

dr hab. n. farm. Bartosz Wielgomas, prof. uczelni

Gdańsk, 20.06.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Ramony Figat,
pt.: „Ocena działania antygenotoksycznego wyciągów i związków czynnych
występujących w wybranych gatunkach roślin z rodzin *Boraginaceae* i
Araliaceae”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Badania Środowiska Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr. hab. Grzegorza Nałęcz-Jaweckiego.

Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn śmiertelności we współczesnych społeczeństwach. Wśród czynników ryzyka powstawania i rozwoju chorób nowotworowych wymienia się czynniki środowiskowe zarówno chemiczne fizyczne jak i biologiczne. Za inicjację procesu nowotworzenia mogą odpowiadać zarówno czynniki oddziałujące poprzez genotoksyczne jak i niegenotoksyczne mechanizmy działania. Poza poszukiwaniem substancji leczniczych, które mogą w skuteczny i bezpieczny sposób hamować rozwój istniejącego już nowotworu dużą uwagę przykładana się także do profilaktyki chorób nowotworowych, w tym poszukuje się substancji, które mają zdolność do zmniejszania siły działania substancji genotoksycznych.

Czynniki środowiskowe, co do których dysponujemy dowodami na działanie rakotwórcze u zwierząt laboratoryjnych lub u człowieka, oddziałują poprzez różne mechanizmy molekularne zarówno bezpośrednie jak i pośrednie o progowej i bezprogowej zależności pomiędzy dawką i efektem biologicznym. Ta złożoność zjawisk stanowi istotną trudność w badaniu zarówno genotoksyczności jak i rakotwórczości. Jak dotychczas nie opracowano jednej, uniwersalnej metody szacowania potencjału genotoksycznego substancji chemicznych i konieczne jest wykorzystywanie w tym celu tzw. baterii testów, w której każdy z testów jest w stanie wykryć inny rodzaj uszkodzeń lub identyfikować odrębny mechanizm działania. Podobne problemy dotyczą jednocześnie metodologii badania potencjału antygenotoksycznego.

Surowce roślinne o wielowiekowej tradycji stosowania przez różne społeczności na świecie mają istotne znaczenie w poszukiwaniu nowych substancji czynnych, również ze wsparciem przez nowoczesne metody biotechnologiczne, zdolne do zwiększenia produkcji wybranych substancji czynnych w warunkach roślinnych kultur tkankowych.

Podjęty przez Doktorantkę temat: „Ocena działania antygenotoksycznego wyciągów i związków czynnych występujących w wybranych gatunkach roślin z rodzin *Boraginaceae* i *Araliaceae*”, to odpowiedź na aktualne zapotrzebowanie na wiedzę w zakresie entofarmakologii.

Rozprawa ma formę wydruku komputerowego, składającego się zasadniczo z dwóch części. Pierwsza obejmuje 8 stronicowe podsumowanie, w którym przedstawiono w sposób bardzo syntetyczny: wstęp teoretyczny, cel pracy, metody badań, omówienie wyników, wnioski końcowe i bibliografię. Druga część to wydruki publikacji, które są wynikiem projektu doktorskiego. Do każdej z publikacji załączone są oświadczenia współautorów określające udział w ich powstaniu. Z oświadczeń jednoznacznie wynika, że rola Doktorantki w powstaniu tych prac jest wiodąca.

W skład przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej wchodzi trzy prace oryginalne opublikowane w latach 2020-2022 w czasopiśmie o współczynniku oddziaływania Impact Factor od 3,356 do 4,412.

1. **Figat R**, Zgadzaj A, Geschke S, Siczka P, Pietrosiuk A, Sommer S, Skrzypczak A. Cytotoxicity and antigenotoxicity evaluation of acetylshikonin and shikonin. *Drug Chem Toxicol.* 2021 Mar;44(2):140-147. doi: 10.1080/01480545.2018.1536710.
2. Śliwińska A, **Figat R**, Zgadzaj A, Wileńska B, Misicka A, Nałęcz-Jawecki G, Pietrosiuk A, Sykłowska-Baranek K. Polyscias filicifolia (Araliaceae) Hairy Roots with Antigenotoxic and Anti-Photogenotoxic Activity. *Molecules.* 2021 Dec 29;27(1):186. doi: 10.3390/molecules27010186.
3. **Figat R**, Śliwińska A, Stochmal A, Soluch A, Sobczak M, Zgadzaj A, Sykłowska-Baranek K, Pietrosiuk A. Antigenotoxic, Anti-photogenotoxic, and Antioxidant Properties of Polyscias filicifolia Shoots Cultivated In Vitro. *Molecules.* 2020 Feb 28;25(5):1090. doi: 10.3390/molecules25051090.

Czwartą pracą będącą składową niniejszej rozprawy doktorskiej jest publikacja przeglądowa, która ukazała się w Biuletynie Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w 2021 roku.

4. **Figat R**, Świątek A, Nałęcz-Jawecki, G (2021). Kwasy fenolowe jako związki o potencjale antygenotoksycznym występujące w roślinach leczniczych i jadalnych. Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. 2021, 4, 28-41.

Łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor przedłożonych publikacji wynosi 12,180 oraz 340 punktów ministerialnych. We wszystkich przedłożonych pracach Doktorantka jest autorką korespondującą, w trzech jest pierwszą autorką, a w jednej drugą.

Badania opisane w ramach rozprawy doktorskiej zostały przeprowadzone dzięki finansowaniu z grantu dla młodych badaczy Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Ocena rozprawy

Zainteresowanie poszukiwaniem związków farmakologicznie czynnych w oparciu o przesłanki etnofarmakologiczne jest jednym z nurtów badawczych współczesnej farmacji. W przypadku wielu surowców roślinnych, wyciągów z nich uzyskiwanych, czy w końcu pojedynczych izolowanych substancji obserwuje się działanie zmniejszające wpływ substancji genotoksycznych na liczbę i charakter uszkodzeń DNA. Identyfikacja takich surowców czy substancji jest niezwykle pożądana z punktu widzenia prewencji chorób nowotworowych. Jako jeden z głównych kierunków działania przeciwnowotworowego uznaje się zapobieganie uszkodzeniom oksydacyjnym DNA. Wiele z grup substancji powszechnie występujących w surowcach roślinnych wykazuje silne lub nawet bardzo silne działanie przeciwutleniające (głównie związki o budowie polifenoli, flawonoidy etc.) i dlatego przypisuje się im działanie przeciwnowotworowe.

Przedmiotem pracy była ocena właściwości antygenotoksycznych wyciągów oraz izolowanych substancji czynnych z wybranych gatunków roślin z rodzin *Boraginaceae* i *Araliaceae*. Cele badań zostały zawarte w 5 hipotezach, które dotyczyły: oceny potencjału antygenotoksycznego i ocenie przydatności szikoniny i acetyloszikoniny; oceny potencjału antygenotoksycznego i selektywności wyciągów z pędów *Polyscias filicifolia*; oceny skuteczności elicytacji w zwiększaniu potencjału antygenotoksycznego wyciągów z *P. filicifolia*; weryfikacji

działania antygenotoksycznego i antyfotogenotoksycznego kwasów fenolowych zawartych w wyciągach *P. filicifolia* oraz oceny podobnych właściwości ekstraktów uzyskiwanych z kultur korzeni włośnikowatych *P. filicifolia*.

Do realizacji zadań badawczych Doktorantka wykorzystwała bakteryjne testy genotoksyczności, testy *in vitro* z wykorzystaniem linii komórek ssaczych (fibroblasty płucne chomika chińskiego V79) oraz testy cytotoksyczności: MTT, LDH i NRU. Potencjał antygenotoksyczny badano poprzez porównanie wielkości uszkodzeń materiału genetycznego przez modelowe substancje genotoksyczne (tj. cyklofosfamid, klinofloksacyna, metanosulfonian metylu, 2-aminoantracen, mitomycynę czy *N*-tlenek-4-nitrochinoliny) w obecności i nieobecności substancji testowanych. Dodatkowo dla substancji wymagających aktywacji metabolicznej stosowano preinkubację w obecności frakcji S9 wątroby.

Ze względu na różnorodne mechanizmy działania genotoksycznego, ocena tego działania powinna odbywać się w wykorzystaniu kilku testów zdolnych do wykrycia innych uszkodzeń materiału genetycznego. Zatem podejście, w którym zastosowano bakteryjny *umu*-test oraz test mikrojądrowy w komórkach ssaczych jest prawidłowe. Należy jednak podkreślić, że aktualnie test Ames z użyciem 5 szczepów *Salmonella typhimurium* jest uznanym modelem testowania genotoksyczności substancji leczniczych jak i zanieczyszczeń w substancjach czynnych i produktach leczniczych. W związku z powyższym pojawia się zatem pytanie o porównywalność wyników uzyskanych przez Doktorantkę z wynikami testu Ames.

Ekstrakty roślinne uzyskano we współpracy z pracownikami Zakładu Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego WUM. Niektóre czyste substancje czynne pochodziły ze źródeł komercyjnych, natomiast np. acetyloszikonina wyizolowana została we wspomnianej jednostce naukowej z materiału roślinnego.

Jako bardzo wartościowe uznaję przeprowadzenie analiz fitochemicznych ekstraktów z kultur korzeni włośnikowatych z zastosowaniem techniki HPLC-PDA-ESI-MS. Jakościowa i ilościowa analiza ekstraktów umożliwia wskazanie składników potencjalnie odpowiedzialnych za określony kierunek działania. Doktorantka w oparciu o tego rodzaju analizy wykazała, że to właśnie wybrane składniki ekstraktów (kwasy fenolowe, przede wszystkim pochodne kwasu ferulowego i chlorogenowego) są odpowiedzialne za działanie antygenotoksyczne.

Przeprowadzone badania pozwoliły Doktorantce na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Szikonina i jest acetylowa pochodna są cytotoksyczne względem komórek V79, Potencjał antygenotoksyczny obu substancji jest zależny od rodzaju substancji indukującej uszkodzenia materiału genetycznego. Doktorantka w pracy PB2 wskazuje, że acetyloszikonina mogłaby być stosowana w kombinacji z lekami cytostatycznymi (np. cyklofosfamidem) w celu redukcji działań niepożądanych. Czy nie przyczyniłoby się to jednak to zmniejszenia efektu terapeutycznego?
- Wyciągi z pędów oraz kultur korzeni włośnikowatych *P. filicifolia*, były dobrze tolerowane przez komórki prawidłowe i nie były genotoksyczne. Wykazywały natomiast efekt antygenotoksyczny, za co mogą odpowiadać związki fenolowe, których zawartość korelowała z aktywnością biologiczną.
- Kwasy fenolowe z kolei nie wykazywały działania antygenotoksycznego. Działanie antygenotoksyczny wyciągu może zatem być konsekwencją działania synergistycznego wielu składników ekstraktu.
- Elicytacja okazała się skuteczną metoda modulacji zawartości substancji czynnych, wpływając bezpośrednio na aktywność biologiczną uzyskiwanych wyciągów i może być potencjalnym kierunkiem dalszych badań.

Wnioski te są skonstruowane poprawnie i wsparte wynikami badań.

Nie dostrzegłem w rozprawie uchybień, które wymagałyby ich omówienia w recenzji.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa to spójny tematycznie zestaw publikacji, w których Doktorantka przedstawiła rozwiązanie problemu naukowego. Należy podkreślić, że podjęła się trudnego zadania, gdyż: nie ma jednoznacznych metod badawczych do testowania potencjału antygenotoksycznego a złożoność składu wyciągów roślinnych i ich zmienność w zależności od fazy rozwoju rośliny, miejsca i warunków uprawy powodują, że w literaturze często znajduje się sprzeczne wyniki badań tego samego surowca. Z tego względu uważam, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę, wnoszą wiele aspektów poznawczych w kontekście działań chemoprewencyjnych substancji pochodzenia roślinnego i z pewnością zyskają

zainteresowanie środowiska naukowego, co znajdzie odbicie w liczbie cytowań publikacji, powstałych w ramach niniejszego doktoratu.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr farm. Ramony Figat do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie w związku z faktem opublikowania wyników rozprawy doktorskiej w postaci publikacji oryginalnych w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach oraz wysoką wartość naukową przeprowadzonych badań wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Ramony Figat.

