



Kraków, 04.02.2019

UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

*dr hab. n. farm. Bożena Muszyńska, prof. UJ*  
*Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej*  
*Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie*

### Recenzja

pracy na stopień doktora nauk farmaceutycznych Pani mgr **Lidii Mielczarek** Wydział Farmaceutyczny  
z tytułem: „**Biologiczne interakcje Selolu 5% z Izotiocyjanianami**”,  
która wykonana została w Katedrze Farmacji Fizycznej i Bioanalizy Katedra i Zakład  
Farmaceutycznego Warszawskiego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Botaniki Farmaceutycznej  
Uniwersytetu Medycznego oraz w Zakładzie Biotechnologii Leków  
i Bioinformatyki Narodowego Instytutu Leków, pod kierunkiem: dr hab. n.  
farm. Piotra Suchockiego i opiekuna pomocniczego dr hab. n. med. Katarzyny  
Wiktorskiej.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF prac będących podstawą rozprawy doktorskiej wynosi 6,562 (5-letni IF=7,4), co odpowiada liczbie punktów MNISW=85.

Poszukiwanie skutecznych leków przeciwnowotworowych staje się bardzo ważnym wyzwaniem, zwłaszcza obecnie, kiedy choroby nowotworowe są drugą co do częstości przyczyną zgonów (WHO). Przedstawiona do recenzji praca ma szczególne znaczenie, celowane, dobrze dokumentowane leki onkologiczne w tym pochodzenia naturalnego mogą stać się ratunkiem dla pacjentów dotkniętych chorobami nowotworowymi.

Przedstawione do recenzji opracowanie mgr Lidii Mielczarek na stopień doktora nauk farmaceutycznych zawarte jest na 83 stronach maszynopisu i podzielone tak jak wymagane jest od opracowań prac doktorskich przedstawianych na podstawie cyklu monotematycznych prac, czyli zawiera takie elementy jak:

- Wprowadzenie zawierające część teoretyczną
- Założenia i cel pracy

30-688 Kraków

ul. Medyczna 9

tel. +48 12 620 54 30





- Materiał i metody
- Omówienie wyników
- Podsumowanie
- Wnioski
- Piśmiennictwo
- Kopie opublikowanych prac będących podstawą pracy doktorskiej
- Opis pozostałego dorobku Doktorantki

Celem pracy było określenie skuteczności przeciwnowotworowej połączenia Selolu i izotiocyanianów (ITC) oraz porównanie uzyskanego preparatu z terapią skojarzoną z wykorzystaniem doksorubicyny (DOX) lub 5-fluorouracylu (5-FU). Aktywność cytotoksyczną w/w związków badano na modelu *in vitro*, odpowiednio w stosunku do komórek nowotworowych lub prawidłowych. Aby określić znaczenie atomu selenu dla aktywności ITC postanowiono także określić wpływ włączenia atomu selenu do struktury ITC na aktywność przeciwnowotworową cząsteczki.

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej

Selen jest pierwiastkiem śladowym, który powinien być dostarczany do organizmu człowieka z żywnością pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Jednak główny problem w leczniczym zastosowaniu tego pierwiastka to jego wąski zakres terapeutyczny. Wszelkie odchylenia od normy są związane ze wzrostem ryzyka wystąpienia lub progresji ciężkich chorób.

Warto podkreślić tak ważne dla człowieka, przeciwnowotworowe działanie selenu. Narastająca ilość przypadków chorób nowotworowych oraz niepełna skuteczność klasycznych metod leczenia (chemioterapii i radioterapii) skłania naukowców do poszukiwania nowych, skutecznych metod terapeutycznych oraz profilaktycznych w tym opartych o odpowiednio zbilansowaną dietę. Odkryto, iż w Japonii, gdzie średnie spożycie selenu jest znaczne, współczynnik zachorowalności na raka jest pięciokrotnie mniejszy niż w innych krajach. Pod koniec lat 60-tych ubiegłego stulecia stwierdzono, że pierwiastek ten odgrywa istotną rolę w zapobieganiu procesom proliferacji i wzrostu nowotworów.

Zawartość tego pierwiastka w pożywieniu jest bardzo zmienna i zależy między innymi od rodzaju gleby przeznaczanej pod uprawy, warunków hodowli zwierząt i procesów technologicznych, jakim żywność jest poddawana. W Polsce i krajach sąsiednich brakuje tego pierwiastka w glebie.

30-688 Kraków

ul. Medyczna 9

tel. +48 12 620 54 30





UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Dodatkowo z powodu braku selenu(IV) w glebie owoce i warzywa oraz przetwory z nich otrzymywane nie są dobrym źródłem selenu i potęgują problem niedoboru tego pierwiastka.

W badaniach stanowiących przedmiot recenzowanej pracy wykorzystano związki pochodzenia naturalnego, wśród nich oryginalny polski preparat chroniony patentem – Selol. Jest to mieszanina seleninotriglicerydów, która zawiera selen na +4 stopniu utlenienia. Selol został zsyntetyzowany przed dwudziestoma laty w Zakładzie Analizy Leków na Wydziale Farmaceutycznym ówczesnej Akademii Medycznej w Warszawie. Antyproliferacyjne działanie Selolu potwierdzono na liniach komórkowych.

Wydział Farmaceutyczny

Kolejną badaną w ramach tej pracy grupą związków są izotiocyjaniany (ITC) – fitozwiązki występujące naturalnie w roślinach z rodziny *Brassicaceae* (kapustowate) i ich syntetyczne pochodne. Najlepiej poznany związek z tej grupy jest sulforafan (SFN). Dane literaturowe wskazują, iż związki z grupy ITC nasilają działanie cytostatyków i innych związków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej. W Zakładzie Biotechnologii Leków i Bioinformatyki Narodowego Instytutu Leków od wielu lat prowadzone są badania mające na celu ocenę właściwości przeciwnowotworowych SFN i jego pochodnych. Bada się także możliwość wykorzystania tych związków w przeciwnowotworowej terapii skojarzonej. Do badań włączono także analogi ITC, fluorowane izoselenocyjaniany, w których atom siarki wymieniono na atom selenu.

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej

Układ pracy jest przejrzysty i zrozumiały, co ułatwia w dużym stopniu jej śledzenie i wykorzystanie wyników. Do 83 strony (oprócz streszczenia) zawarty został wstęp (część teoretyczna) oraz przedstawiono cel, wyniki i podsumowanie przeprowadzonych badań. Na stronach 84 do 259 zaprezentowano prace będące podstawą niniejszego opracowania, podsumowanie i wnioski. Wykazane zostały stosowne oświadczenia współautorów prac, z których wynika, że Doktorantka w czterech z ujętych prac do opracowania na stopień doktora pełniła w jednej eksperymentalnej (CHEMMEDCHEM) i w pracy przeglądowej (Acta Poloniae Pharmaceutica–Drug Research) rolę pierwszego autora. O dobrym przygotowaniu do pracy naukowej świadczy to, że w dwóch pracach była też autorem korespondującym z redakcjami czasopism. Rozprawa jest udokumentowana znaczną ilością

30-688 Kraków

ul. Medyczna 9

tel. +48 12 620 54 30



pozycji piśmiennictwa (około 180; szkoda, że nie ponumerowane) pochodzącymi z 1969-2018 roku oraz zawiera 6 rycin i 5 tabel.

Z czterech prac stanowiących podstawę przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej (opublikowane w latach 2016 i 2018), trzy zostały (dwie oryginalne i jedna przeglądowa) opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o sumarycznej wartości **IF=6,562**, co dobrze świadczy o ich jakości, a tym samym poziomie prezentowanej rozprawy. Czwarta praca w cyklu prac stanowiących trzon rozprawy doktorskiej to artykuł opublikowany w 2016 roku w: „Zagadnienia poruszane przez młodych naukowców”.

Należy też zaznaczyć, że tematyka związana z przedstawionym do oceny opracowaniem oraz działalnością naukową doktorantki były prezentowane w formie posterów na 8 konferencjach naukowych międzynarodowych oraz 37 konferencjach krajowych.

Z przyjemnością przychylam się do pozytywnej oceny opublikowanych prac dokonanej przez recenzentów czasopism, w których prace zostały zamieszczone.

Podsumowując wyniki rozprawy przedstawionej do recenzji w dużym skrócie za najważniejsze efekty rozprawy należy uznać:

Modyfikację polegającą na zastąpieniu atomu siarki w grupie funkcyjnej izotiocyjnianów atomem selenu(II), która skutkuje zwiększeniem aktywności przeciwnowotworowej oraz selektywności działania cytotoksycznego wobec badanych komórek nowotworowych (MCF-7, MDA-MB-231, MALME 3M). Najsilniejsze działanie przeciwnowotworowe wykazano dla sulfotlenku 4-izoselenocyjanianobutylo-4'-fluorobenzylowego oraz sulfotlenku 4-N-izoselenocyjanianobutylo-3',5'-bis (trifluorometylo) fenyłowego.

Wykazanie, że zastosowanie Selolu łącznie z ITC skutkuje nasileniem działania przeciwnowotworowego wobec komórek raka jelita grubego oraz raka sutka, w tym również raka sutka opornego na terapię hormonalną. Udowodniono też, że najkorzystniejsze działanie przeciwnowotworowe wobec komórek raka sutka (MCF-7) wykazuje połączenie Selolu z izotiocyjanianem 2-oksoheptylu. Połączenia Selolu z ITC charakteryzują się z kolei wysoką selektywnością działania przeciwnowotworowego.

Następnie wykazano też, że połączenie Selolu z ITC cechuje równie silne działanie przeciwnowotworowe, jak połączenie Selolu z powszechnie



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej

30-688 Kraków

ul. Medyczna 9

tel. +48 12 620 54 30





stosowanymi cytostatykami (doksorubicyna i 5-fluorouracyl). W badaniach uwodniono, że Selol silniej niż ITC wzmacnia przeciwnowotworowe działanie cytostatyków (doksorubicyny i 5-fluorouracylu). Najsilniejsze i jednocześnie selektywne działanie przeciwnowotworowe wobec komórek hormonowrażliwego raka sutka wykazano dla połączenia Selolu z doksorubicyną, które jednocześnie silnie hamuje wzrost komórek, opornego na leczenie hormonalne ludzkiego raka sutka. Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono, że najbardziej obiecującymi komponentami potencjalnej terapii skojarzonej z zastosowaniem tradycyjnych cytostatyków są związki zawierające selen, a zwłaszcza Selol, który nasila zarówno działanie ITC jak i cytostatyków (doksorubicyny i 5-fluorouracylu).

Wydział Farmaceutyczny

Na szczególne podkreślenie znaczenia wyników uzyskanych podczas prowadzenia badań przez Panią mgr Mielczarek wskazuje fakt, że zostały one ujęte w czterech wnioskach patentowych, z których dwa zostały opatentowane („Formulacja farmaceutyczna zawierająca izotiocyjaniany i doksorubicynę do zastosowania w leczeniu nowotworów”; „Nowe analogi sulforafanu, ich prekursorzy, sposób ich wytwarzania, ich zastosowanie oraz postać farmaceutyczna”), a dwa są w zgłoszeniu patentowym.

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej

Z obowiązku osoby, która pisze recenzję, pozwalam sobie zauważyć w autoreferacie drobne niezgrabności, takie jak np.

- używanie personifikacji jak np.: selen może zapobiegać (str. 15); badania nad selenem (str. 19); badania mechanizmu działania (str. 21)
- uproszczeń: selen, zarówno w postaci organicznej, jak i nieorganicznej jest dostępny jako suplement diety (w postaci suplementów diety)
- strona 16: Dienne zapotrzebowanie na selen w produktach spożywczych przedstawiono w tab.1.– podczas gdy tabela jest podpisana: Procent pokrycia dziennego zapotrzebowania na selen w produktach spożywczych („Food Composition Databases Show Nutrients List”). Podpis też wymaga korekty ponieważ nie jest przedstawiony procent pokrycia zapotrzebowania w produktach, tylko na ile produkty suplementują organizm człowieka w selen. Zawartość tabeli 1 wymaga korekty. Niejasne są pojęcia takie jak np. szynka pieczona, w tym przypadku nie podano ilości. Nie zostało też podane w przeliczeniu, na jakie jednostki podane są zawartości w prezentowanej w pracy tabeli (tzn. suchej czy

30-688 Kraków

ul. Medyczna 9





świeżej masy), wg wymogów „Tabel zawartości pierwiastków śladowych w produktach żywnościowych” powinny to być g/porcje świeżej masy. Wypada nadmienić, że jednym z najlepszych źródeł pokarmowych selenu są grzyby, w tym jadalne np. borowik szlachetny zawiera w owocnikach selen w ilości 20 µg/g suchej masy. Dość niewiarygodne są ilości 777% w przypadku orzechów brazylijskich bo to by świadczyło, że mogą być toksyczne, podobnie jak tuńczyk gotowany (153%). W mojej opinii te informacje wymagają weryfikacji w innych źródłach naukowych

- strona 17: W nieorganicznych preparatach selen występuje zazwyczaj w postaci soli mineralnych – sugerowałabym; w preparatach medycznych .... Wydział Farmaceutyczny soli nieorganicznych
- strona 18, tabela 2: Selenoproteina 18 kDa – Ważna selenoproteina, występowanie: nerki i inne tkanki. Odpowiada ze utrzymanie poziomu selenu, chroni przed jego ubytkami – czy tylko ta selenoproteina jest ważna; nerki to nie tkanka tylko organ; dalsza część opisu też wymaga korekty.

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej

Zaznaczone powyżej niezgrabności nie wpływają w najmniejszym stopniu ocenę merytoryczną przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej

Podsumowując należy stwierdzić, że Autorka rozprawy zrealizowała wszystkie założone cele wykorzystując właściwe narzędzia metodologiczne, analityczne oraz statystyczne.

Pani mgr L. Mielczarek ma także imponujący pozostały dorobek naukowy. Sumaryczny IF wszystkich prac wynosi 25,301 co odpowiada liczbie punktów MNISW=280.

1. Brała też udział w stażach zagranicznych i krajowych (02.2017 The Arctic University of Norway, Tromsø, Norwegia; 05-07.2016 University of Brasilia, Brazylia; 13-15.07.2015 Instytut Farmakologii, Polska Akademia Nauk, Kraków) oraz brała udział jako wykonawca w programach naukowych:
2. Polish-Norwegian Research Program „Extension of academiabased PLATFORM to antidepressant hits discovery (PLATFORMex)” Pol-Nor/198887/73/2013, uczestnictwo jako wykonawca projektu od 02.2015 do 04.2016 (umowa z Narodowym Instytutem Leków, 1/2 etatu) (17.02-31.12.2015)

30-688 Kraków

ul. Medyczna 9

tel. +48 12 620 54 30





UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

3. National Science Centre, Poland DEC-2012/05/N/ST5/00140, Opracowanie metod syntezy fluorowanych izoselenocyjanianowych analogów sulforafanu o spodziewanej zwiększonej aktywności przeciwnowotworowej; Kierownik Tomasz Cierpień, Zakład Chemii Heteroorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk (01.08.2014-31.12.2015)

4. National Science Centre, Poland 2012/05/N/NZ5/02634 – Badanie wpływu izotiocyjanianów na właściwości cytostatyczne i cytotoksyczne 5-fluorouracylu w komórkach nowotworowych in vitro; Kierownik: mgr Małgorzata Milczarek Narodowy Instytut Leków w Warszawie (01.12.2012-31.12.2014)

5. Translocation and Safe Design of SurfaceEngineered Metal oxide Nanoparticles; Acronym: BRASINOEU; PIRSES-GA-2012-318916, Participant Identity Code 999878329; Kierownik Projektu na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym: dr hab. Piotr Suchocki (10.2012-obecnie).

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej

Otrzymała liczne nagrody i wyróżnienia:

1. I miejsce za prezentację posteru na “X Multidyscyplinarnej Konferencji Nauki Leku, Korytnica - współautor (16-19.0.2016)
2. I miejsce za wystąpienie ustne “The 3rd National Conference of PhD Students and Young Scientists”. UMK Medical College, Bydgoszcz – współautor (09-10.05 2014)
3. I miejsce za prezentację posteru na “The 2nd Student Congress of MolecularBiology „Biofuzje” Warsaw – autor (24-25.05.2014)
4. I miejsce w VI Ogólnopolskim Konkursie Prac Magisterskich i Doktorskich organizowanym przez Fundację Hasco-Lek za pracę magisterską „Badanie mechanizmu działania izotiocyjanianów oraz wpływ budowy na ich właściwości chemoprewencyjne przeprowadzone na linii komórkowej CRL 1790” (29.02.2012) 263
5. I miejsce w Konkursie Prac Magisterskich Wydziału Farmaceutycznego w Kategorii „Farmakologia Toksykologia” za pracę magisterską Badanie mechanizmu działania izotiocyjanianów oraz wpływ budowy na ich właściwości chemoprewencyjne przeprowadzone na linii komórkowej CRL 1790 (12.2011)

Doktorantka sprawowała także opiekę nad pięcioma pracami magisterskimi.

30-688 Kraków

ul. Medyczna 9

tel. +48 12 620 54 30





UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Pani mgr Lidia Mielczarek wykazała się też dobrą znajomością piśmiennictwa, bardzo dobrym opanowaniem nowoczesnego warsztatu badawczego. Wszystkie trudne elementy celów swojej rozprawy mgr Lidia Mielczarek w pełni zrealizowała, dlatego przedstawiona do recenzji rozprawa zatytułowana: „**Biologiczne interakcje Selolu 5% z Izotiocyjanianami**” spełnia wszelkie ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Lidii Mielczarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**Ze względu na wiodący udział Doktorantki w przedstawionych do recenzji pracach oraz z uwagi na istotną dla terapii onkologicznej tematykę przedstawionych w rozprawie badań i ich aplikacyjne znaczenie dla skutecznej walki z chorobami nowotworowymi (zgłoszenia patentowe), ale też jej znaczący dorobek naukowy i organizacyjny, wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Warszawskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani magister Lidii Mielczarek.**

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej

Katedra i Zakład  
Botaniki Farmaceutycznej UJ CM  
*Bożena Muszyńska*  
dr hab. Bożena Muszyńska, profesor UJ

30-688 Kraków

ul. Medyczna 9

tel. +48 12 620 54 30