu, jako potencjalnego środka dermatologicznego, zaplanowano i zrealizowano badania cytotoksyczności OECh na liniach ludzkich komórek prawidłowych skóry. Dzięki temu, w znaczącym stopniu zwiększono aplikacyjny charakter prowadzonych prac doświadczalnych.

2.3. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania

Dobór metodologii badań do założonych celów badawczych był prawidłowy i poprzedzony szczegółową analizą danych literaturowych, co skutkowało m.in.

odpowiednim doborem stężeń roztworów OECh, jego głównych składników oraz ich mieszanin do badań na liniach komórkowych czerniaka, testów mikrobiologicznych oraz enzymatycznych. W sposób zgodny ze standardami międzynarodowymi, przygotowano i przeprowadzono badania z wykorzystaniem hodowli prawidłowych i nowotworowych linii komórek skóry ludzkiej, a także hodowli szczepów drobnoustrojów i oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Metodyka badań zastosowana w ocenie aktywności pro- i przeciwzapalnej oraz zdolności hamowania enzymów: tyrozynazy i hialuronidazy przez OECh mieści się również w grupie procedur standardowych. W analizie statystycznej wyników, dotyczących aktywności cytotoksycznej, antyproliferacyjnej, pro- i przeciwzapalnej, prawidłowo dobrano test nieparametryczny *U* Manna-Whitney'a, ilość niezależnych powtórzeń eksperymentów ($n=3$) oraz poziom istotności statystycznej ($*p<0,05$). Połączenie dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post-hoc* Bonferroniego ($*p<0,05$; $**p<0,01$ i $***p<0,001$), które umożliwiło dokonanie porównań wielokrotnych między danymi uzyskanymi w teście hamowania aktywności również nie budzi moich zastrzeżeń.

2.4. Poprawność układu pracy i struktury podziału treści

Rozprawa doktorska jest bardzo obszerna - liczy 259 stron. Pracę otwiera spis treści, w którym wyróżniono 12 głównych rozdziałów zawierających liczne podrozdziały. Obejmują one m.in.: wstęp teoretyczny, część eksperymentalną, poprzedzoną opisem głównych celów badań, dyskusję wyników oraz ich podsumowanie i wnioski. Bezpośrednio za spisem treści Autorka zamieściła wykaz skrótów stosowanych w tekście dysertacji oraz krótkie wprowadzenie, które, wg mojej opinii, powinno zawierać nie tylko ogólny zakres badań, ale także jasno sformułowane cele badawcze, a zwłaszcza dokładnie zdefiniowany przedmiot badań (OECh, jego główne składniki i ich mieszaniny), które Autorka zaprezentowała dopiero na początku części eksperymentalnej (str. 107 dysertacji). Ponadto, mam pewne obiekcje do nazwy rozdziału „wstęp teoretyczny”. Wg mnie jest to raczej „opis teoretyczny” albo „część teoretyczna”, ponieważ liczy prawie 100 stron. Rozdział ten byłby chyba bardziej przejrzysty, gdyby zredukować (i nieco skondensować) objętość tekstu. Mam tu na myśli usunięcie całego rozdziału 3., poświęconego ogólnej charakterystyce olejków eterycznych, którego treści zawarto również w dużym stopniu w następnych rozdziałach. Niepotrzebnym zabiegiem edytorskim było także wyodrębnienie z rozdziału 4 („Rodzaj *Citrus*”), rozdziału 6 („*Citrus hystrix* D.C.”) oraz z rozdziału 5 („Cytrusowe olejki eteryczne”) rozdziału 7 („Charakterystyka głównych składników olejku eterycznego ze skórek owoców *Citrus hystrix*”). Zabieg ten utrudnia bowiem szybkie i równoległe porównywanie danych literaturowych nt. profili chemicznych i fitofarmakologicznych zarówno gatunku *C. hystrix* D.C. z innymi gatunkami cytrusów, jak i olejku eterycznego z owoców czy liści tego taksonu z olejkami pozyskanymi z innych cytrusów. Na pochwałę natomiast zasługuje zamieszczenie w końcowej części pracy rozdziału „Załączniki”, zawierającego tabelaryczne zestawienia danych literaturowych nt. grup fitoskładników zidentyfikowanych w rodzaju *Citrus* L., a także spisu rycin i tabel, które zdecydowanie ułatwiają wyszukiwanie poszczególnych treści w tak obszernej dysertacji. Rozdział 10. rozprawy doktorskiej, zawierający prezentację wyników badań, został w sposób staranny zilustrowany 35 rycinami i 30 tabelami, w których

Doktorantka przedstawił rezultaty kluczowych badań, opatrując każdą z rycin i tabel odpowiednimi objaśnieniami, a także adnotacjami na temat metody oceny statystycznej wyników, poziomu istotności testów, itp. W podsumowaniu, pragnę stwierdzić, że wszystkie uwagi zawarte w akapicie 2.4. oceny recenzenckiej odnoszą się do warstwy edytorskiej tekstu, nie umniejszając rangi naukowej dysertacji doktorskiej.

3. Wnioski końcowe

Przedstawiona do oceny recenzenckiej rozprawa doktorska dowodzi wysokich umiejętności badawczych Autorki w zakresie planowania i prowadzenia kompleksowych, nowoczesnych badań fitofarmakologicznych na modelach doświadczalnych *in vitro* oraz stosowania prawidłowych metod statystycznych w ocenie wyników badań. Badania te zawierają również istotne elementy nowatorstwa naukowego. Dotyczy to szczególnie oryginalnych aspektów prac eksperymentalnych, prowadzonych w ramach oceny aktywności biologicznej olejku z owoców *C. hystrix*, które wskazano w rozdziale 1.2 niniejszej recenzji. Determinują one również wymiar aplikacyjny przeprowadzonych badań, wskazując nowe potencjalne obszary zastosowań dermokosmetycznych i/lub terapeutycznych dla ww. przetworu roślinnego i jego składników.

Powyższe względy upoważniają mnie do stwierdzenia, że przedłożona do oceny dysertacja spełnia wszystkie przyjęte ustawowo kryteria stawiane rozprawom doktorskim, a jednocześnie posiada udokumentowane znamiona nowatorstwa naukowego. Wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie wnioski o dopuszczenie **mgr Magdaleny Kulig** do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie rozprawy doktorskiej, co zawarłam również w odrębnym piśmie skierowanym do Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

Lublin, dn. 31 stycznia 2019 r.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Farmakognozji
z Pracownią Rodzinnych
[Podpis]
dr hab. n. farm. Grażyna Zgórk