

Lublin, 10.03.2017

OPINIA O PRACY DOKTORSKIEJ MGR FARMACJI BARBARY KRÓL-KOGUS

p.t.

**BADANIA SKŁADU CHEMICZNEGO I AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ SUROWCA
KRAJOWEGO *FOENUGRAECI SEMEN***

Recenzja wykonana na wniosek Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji tego Wydziału, **pod kierunkiem Pani dr hab. Mirosławy Krauze-Baranowskiej, prof. nadzw.**

FORMALNA OCENA PRACY

Przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska dotyczy badania składu chemicznego i aktywności biologicznej *Foenugraeci semen* (nasienie kozieradki) pochodzenia krajowego. Praca liczy 289 stron, zawiera 73 ryciny i 25 tabel, opiera się na 629 pozycjach literaturowych. Poza celem pracy składa się z:

- I. Części teoretycznej
- II. Części eksperymentalnej podzielonej na:
 - część A. – badania fitochemiczne oraz
 - część B. – badania aktywności biologicznej
- III. Badań własnych podzielonych analogicznie do poprzedniego rozdziału na dwie części:
 - A. – omówienie wyników badań fitochemicznych oraz
 - B. – omówienie wyników badań aktywności biologicznej
- IV. Wyników i wniosków
- V. Streszczenia w języku polskim i angielskim
- VI. Bibliografii



CEL PRACY, dotyczył analizy jakościowej i ilościowej C-glikozydów flawonowych i saponin steroidowych *Foenugraeci semen* pochodzenia krajowego, a także oceny aktywności biologicznej surowca i występujących w nim metabolitów wtórnych. Dodatkowo postawiono cele cząstkowe umożliwiające realizację celu głównego. Były to:

- optymalizacja warunków ekstrakcji C-glikozydów flawonowych z nasienia kozieradki,
- opracowanie metod analizy jakościowej i ilościowej C-glikozydów flawonowych z użyciem jedno- i dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w sprzężeniu z detektorem z matrycą diodową (DAD) oraz spektrometrem mas (MS),
- przeprowadzenie analizy izoflawonów metodą HPLC-DAD,
- opracowanie metod analizy zespołu saponin steroidowych z użyciem różnych technik chromatograficznych (TLC, HPLC-ELSD, HPLC-MS),
- ocena aktywności przeciwnowotworowej i przeciwdrobnoustrojowej wyciągów, frakcji i pojedynczych związków czynnych z *Foenugraeci semen*.

W CZĘŚCI TEORETYCZNEJ pracy, liczącej 54 strony, znajduje się przegląd stanu wiedzy dotyczącego badanych przez Autorkę zagadnień. Część ta składa się z czterech rozdziałów podzielonych na podrozdziały. Trzy pierwsze rozdziały dotyczą kolejno: charakterystyki botanicznej, składu chemicznego i aktywności biologicznej nasion *Trigonella foenum-graceum* L. Część czwarta omawia stan badań związków flawonoidowych za pomocą dwuwymiarowej chromatografii cieczowej w wersji *heart-cutting* (LC-LC) oraz *comprehensive* (LCxLC).

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA podzielona jest na **część A** dotyczącą badań fitochemicznych (rozpuszczalniki i odczynniki, związki wzorcowe, aparatura i sprzęt, pochodzenie i ekstrakcja materiału roślinnego, analiza chromatograficzna) oraz **część B** dotyczącą badań aktywności biologicznej (cytotoksycznej i przeciwdrobnoustrojowej).

CZĘŚĆ III, CZYLI BADANIA WŁASNE zajmują aż 145 stron, z czego główna **część A**, podzielona na podrozdziały, dotyczy omówienia wyników analizy fitochemicznej. **Część B** to omówienie wyników badań aktywności biologicznej.



Uzyskane rezultaty zostały podsumowane w rozdziale **WYNIKI I WNIOSKI** w postaci 10 wniosków głównych, z których dwa rozwinęto formułując dodatkowo 9 wniosków szczegółowych.

MERYTORYCZNA OCENA PRACY

Kozieradka pospolita *Trigonella foenum-graecum* L. (*Fabaceae*) występuje w stanie naturalnym na terenie Azji i basenu Morza Śródziemnego. Opisana w hinduskiej Ayurwedzie pod nazwą *methi*, kozieradka pospolita od wieków stosowana jest w medycynie azjatyckiej. Jest również popularnym surowcem leczniczym w krajach europejskich. *Foenugraeci semen* posiada monografię w Farmakopei Polskiej X oraz w Farmakopei Europejskiej. Stosowany jest wewnętrznie jako środek odżywczy, wspomagający trawienie i leczniczy w schorzeniach przewodu pokarmowego, chorobie wrzodowej żołądka, stanach zapalnych oraz pomocniczo w terapii cukrzycy; zewnętrznie zaś surowiec stosowany jest w postaci kataplazmów na trudno gojące się rany oraz stany zapalne skóry i tkanki podskórnej. Nasienie kozieradki jest składnikiem coraz większej liczby suplementów diety stosowanych jako pomocnicze w terapii cukrzycy, trądziku oraz jako wzmacniające organizm.

Aktywność biologiczna *Foenugraeci semen* m.in. przeciwzapalna, przeciwcukrzycowa, przeciwdrobnoustrojowa oraz przeciwnowotworowa związana jest z obecnością C-glikozydów flawonowych i saponin steroidowych, które, obok polisacharydów, są dominującymi metabolitami wtórnymi.

Dotychczasowe badania dotyczyły wyłącznie surowca pochodzenia azjatyckiego i afrykańskiego. Wobec wzrastającej popularności nasion kozieradki, bardzo celowe wydaje się podjęcie badań nad składem chemicznym i aktywnością biologiczną tego surowca pochodzenia krajowego. Nasiona kozieradki otrzymano od trzech polskich firm zielarskich. Dla celów analizy porównawczej posłużyły nasiona kozieradki pochodzenia azjatyckiego i afrykańskiego.



Teoretyczna część pracy napisana jest w sposób obszerny i z dużym znanstwem. Jak wspomniano wcześniej, obejmuje aktualny stan wiedzy na temat składu chemicznego i aktywności biologicznej nasion kozieradki pospolitej oraz wykorzystania dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczonej w analizie związków flawonoidowych. Szczególnie dużo uwagi poświęcono przeglądowi literaturowych doniesień na temat składu i zawartości poszczególnych metabolitów wtórnych w nasionach kozieradki uwzględniając metody ich analizy. Dodatkowo przestudiowano doniesienia na temat aktywności przeciwcukrzycowej, hipolipidemicznej, neurologicznej, antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej, immunomodulującej, przeciwbólowej, przeciwdrobnoustrojowej, hormonalnej, przeciw-nowotworowej i cytotoksycznej. Omówiono także wykorzystanie przetworów z *Foenugraeci semen* w leczeniu schorzeń przewodu pokarmowego. Ostatni rozdział części teoretycznej dotyczy analizy związków flawonoidowych za pomocą dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczonej. Omówiono dwie podstawowe techniki *heart-cutting* (LC-LC) oraz *comprehensive* (LCxLC) w trybie pracy *off-line* i *on-line*. W technice *heart-cutting* jedynie część nierozdzielonych składników analizowanej mieszaniny, w formie poszczególnych frakcji z rozdzielania w pierwszym wymiarze, jest przenoszona na kolumnę drugiego wymiaru. Natomiast technika *comprehensive* obejmuje analizę wszystkich składników badanej próbki w dwóch wymiarach. Przedyskutowano wady i zalety poszczególnych wersji, jak też wymagania aparaturowe i możliwe do zastosowania fazy ruchome i stacjonarne. Podano bardzo liczne przykłady literaturowe. Myślę, że dla porównania ogromnej liczby wariantów analitycznych korzystne byłoby umieszczenie ich w tabeli. Z drugiej strony zdaję sobie sprawę, że tabela ogranicza możliwości wnikliwej dyskusji i przedstawienia szczegółów.

W części III (badania własne) zaprezentowano wyniki analizy fitochemicznej *Foenugraeci semen* oraz jego składników. Do badań przeznaczono nasiona kozieradki pochodzenia krajowego od trzech producentów - firm zielarskich Lewandowski, Flos i Kawon. Nasiona krajowe porównano z nasionami kozieradki pochodzenia azjatyckiego i afrykańskiego. W rezultacie przeprowadzonej analizy fitochemicznej opracowano, zoptymalizowano i zwalidowano szereg metod chromatograficznych a także wybrano najlepsze procedury ekstrakcji badanych związków czynnych z surowca.



Ponadto przedstawiono wyniki badań aktywności przeciwnowotworowej i przeciwdrobnoustrojowej surowca oraz zawartych w nim związków czynnych.

Postawione przez Autorkę cele pracy zostały w pełni zrealizowane:

1. Zoptymalizowano warunki ekstrakcji **C-glikozydów flawonowych** z nasienia kozieradki. Wykazano, że spośród zastosowanych metod ekstrakcji (ekstrakcja w klasycznym aparacie Soxhleta, ekstrakcja w automatycznym aparacie Soxhleta, maceracja, ekstrakcja z użyciem mieszadła magnetycznego, sonikacja, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem) najbardziej wydajnym było wytrawianie z użyciem mieszadła magnetycznego, stosując 70% metanol jako ekstrahent (2 x 3 h, 2 x 100ml, temp. 60°C).
2. Opracowano metody analizy jakościowej i ilościowej C-glikozydów flawonowych z użyciem jedno- i dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) w sprzężeniu z detektorem z matrycą diodową (DAD) oraz spektrometrem mas (MS).
3. Opracowano metodę jednowymiarowej (1D) analizy jakościowej HPLC C-glikozydów flawonowych oraz izoflawonów. Zoptymalizowano parametry rozdzielania wybierając jako optymalną kolumnę Kinetex C-18 oraz elucję gradientową o złożonym profilu gradientu. Uzyskano rozdzielanie mieszaniny 7 wzorcowych C-glikozyloflawonów, 5 wzorcowych izoflawonów oraz 15 C-glikozyloflawonów, stanowiących związki czynne wyciągu metanolowego z *Foenugraeci semen*. Wykazano brak izoflawonów w surowcu krajowym. Metoda 1D nie umożliwiła pełnego rozdzielania związków flawonoidowych występujących w wyciągu.
4. Wobec niedoskonałości systemu 1D LC, opracowano systemy 2D LC w technice *comprehensive* (LCxLC) oraz *heart-cutting* (LC-LC) zarówno w trybie *off-line* jak i *on-line*, które umożliwiły rozdzielanie i identyfikację związków flawonoidowych, obecnych w wyciągu metanolowym z *Foenugraeci semen*. System *comprehensive* (LCxLC) umożliwił separację 17 z 20 C-glikozyloflawonów. Rozdzielenia w 1D prowadzono na kolumnie Sphinx C-18-Phenyl z użyciem elucji



izokratycznej, a następnie liniowego gradientu, natomiast w 2D na kolumnie Discovery HS C-18 z użyciem skokowej elucji gradientowej. Natomiast zastosowanie systemu **LC-LC *offline*** pozwoliło na całkowite rozdzielenie C-glikozyloflawonów nasion kozieradki. Rozdzielenia w 1D prowadzono podobnie jak w systemie LCxLC na kolumnie Sphinx C-18-Phenyl z użyciem elucji izokratycznej, a następnie liniowego gradientu, natomiast w 2D C-glikozyloflawony obecne w 9 frakcjach otrzymanych z 1D rozdzielano na kolumnie Kinetex C-18 w eksperymentalnie dobranych dla każdej frakcji warunkach elucji izokratycznej i stosując fazy ruchome o różnych stężeniach mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (20%, 23%, 30%, 32%, 35%, 45%, 50%).

Opracowane metody analizy 1D LC oraz 2D LC z wykorzystaniem detektorów DAD oraz MS pozwoliły na identyfikację w nasieniu kozieradki 17 C-glikozyloflawonów tj.: witeksyny, izowiteksyny, orientyny, izoorientyny, wiceniny-1, wiceniny-2, wiceniny-3, szaftozydu i izoszaftozydu, di-C-(6/8)-heksozylo-pentozydu apigeniny, di-C-(6/8)-pentozydów apigeniny, mono-C-glikozydu apigeniny, estrów p-kumarowych witeksyny i izowiteksyny oraz estrów p-kumarowych orientyny i izoorientyny. Obecność wiceniny-3 oraz izoszaftozydu, a także grupy pięciu di-C-pentozydów apigeniny ujawniono w surowcu po raz pierwszy. Te ostatnie stanowią aż 16% zespołu C-glikozydów flawonowych.

Należy podkreślić, że opracowane metody 2D LC mogą być przydatne w analizie składu chemicznego nasion kozieradki różnego pochodzenia oraz w identyfikacji C-glikozyloflawonów w innych matrycach roślinnych.

5. W celu analizy ilościowej C-glikozyloflawonów opracowano zwalidowaną metodę LC-LC *on-line*, stanowiącą modyfikację opracowanej metody LC-LC *offline*. Rozdzielenia w 1D prowadzono w zoptymalizowanych warunkach elucji gradientowej na kolumnie Kinetex C-18. Natomiast separację nierozdzielonego zespołu związków flawonowych z 1D uzyskano w 2D również na kolumnie Kinetex C-18 o tej samej długości i wielkości ziarna ale większej średnicy w warunkach elucji izokratycznej przy stężeniu 23% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA. Oznaczona zawartość C-glikozyloflawonów wynosiła $14,409 \pm 0,26$ mg/g surowca. Związkami obecnymi w nasionach kozieradki w najwyższym stężeniu były: izowiteksyna ($2,508 \pm 0,50$ mg/g), wicenina-1 ($1,912 \pm 0,15$ mg/g) i witeksyna



(1,782± 0,09 mg/g). Natomiast w mniejszych ilościach występowały: izoorientyna (1,307 ± 0,61 mg/g), izoszaftozyd (1,120 ± 0,46 mg/g) i orientyna (0,994 ± 0,40 mg/g).

6. Analiza LC-DAD-ESI-MS wykazała różnice jakościowe w zespołach C-glikozydów flawonowych w surowcu krajowym w porównaniu do surowców pochodzenia afrykańskiego (Algieria) i azjatyckiego (Turcja), w których ujawniono obecność 4 dodatkowych związków flawonowych, prawdopodobnie dwóch di-C-(6/8)-heksozydów apigeniny oraz dwóch di-C-(6/8)-heksozylo-pentozydów apigeniny.
7. Opracowano warunki analizy zespołu **saponin steroidowych** w nasionach kozieradki t.j.:
 - zoptymalizowano procedury ekstrakcji i hydrolizy kwasowej saponogeniny – diosgeniny,
 - zoptymalizowano parametry separacji TLC (płytki HPTLC Si60 F₂₅₄, faza ruchoma heptan:octan etylu (7:3, v/v), derywatyżacja r-em aldehydu anyżowego o zmodyfikowanym składzie),
 - oznaczono densytometrycznie diosgeninę w komercyjnych krajowych surowcach (metodę zwalidowano),
 - zoptymalizowano warunki rozdzielania saponin steroidowych metodą HPLC w sprzężeniu z detektorami ELSD i MS. Po raz pierwszy w separacji saponin steroidowych z nasienia kozieradki zastosowano dwie połączone szeregowo kolumny Discovery C-18 i elucję gradientową,
 - na podstawie analizy HPLC-ELSD-ESI-MS zidentyfikowano 26 saponin furostanowych, spośród których 24 to wcześniej identyfikowane w *Foenugraeci semen* związki saponinowe. Dominującymi okazały się: protodioscyna oraz trigoneozyd Vb. Natomiast w niższych stężeniach obecne są: trigoneozyd IVa i jego 25R-epimer – glikozyd F, trigoneozyd Va i protoneodioscyna,
 - oznaczono zawartość saponin steroidowych w surowcu krajowym metodą HPLC-ELSD. Wyniosła ona 0,14% i była zbliżona do zawartości tych związków w surowcu pochodzenia afrykańskiego i azjatyckiego (0,20%). Wykazano, że w badanym surowcu dominują pochodne diosgeniny i jamogeniny, z których w wyniku hydrolizy kwasowej uwalniana jest diosgenina. Zawartość saponin steroidowych oznaczona opracowaną

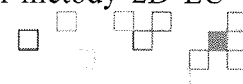


metodą HPLC-ELSD była zbliżona do zawartości diosgeniny oznaczonej w warunkach zwalidowanej metody TLC.

Nie wykazano istotnych różnic w zespole saponin steroidowych surowca krajowego w porównaniu do surowca pochodzenia azjatyckiego i afrykańskiego.

8. Przeprowadzono **ocenę aktywności biologicznej** (cytotoksycznej oraz przeciwdrobnoustrojowej) nasion kozieradki pochodzenia krajowego. Przebadano wyciągi wodne, wodno-alkoholowe oraz frakcję wyciągu metanolowego oraz wybrane związki czynne z grupy C-glikozydów flawonowych, saponin steroidowych oraz alkaloidów. Za pomocą testu MTT i systemu RealTimeXCELLigence w czasie rzeczywistym wykazano, że najsilniejszą aktywnością cytotoksyczną wobec linii komórkowych: raka szyjki macicy HeLa, gruczolakoraka jajnika SKOV-3 oraz białaczki limfoblastycznej MOLT-4 charakteryzowała się, otrzymana z wyciągu metanolowego z nasion kozieradki, frakcja D. Związane jest to z wysoką zawartością C-glikozyloflawonów i saponin steroidowych. Wykazano, że obserwowany efekt cytotoksyczny jest wynikiem indukcji apoptozy, wzrostu aktywności kaspaz 3 i 7, zmian błonowego potencjału mitochondrialnego oraz wzrostu poziomu wolnych rodników w komórkach nowotworowych. Słabszą aktywnością cytotoksyczną charakteryzował się wyciąg 70% metanolu, natomiast najsłabszą - wyciąg wodny. Po raz pierwszy ujawniono aktywność cytotoksyczną jamogeniny oraz tigogeniny wobec linii komórkowych HeLa, SKOV-3 i MOLT-4 oraz diosgeniny wobec linii SKOV-3.
9. Potwierdzono aktywność przeciwdrobnoustrojową badanych wyciągów wobec *Helicobacter pylori* oraz wykazano efekt bakteriobójczy wybranych C-glikozydów flawonowych i saponin steroidowych (najwyższy dla witeksyny - MBC 0,03 mg/ml). Aktywność bakteriobójczą witeksyny wobec *Helicobacter pylori* ujawniono po raz pierwszy. Wykazano też działanie bakteriostatyczne saponin steroidowych - tigogeniny i sarsasapogeniny oraz działanie bakteriobójcze tigogeniny wobec *Staphylococcus aureus*.

Podsumowując należy stwierdzić, że w rezultacie przeprowadzonych badań zbadano skład chemiczny surowca krajowego, przede wszystkim pod względem C-glikozydów flawonowych i saponin steroidowych. Opracowano wiele metod chromatograficznych, w tym metody 2D LC



wymagające bardzo dobrego przygotowania teoretycznego i doświadczenia eksperymentalnego. Dodatkowo mogą one być przydatne w analizie składu chemicznego nasion kozieradki różnego pochodzenia oraz w identyfikacji C-glikozyloflawonów w innych matrycach roślinnych. Przeprowadzono też szeroko zakrojoną ocenę aktywności biologicznej. Na podstawie badań, postawiono następującą tezę:

„Uwzględniając wykazany w surowcu krajowym brak izoflawonów oraz oznaczoną niską zawartość diosgeniny, wydaje się, że nasiona kozieradki pochodzenia krajowego mogą stanowić bardziej bezpieczny surowiec w porównaniu do tego pochodzenia azjatyckiego, w zakresie potencjalnego wpływu na gospodarkę hormonalną i poziomy hormonów płciowych.”

Z obowiązku recenzenta jestem zmuszona zgłosić następujące uwagi:

PYTANIA I KOMENTARZE

1. **Część teoretyczna i doświadczalna nie mają nadanych głównych numerów** t.j. odpowiednio **I** i **II**, podczas gdy rozdział „Badania własne” jest oznaczony cyfrą **III**. Stosowane są one za to w tekście rozprawy np. str. 118 „...według procedury opisanej w punkcie **II.6.1.1.1.**”; „...fazy ruchome S13 i S14, odpowiednio, **II.4.2.2.1....**” „...fazy ruchome G+I, **II.4.2.2.1....**”. Część eksperymentalna podzielona jest na dwie części **A** i **B**, do których to oznaczeń na ogół nie ma odniesień w tekście (patrz: wymienione powyżej przykłady – powinno np. być **II.A.6.1.1.1.**). **Str. 185:** w tekście jest odniesienie do rozdz. **A.II.6.3.1.** W spisie treści rozdział jest oznaczony **A.6.1.3**, a powinno być **II.A.6.1.3**

W rozdziale III brakuje numerów rozdziałów.

Str.8 i 82, tytuł rozdziału 7 części eksperymentalnej **A** **napisany jest inną czcionką** niż tytuły analogicznych rozdziałów.

2. **Odnośniki literaturowe nie są cytowane kolejno**, czyli 1, 2, 3 itd. Pierwsza cytowana pozycja ma numer 229, potem kolejno 368, 589.
3. **Błędy w kolejności rycin i ich odnośników w tekście**, np. str. 28 ryc. 11 jest wymieniona przed ryc. 10; str. 136 ryc. 36 jest wymieniona bezpośrednio po 32; str. 153 ryc. 44 jest wymieniana przed 43. Brakuje odniesienia w tekście dla ryc. 41 i 42 i dla 65-67
4. **Rozdz. 6. Bardzo skomplikowany system oznaczania różnych ekstraktów** może prowadzić do błędów (i prowadzi), np. na str. 186 czytamy:



„W tym celu otrzymano różne wyciągi metanolowe z nasion nieoczyszczonych oraz wstępnie oczyszczonych eterem naftowym (SPP) lub eterem naftowym i chloroformem (SPCh - a powinno być chyba SPPCh) ekstrahowanych metanolem pod chłodnicą zwrotną (50 ml, 2h, 80°C) (otrzymując wyciągi: E, SPPE2, SPChE2, odpowiednio – a powinno być chyba SPPChE2) lub wyczerpująco w aparacie Soxhleta (wyciągi SPPE3 SPChE3, SPPChE, odpowiednio - chyba nie jest odpowiednio do serii E2). ...uzyskując odpowiednio hydrolizaty: E-H SPPE2-H, SPChE2-H, SPPE3-H, SPChE3-H, SPPE3-H, SPPChE-H, UME1-H, UME2-H, UME3-H.”

5. **Str. 70. Ciecz elucyjna** to faza ruchoma i tak powinna być w całym tekście nazywana.
6. **Str. 117, 193. W systemie (układzie) odwróconych (normalnych) faz** to sformułowanie żargonowe. Powinno być w odwróconym (normalnym) układzie faz.
7. Dlaczego do oznaczenia czasu retencji stosowano symbol t_G a nie t_R ?
8. **STR. 232** „...przeprowadzono pomiar poziomu reaktywnych form tlenu (*reactive oxygen species* - ROS) (ryc. 72 i 73). Wykazano, że pod wpływem inkubacji z badaną frakcją D z nasion *T. foenum-graecum* komórek HeLa i SKOV-3 wzrasta poziom wolnych rodników, co świadczy o występowaniu stresu oksydacyjnego...” Reaktywne formy tlenu i wolne rodniki to nie synonimy. ROS mogą być wolnymi rodnikami ale też mogą to być np. cząsteczki ozonu czy H_2O_2 .

NIEŚCISŁOŚCI I NIEJASNOŚCI

1. **Ryc. 3, str. 16.** Nie podano co oznaczają **R1, R2**. Różne sposoby zapisu indeksu 1 i 2 na ryc.3A i ryc.3B.
2. **Str. 17.** „W toku dalszych badań analizowano...” Nie wiadomo jakich badań - własnych czy, jak się domyślam - literaturowych
3. **Str. 24.** „... glikozydy ujawnione w toku badań”. Czyich badań?
4. **Str. 22.** „...atom węgla C-22 charakter spiro”. Co to znaczy?
5. **Str. 22.** „...pochodne...różniące się przede wszystkim rodzajem”. Co to znaczy?
6. **Str.41.** Brakuje informacji na temat preparatu **INDO1**.
7. **Str. 43 i 44,** „... w modelu obrzęku łapy...”. Czyjej łapy?



8. **Str. 51.** Jak to możliwe, że badany ekstrakt w st. 15 µg/ml hamował proliferację użytych linii komórkowych, a w st. 10 µg/ml powodował całkowitą eliminację komórek nowotworowych tych samych linii?
9. **Str. 69.** Brakuje opisu komory **Chropa** (gł. producenta).
10. **Rozdz. II.A.4.1.4.1.** Korzystne byłoby podanie pełnych przepisów odczynników wywołujących.
11. **Rozdz. II.A.7.1.1.2.** „Badany wyciąg (10 kropli)...” O jakim wyciągu mowa?
12. **Rozdz. II.A.7.3.1.1.3.** Co to jest **Migas device**?
13. **Rozdział B 1.5, str. 94.** Dlaczego ponownie przygotowano wyciągi (A-D) a nie wykorzystano wcześniejszych ekstraktów?
14. **Str. 95.** „Do 4 ml zawiesiny komórkowej dodano 0,4% roztwór błękitu tryptanu w stosunku 1:1”. R-r błękitu w czym, stos. 1:1 zawiesiny do r-ru?
15. **Rozdz. B 1.9.1.2-4., str. 97, 98.** Co znaczy **1x stężony bufor**?
16. **Ryc. 24, 25.** Brak prawidłowego opisu osi: chromatogramów i profili gradientu.
17. **Str. 179., tab. 14.** R_s dotyczy 2 plamek (pasm) a nie tylko pasma diosgeniny.
18. **Str. 217. HPLC-LLD.** Brak wyjaśnienia skrótu. Czy chodzi o light diffusion detector?
19. **Ryc. 72. Wykresy A-E:** co oznaczają kolory czerwony i niebieski? **Wykres F:** co to są komórki ROS?

BŁĘDY

1. **Str. 56. Frakcja jest zagęszczana.** Powinno być – zateżzana.
2. **Str. 46. Jest: Gramm(+) oraz Gramm(-).** Powinno być Gram(+) oraz Gram(-).
3. **Str. 62. Jest: wyciąg wodny z LDX.** Powinno być LXD.
4. **Str. 69. Jest: Komora ACD 2.** Powinno być ADC 2. Podobny błąd na str. **167 i 188.**
5. **Rozdz. II.A.4.1.1. Str. 71, 72 (podobnie 7.1.1.1. czy 7.3.1.1.2, str. 168).** Nazwy płytek TLC powinny być ujednolicone np. Kieselgel/ Silicagel, RP-18/C-18. Producentem płytek Adamant jest Macherey-Nagel, Niemcy (a nie Merck).
6. **Ryc. 15** odnosi się do **tab. 7** a nie do **tab. 5**
7. **Str. 115** Błąd w numeracji orientyny (**3 lub 4?**).
8. **Str. 120. ...na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 µm)... (Ryc. 26).** W podpisie tej ryciny jest Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 µm)
9. **Str. 147. W tekście jest odniesienie do ryc. 38-2;** powinno być do **38-4.**



10. **Str. 148.** Frakcje "puste" (brak Cglikozydów flawonowych, to frakcje **IV'** i **X'** a nie **V'** i **X**. Powinno tu być też odniesienie do ryc. 39
11. **Str. 149.** Powinno być sorpcji jest **adsorpcji**.
12. **Str. 164. Jest:...w trybie jonów ujemnych;** powinno być: dodatnich.

Powyższe uwagi oraz dodatkowo inne drobne usterki, jak literówki czy przejęzyczenia, zostały naniesione w tekście rozprawy i w ten sposób przekazane Doktorantce. Mam nadzieję, że uwagi te będą przydatne w dalszej karierze naukowej Doktorantki, do której ma niewątpliwie predyspozycje. Muszę też podkreślić, że powyższe uwagi nie wpływają na wartość pracy, której eksperyment został świetnie zaplanowany i z sukcesem zrealizowany.

Praca jest bardzo estetyczna, na dużym poziomie edycyjnym. Sposób prezentacji, omówienia i dyskusji wyników świadczy o dojrzałości naukowej. Autorka wykazała bardzo dobre teoretyczne jak i praktyczne przygotowanie do realizacji podjętego przez nią zadania. Realizacja celu postawionego przez Doktorantkę wymagała dobrze zaplanowanej i wykonanej pracy eksperymentalnej, a opracowanie wyników systematyczności, cierpliwości oraz wiedzy. Wyniki są przedstawione logicznie, klarownie i szczegółowo. Wszystkie dokonania są dyskutowane/porównywane z doniesieniami literaturowymi. Badania cechują się oryginalnością, nowatorstwem oraz mogą mieć praktyczne zastosowanie.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska mgr Barbary Król - Kogus spełnia wymagania Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2016 r. poz. 882, 1311), ponieważ zawiera oryginalne rozwiązania postawionego problemu naukowego, wskazuje na posiadanie przez autora wymaganej wiedzy teoretycznej i umiejętności jej praktycznego wykorzystania.

Dlatego też wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Barbary Król - Kogus do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Będąc pod wrażeniem wysokiej wartości merytorycznej przedstawionej rozprawy doktorskiej wnioskuję też o jej wyróżnienie.

Dr hab. Irena Choma, prof. nadzw. UMCS

