

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr farm. Ramony Figat pt.

„Ocena działania antygenotoksycznego wyciągów i związków czynnych występujących w wybranych gatunkach roślin z rodzin Boraginaceae i Araliaceae”

jako podstawa uzyskania stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Praca została wykonana w Zakładzie Badania Środowiska na Wydziale Farmaceutycznym, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem promotora - prof. dr hab. n. farm. Grzegorza Nałęcz-Jaweckiego.

Podstawa prawna wykonania recenzji: art. 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz o przepisach zmieniających ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669).

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do recenzji dysertacja stanowi spójny tematycznie cykl trzech współautorskich prac oryginalnych opublikowanych w latach 2020-2022 w czasopismach z listy JCR o łącznym współczynniku oddziaływania (IF 5-letni) równym 12,18 i sumie punktów MEiN równej 320 oraz jednej pracy przeglądowej opublikowanej w Biuletynie Wydziału Farmaceutycznego WUM. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż Doktorantka w trzech pracach (dwóch oryginalnych i publikacji poglądowej) jest pierwszym autorem, natomiast w jednej pracy badawczej, jest drugim autorem oraz autorem korespondencyjnym.

Cykl czterech wybranych publikacji Doktorantka poprzedziła zwięzłym i bardzo syntetycznym opisem, który obejmuje spis treści, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wraz z podaniem ich punktacji MEiN oraz 5-letnim IF, a także: informację dotyczącą źródła finansowania wykonanych badań, streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, wstęp teoretyczny, cel pracy, opis metodyki badań, omówienie wyników, pięć wniosków końcowych oraz bibliografię. Całość wydruku liczy 14 stron maszynopisu i stanowi logiczne podsumowanie załączonych jako rozprawa doktorska publikacji. Do każdej z nich Doktorantka dołączyła oświadczenia wszystkich współautorów, w których precyzyjnie określono charakter udziału poszczególnych osób w ich powstanie, co pozwala uznać wiodący wkład mgr Ramony Figat. Złożone przez pozostałych współautorów oraz promotora oświadczenia jednoznacznie wskazują, że Doktorantka odegrała kluczową rolę

w zaplanowaniu eksperymentów dotyczących pracy doktorskiej, w tym szczególnie oceny właściwości antygenotoksycznych i antyfotogenotoksycznych związków czynnych w wybranych do badań roślinach. Ponadto Autorka dokonała analizy i interpretacji uzyskanych wyników oraz miała znaczący udział w finalnym przygotowaniu wszystkich manuskryptów.

Tytuł rozprawy doktorskiej w pełni odpowiada tematyce załączonych publikacji. Metodyka badawcza i wyniki zawarte w publikacjach oryginalnych składających się na dysertację pod względem merytorycznym nie budzą jakichkolwiek zastrzeżeń, zresztą zostały już wcześniej pozytywnie ocenione przez niezależnych recenzentów branżowych czasopism z listy JCR. Dodatkowo załączona przez Doktorantkę do cyklu praca poglądowa stanowi spójne uzupełnienie publikacji oryginalnej numer 2 i świadczy o znakomitej znajomości tematyki badawczej, a także umiejętności wyboru bardzo licznej w tym zakresie literatury naukowej.

Uzasadnienie podjętej tematyki oraz ocena merytoryczna pracy

Zanieczyszczenie środowiska naturalnego w skali globalnej przez związki toksyczne, które mogą działać mutagennie/i lub genotoksycznie, a w konsekwencji często kancerogennie sprawia, że obserwuje się wzrost zainteresowania suplementami roślinnymi, które mogłyby takim efektem przeciwdziałać. Należy pamiętać, że bardzo wiele trucizn środowiskowych, na które narażona jest nieświadoma zagrożenia populacja generalna to m.in. związki chemiczne, które często działają rakotwórczo. Tak więc poszukiwanie łatwo dostępnych związków naturalnych, które byłyby bezpieczne i jednocześnie posiadały zdolność zapobiegania uszkodzeniom DNA stanowi bardzo dobre uzasadnienie do podjęcia tematyki pracy doktorskiej przez Panią mgr Ramonę Figat.

Doktorantka dzięki owocnej współpracy nawiązanej z Zakładem Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych podjęła się zbadania czy wyciągi z roślin leczniczych z rodziny Boraginaceae i Araliaceae pochodzących z hodowli *in vitro* posiadają potencjał antygenotoksyczny. Aby zrealizować ten ambitny cel badawczy Doktorantka postanowiła skrupulatnie zweryfikować i udowodnić pięć zaproponowanych hipotez badawczych. Założyła, że za potencjał antygenotoksyczny wyciągów z roślin z rodziny Boraginaceae odpowiadają naftochinony tj. acetyloszikonina i szikonina, natomiast za działanie antygenotoksyczne i antyfotogenotoksyczne wyciągów z pędów *Polyscias filicifolia* z rodziny Araliaceae odpowiadają głównie kwasy fenolowe. Doktorantka postanowiła także dowieść, że na aktywność

antygenotoksyczną wyciągów z pędów *Polyscias filicifolia* korzystnie wpływa proces elicytacji zastosowany podczas procesu hodowli, a także, że wyciągi z korzeni włośnikowatych *Polyscias filicifolia* posiadają właściwości obniżające genotoksyczność i fotogenotoksyczność, a ich bezpieczeństwo jest porównywalne do wyciągów z pędów.

W pierwszym etapie badań Doktorantka oceniła właściwości antygenotoksyczne acetyloszikoniny i szikoniny, a następnie zbadała właściwości wyciągów z pędów oraz korzeni włośniczkowych *Polyscias filicifolia* oraz wybranych kwasów fenolowych (tj. chlorogenowego, kawowego i ferulowego), które według Niej są za to działanie odpowiedzialne. Doktorantka oceniła następnie toksyczność badanych wyciągów oraz wytypowanych związków na podstawie oceny potencjału genotoksycznego i cytotoksycznego. Jest to właściwy tok postępowania, ponieważ jeśli jakaś substancja miałaby być wykorzystywana w przyszłości prewencyjnie, to trzeba mieć pewność, że sama jest bezpieczna i nie wykazuje działania toksycznego. Aby zrealizować zaplanowane badania Doktorantka wykorzystwała panel dobrze dobranych testów: krótkoterminowy test bakteryjny *umu*-test, test mikrojądrowy *in vitro* oraz typowe testy cytotoksyczności (MTT, LDH, NRU), które przeprowadziła na linii komórkowej V79 (prawidłowe fibroblasty płucne chomika chińskiego) z zastosowaniem kilku klasycznych substancji mutagennych.

Wyniki badań przedstawione w publikacji pierwszej (PB1) pt.: „Cytotoxicity and antigenotoxicity evaluation of acetylshikonin and shikonin”, chociaż potwierdziły hipotezę, że zarówno szikonina, jak i acetyloszikonina posiadają aktywność antygenotoksyczną, to niestety same także wykazują potencjał genotoksyczny, co wyklucza ich zastosowanie w chemoprewencji. Doktorantka słusznie jednak postuluje, że obiecującym kierunkiem badań dla tych związków może być w przyszłości ich potencjalne zastosowanie w terapii onkologicznej. W publikacji drugiej (PB2) pt.: „Antigenotoxic, anti-photogenotoxic, and antioxidant properties of *Polyscias filicifolia* shoots cultivated *in vitro*” Doktorantka przedstawiła wyniki badań, pozwalające na weryfikację kolejnych trzech hipotez badawczych pracy doktorskiej. Na szczególne podkreślenie zasługuje element innowacyjności tych badań dotyczący zastosowania wyciągów z roślin hodowanych *in vitro* (pędów *P. filicifolia*) z zastosowaniem elicytacji oraz wykonanej po raz pierwszy oceny ich działania antygenotoksycznego i antyfotogenotoksycznego. Doktorantka udowodniła, że wyciągi z pędów *P. Filicifolia* rzeczywiście wykazują potencjał antygenotoksyczny i antyfotogenotoksyczny oraz - co szczególnie istotne - są

bezpieczne. Wyniki badań przedstawione przez Doktorantkę w tej pracy pozwalają także uznać za słuszne, że za działanie antygenotoksyczne i antyfotogenotoksyczne testowanych ekstraktów odpowiadają prawdopodobnie kwasy fenolowe, co zostało potwierdzone analizą chemiczną z zużyciem techniki UPLC-DAD-MS/MS. Doktorantka potwierdziła, że najbardziej aktywny wyciąg zawierał pochodne kwasu ferulowego i chlorogenowego. Wyższą aktywność wyciągów bogatych w kwasy fenolowe niż wyizolowanych i oczyszczonych pojedynczych związków, Doktorantka tłumaczy efektem synergistycznym różnych substancji zawartych w roślinach, które działają w tych samych lub uzupełniających się mechanizmach. Jest to oczywiście prawdopodobne, ale bez wykonania kolejnych badań, wyniki przedstawione w pracy tylko częściowo potwierdzają hipotezę czwartą, co zresztą Doktorantka krytycznie przeanalizowała w dyskusji omawianej publikacji. Tematyka potencjału antygenotoksycznego oraz bezpieczeństwa kwasów fenolowych została kompleksowo opisana przez Doktorantkę w oparciu o dobrze wybrane pozycje światowej literatury w publikacji przeglądowej (PP1) pt.: „Kwasy fenolowe jako związki o potencjale antygenotoksycznym występujące w roślinach leczniczych i jadalnych.”

W trzeciej pracy oryginalnej (PB3) pt.: „*Polyscias filicifolia* (Araliaceae) hairy roots with antigenotoxic and anti- photogenotoxic activity” zostały przedstawione wyniki badań, potwierdzające słuszność ostatniej z hipotez postawionych w pracy doktorskiej przez Panią Magister. Istotnym elementem innowacyjnym tych badań było potwierdzenie potencjału antygenotoksycznego i antyfotogenotoksycznego wyciągów z korzeni transformowanych *P. filicifolia* pochodzących z różnych wariantów hodowli oraz fakt, że badane wyciągi - podobnie jak wyciągi z pędów nadziemnych - są bezpieczne (nie wywołują działania cytotoksycznego i genotoksycznego). Wyniki badań opublikowane w tej pracy są bardzo obiecujące, ponieważ mogą posłużyć do określenia najlepszych warunków hodowli pozwalających otrzymywać korzenie najbardziej bogate w aktywne związki antygenotoksycznie, co może zostać wykorzystane praktycznie.

Oceniając badania przeprowadzone przez Panią mgr Ramonę Figat w ramach realizacji pracy doktorskiej, których wyniki zostały opublikowane w trzech wyżej wymienionych pracach oryginalnych i jednej pracy przeglądowej, z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że cel badawczy pracy doktorskiej został przez Doktorantkę w pełni zrealizowany. Chciałabym także podkreślić Jej znaczącą samodzielność naukową i umiejętność wyciągania poprawnych wniosków z przeprowadzonych badań. Pod względem merytorycznym przedstawione wyniki nie budzą

żadnych wątpliwości i jednocześnie pozwalają stwierdzić, że podjęte badania były w pełni uzasadnione, prawidłowo zaplanowane i pod względem metodycznym prawidłowo zrealizowane. Przeprowadzone badania stanowią istotne uzupełnienie dostępnego piśmiennictwa światowego, a aplikacyjny charakter wyników badań stanowi solidną podstawę do kontynuowania tej tematyki badawczej. Nie wnoszę uwag krytycznych.

Podsumowując, praca doktorska **mgr farm. Ramony Figat pt. „Ocena działania antygenotoksycznego wyciągów i związków czynnych występujących w wybranych gatunkach roślin z rodzin Boraginaceae i Araliaceae”** stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jak również wnosi istotne aspekty nowości w ramach rozwoju reprezentowanej dyscypliny naukowej **nauk farmaceutycznych**.

Dysertacja spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim wynikające z art. 13 ust. 2 *Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.: Dz. U. 2017, poz. 1789), dlatego wnoszę do **Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr farm. Ramony Figat do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie ze względu na wysoki poziom merytoryczny pracy doktorskiej, szeroki zakres wykonanych badań, ich interdyscyplinarność oraz fakt, że wyniki zostały opublikowane jako trzy prace oryginalne w renomowanych i uznanych czasopismach z listy JCR (*Drug and Chemical Toxicology* (IF 5-letni = 3,356; 40 pkt. MEiN) oraz *Molecules* (IF 5-letni = 4,412; 140 pkt. MEiN), co oznacza, że praca przeszła skrupulatny proces recenzji i uzyskała uznanie ekspertów międzynarodowych **wnoszę do Wysokiej Rady wniosek formalny o wyróżnienie pracy.**

