

Bydgoszcz, dn. 12.02.2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr farm. Lidii Mielczarek

Biologiczne interakcje Selolu 5% z izotiocyjanianami

wykonanej w Katedrze Farmacji Fizycznej i Bioanalizy

Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

oraz w

Zakładzie Biotechnologii Leków i Bioinformatyki

Narodowego Instytutu Leków

pod kierunkiem **dr hab. n. farm. Piotra Suchockiego**

i **dr hab. n. med. Katarzyny Wiktorskiej** jako promotora pomocniczego

Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn śmiertelności i prognozuje się, że zachorowalność na nowotwory będzie wzrastać. Według danych do 2025 r. liczba chorych na nowotwory w Polsce wzrośnie do ok. 175 tysięcy. Wysoka zachorowalność stanowi wyzwanie dla naukowców do poszukiwania nowych, skutecznych struktur chemicznych o potencjale przeciwnowotworowym. Jednym ze źródeł takich struktur jest natura. Związki pochodzenia roślinnego i/lub ich pochodne są od lat stosowane w prewencji i leczeniu chorób nowotworowych. Ponad 60% leków przeciwnowotworowych jest strukturami pierwotnie zidentyfikowanymi w świecie roślin. Do najbardziej znanych należą alkaloidy barwinka (*Catharanthus roseus* G. Don) czy cisa krótkoigłowego (*Taxus brevifolia* Nutt.).

Obiecującą grupę związków pochodzenia roślinnego o potencjale przeciwnowotworowym stanowią izotiocyjaniany (ITC). Izotiocyjaniany są związkami charakterystycznymi głównie dla rodziny *Brassicaceae*. Najbardziej znanymi

przedstawicielami tej grupy są sulforafan (SFN), izotiocyjanian allilu i izotiocyjanian fenylu. Są to związki wykazujące działanie m.in. przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe.

Badania Doktorantki są kontynuacją działalności naukowej od lat prowadzonej w Katedrze Farmacji Fizycznej i Bioanalizy, dotyczącej modyfikacji struktur chemicznych m.in.: pochodzenia roślinnego, celem nadania im właściwości przeciwnowotworowych. Jednym z osiągnięć naukowych było opracowanie związku selenu, znanego pod nazwą komercyjną jako Selol (Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej, patent nr PL. 176530; data wydania decyzji 1999-01-06, typ decyzji: Prawo wyłączne). W świetle przedstawionych prac naukowych zasadne jest podjęcie przez Doktorantkę badań nad oceną *in vitro* przeciwnowotworowego działania pochodnych izotiocyjanianów (ITC) w kombinacji z cytostatykami oraz selolem.

Podstawę ocenianej pracy stanowi monograficzny zbiór ośmiu prac, w tym cztery artykuły opublikowane w czasopismach naukowych, dwa patenty i dwa zgłoszenia patentowe. Trzy z nich to oryginalne artykuły naukowe, w tym dwa zamieszczone w czasopismach posiadających współczynnik oddziaływania (PLOS ONE IF 2,806; ChemMedChem IF 3,225). Jedna praca przeglądowa opublikowana w Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research (IF 0,531). Sumaryczny współczynnik oddziaływań prac zgłoszonych do nadania stopnia doktora wynosi IF 6,562, co stanowi 85 pkt. MNISW. Średni procentowy udział magister Lidii Mielczarek w powstaniu cyklu monograficznego wynosi: dla publikacji 44, dla patentów 20,5, dla zgłoszeń patentowych 30. Należy dodać, że w dwóch pracach eksperymentalnych, pracy przeglądowej, a także we wspomnianych zgłoszeniach patentowych (P.427216; P.426879) Doktorantka jest pierwszym współautorem. Fakt ten, jest dowodem na duże zaangażowanie i wyraża ogromny nakład pracy pani Lidii Mielczarek, od początkowej fazy planowania doświadczeń i stawiania hipotez, aż do wykonania pracochłonnych etapów badań, m.in. biologicznych badań *in vitro*.

Rozprawa doktorska jest opracowaniem liczącym 270 stron, w strukturze pracy możemy wyróżnić wprowadzenie, założenia i cel pracy, materiały i metody badawcze, omówienie wyników, podsumowanie, wnioski oraz aneks zawierający prace będące podstawą rozprawy doktorskiej. Ponadto streszczenie rozprawy w języku polskim, angielskim, piśmiennictwo i krótki opis aktywności naukowej magister Lidii Mielczarek.

W części teoretycznej Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała selen i jego potencjalne wykorzystanie w terapiach przeciwnowotworowych, opisała selol z uwzględnieniem jego odkrycia, ochrony patentowej i przeglądu dostępnych badań odnośnie aktywności biologicznej. Doktorantka dokonała opisu izotiocyjanianów, terapii kombinowanej i jej zalet w leczeniu chorób nowotworowych. Przedstawiła najczęściej stosowane połączenia związków roślinnych, takich jak genisteina, resweratrol czy kurkumina z cytostatykami. Zawarła tu także przegląd literatury przedmiotu na temat współdziałania izotiocyjanianów z lekami cytostatycznymi. Piśmiennictwo w pracy stanowi 178 pozycji, większość powstała w ciągu ostatnich 10 lat.

Cel pracy, a więc uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy selol i modyfikowane izotiocyjaniiny działają cytotoksycznie, został sformułowany w sposób czytelny i logiczny. Cel nadrzędny został osiągnięty poprzez realizację celów podrzędnych, uwzględniających określenie cytotoksycznego wpływu selolu i izotiocyjaniinów na wybrane linie komórkowe prawidłowe i nowotworowe (HT-29, CRL-1790, MCF-7, MDA-MB-231, MALME3M), z określeniem interakcji na poziomie komórkowym.

Doktorantka bardzo dobrze opanowała warsztat metodyczny. Na płaszczyźnie metodologicznej, planując eksperymenty, poruszała się swobodnie w obszarze zaawansowanych technik analitycznych, wykorzystując je w badaniach biologicznych. Pani magister Lidia Mielczarek celem przygotowania do części eksperymentalnej dokonała selekcji metod stosowanych w ocenie aktywności cytotoksycznej związków biologicznie czynnych [test MTT, test CVS, test żywotności z jodkiem propidyny, analiza potencjału mitochondrialnego (praca nr 1)]. Publikacja ta stanowi źródło informacji w zakresie podjętej tematyki, niezbędne dla naukowców podejmujących problematykę testów cytotoksyczności *in vitro*. Dowodzi to idealnego przygotowania Doktorantki do zaplanowanych zadań badawczych. Magister Lidia Mielczarek wykazała istotne różnice między rodzajem zastosowanej metody a uzyskaną wartością w postaci, np. IC₅₀. Stanowi to ważny argument, dlatego wartość liczbowa uzyskanego wyniku powinna być potwierdzana kilkoma testami. Na podstawie analizy uzyskanych wyników, Doktorantka do badań wybrała test enzymatyczny MTT i test nieenzymatyczny CVS.

Doskonałym wprowadzeniem do cyklu prac doświadczalnych jest artykuł współautorstwa Doktorantki (praca nr 4), w którym dokonano przeglądu znanych z literatury wyników badań kombinacji ITC z innymi związkami przeciwnowotworowymi. To obszerne opracowanie pomogło Doktorantce w wyborze kierunku badań, jak również w wyborze związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej i ich kombinacji z cytostatykami.

Głównym przedmiotem badań Doktorantki były pochodne sulforafanu (SFN) – fluorowane izoselenocyjaniiny i ich modyfikacje związane z liczbą grup metylenowych czy obecnością podstawników fluoroorganicznych. Badania wykazały, że wprowadzenie do struktury ITC atomu selenu nasila aktywność przeciwnowotworową związków. Analogi sulforafanu charakteryzowały się wysokim indeksem selektywności w porównaniu do tradycyjnych leków przeciwnowotworowych, np. doksorubicyna, paklitaksel czy tamoksyfen. Przeprowadzono badania mające na celu wykazanie synergizmu działania sulforafanu z doksorubicyną wobec komórek raka sutka linii MDA-MB-231 oraz MCF-7. Wykazano wzmocnienie efektu przeciwnowotworowego. Synergizm odnotowano również dla kombinacji selolu z doksorubicyną. Wymiernym efektem synergizmu może być w przyszłości obniżenie dawek leku i obniżenie występowania działań niepożądanych doksorubicyny.

Istotnym elementem pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy połączenie selolu z izotiocyjaniinami będzie wpływać na wzmocnienie ich działania przeciwnowotworowego. Wyniki świadczą o dużym synergizmie ich aktywności, w porównaniu do wykorzystania tych związków osobno, natomiast kombinacja tych związków charakteryzuje się wysoką selektywnością działania. Uzyskane rezultaty zachęcają do

przewodzenia badań w warunkach *in vivo*. Potwierdzenie przeciwnowotworowego działania opisanych kombinacji w modelu zwierzęcym być może stworzy podstawy do poszerzenia działalności naukowej w kierunku badań klinicznych. Pozwoli to na określenie bezpieczeństwa stosowania opisanych związków.

Tematyka realizowana przez Doktorantkę cechuje się dużym nowatorstwem, co potwierdzają przyznane jej dwa patenty, których przedmiotem zastrzeżenia są nowe związki, analogi sulforafanu i metoda ich wytwarzania. Przedmiotem zastrzeżenia jest również formuła farmaceutyczna zawierająca doksorubicynę i izotiocyjanian. Istotne jest zastosowanie w formułacji jako nośnik liposomów, które powinny ułatwiać pokonanie błony komórkowej.

Ważnym krokiem, w dalszej pracy naukowej Doktorantki, będzie próba komercjalizacji wyników badań i podjęcie współpracy z otoczeniem gospodarczym. Cenne będzie ukierunkowanie dalszych badań na profil produkcyjny podmiotu potencjalnie zainteresowanego nabyciem licencji. Należy wspomnieć, że Doktorantka jest współautorką kolejnych dwóch zgłoszeń patentowych, złożonych w Urzędzie Patentowym RP, w zakresie ochrony wynalazku. Praca stanowi nowatorskie podejście poszukiwania nowych związków o pożądanym własnościach farmakologicznych. Jednocześnie jest dowodem na wykorzystanie natury jako źródła związków o potencjale leczniczym, w postaci izolatów lub ich pochodnych. Na duże wyróżnienie zasługuje nowatorski charakter pracy i uzyskane wyniki, które mają potencjał zarówno aplikacyjny jak i również czysto poznawczy.

W czasie pracy badawczej Doktorantka zgromadziła znaczący dorobek naukowy w postaci publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Sumaryczny współczynnik oddziaływań wszystkich prac wynosi IF 26,064, co przekłada się na 280 punktów MNISW. Doktorantka odbyła trzy wyjazdy naukowe, m.in. do Norwegii i Brazylii. Była wykonawczynią czterech projektów naukowych. Praca magisterska Doktorantki zdobyła I miejsce w VI Ogólnopolskim Konkursie Prac Magisterskich i Doktorskich organizowanym przez Fundację Hasco-Lek w 2012 roku. Uczestniczyła w 37 konferencjach, w tym w ośmiu o zasięgu międzynarodowym i w 29 krajowych.

Pani mgr Lidia Mielczarek posiada znaczne doświadczenie dydaktyczne, była opiekunem 5. prac magisterskich (Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny i Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski).

Ocena rozprawy doktorskiej nie byłaby pełna, bez wskazania słabszych stron i postawienia pytań. Doktorantka do analiz cytotoksyczności wybrała dwa testy - enzymatyczny MTT i nieenzymatyczny CVS, jednocześnie wskazując na ich niedokładność. Nasuwa się pytanie, dlaczego do dalszych eksperymentów nie zastosowano również testu z diocetaniem fluoresceiny i jodkiem propidyny, testu, który daje najbardziej wiarygodne wyniki, oparte na mikroskopowej ocenie zmian zachodzących w stymulowanej komórce? Jednocześnie test ów pozwala na określenie mechanizmu działania stymulatorów na komórkę.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej. Przedstawiona praca świadczy o dużym zaangażowaniu Autorki w rozwiązanie problemu

badawczego i osiągnięcie założonego celu. Stanowi dużą wartość naukową i poszerza wiedzę z zakresu związków o potencjale przeciwnowotworowym.

Oceniam, że recenzowana praca prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy i nowatorskie podejście, spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk farmaceutycznych, wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie mgr farm. Lidii Mielczarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bydgoszcz, dn. 12.02.2019

p.o. Kierownika
Katedry i Zakładu Farmakognozji

dr hab. Daniel Załuski