

Prof. Edyta Reszka
Uniwersytet Łódźki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: edyta.reszka@biol.uni.lodz.pl

OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Chmielewskiej-Kassassir pt.
„Analiza właściwości przeciwnowotworowych polifenolowego ekstraktu z wyciągów z
wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa*) w komórkach złośliwego międzybłoniaka
opłucnej”**

wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. n. med. Lucyny Alicji Woźniak i promotora pomocniczego dr n. chem. Małgorzaty Bukowieckiej-Matusiak, w Zakładzie Biologii Strukturalnej, Katedry Biologii Medycznej, Oddziału Nauk Biomedycznych, Wydziału Lekarskiego, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

W związku z uchwałą Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, powołującą mnie do pełnienia obowiązków recenzenta rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Małgorzaty Chmielewskiej-Kassassir, przedkładam ocenę rozprawy doktorskiej.

Pomimo znacznego postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w leczeniu nowotworów, rozwój skutecznej terapii przeciwnowotworowej wciąż jest wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Stosowane leczenie: chemioterapia, radioterapia, jak i immunoterapia, mogą wywołać wiele działań niepożądanych, ograniczających skuteczność działania leków oraz mogą prowadzić do wielu efektów ubocznych u pacjentów. Często obserwuje się też oporność na stosowane leczenie, jak ma to miejsce w przypadku pacjentów z rozpoznaniem złośliwym międzybłoniakiem płucnej (ZMO). Stąd, rozpoczynając ocenę przedstawionej rozprawy doktorskiej, należy podkreślić aktualność tematu, wpisującego się w bieżące wysiłki naukowców z kraju z zagranicy w poszukiwaniu nowych strategii terapeutycznych. Należy jeszcze dodać, że typ nowotworu, którym zainteresowała się Doktorantka, ma ścisły związek z narażeniem na azbest, co w przypadku intensywnej produkcji azbestu kilkadziesiąt lat temu oraz jego stosowania do budowy domów, dróg czy w gospodarstwie domowym, stanowi istotne znaczenie dla globalnego zdrowia publicznego, jak i zdrowia publicznego Polski.

W tym względzie, zwrócenie uwagi przez Doktorantkę na fitozwiązki obecne w odtłuszczonych nasionach wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa*), potwierdzają słuszność i znaczenie podjętego przez nią tematu badawczego. Stosując modele *in vitro*. Kandydatka zidentyfikowała przeciwnowotworowe właściwości polifenolowego ekstraktu z odtłuszczonych nasion wiesiołka

dziwnego (EPE) w komórkach reprezentujących inwazyjne formy ZMO, określiła mechanizm hamowania proliferacji, migracji i inwazyjności komórek ZMO, wskazując dwukierunkowe działanie EPE na obniżenie poziomu celu molekularnego, jakim jest enzym syntaza tymidylanowa TYMS, poprzez hamowanie translokacji czynnika transkrypcyjnego SP1 do jądra komórkowego oraz wypieranie jego oddziaływania ze swoistych sekwencji obecnych w sekwencji promotorowej *tyms* oraz zidentyfikowała konsekwencje molekularne tej inhibicji. Obserwowała bowiem jednoczesne zmiany w procesie przejścia epithelialno- mezenchymalnego (EMS), tj. zmniejszenie poziomu markerów mezenchymalnych (N-kadheryny i wimentyny i ZEB1) oraz zwiększenie poziomu markerów nabłonkowych (okludyny i E-kadheryny). Co bardzo interesujące, EPE powodowało zahamowanie ekspresji TYMS w większym stopniu niż jego poszczególne składniki (kwas galusowy i kwas elagowy), jak i metabolit kwasu galusowego - urolityna A, zastosowane pojedynczo.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska ma formę spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów z sumarycznym IF 16,294 i punktacją MEiN 440 pkt:

- Chmielewska-Kassassir M., Sobierajska K., Ciszewski W.M., Kryczka J., Zieleniak A., Woźniak L.A. Evening primrose extract modulates TYMS expression via SP1 transcription factor in malignant pleural mesothelioma. *Cancers (Basel)*. 2023;15(20):5003. doi: 10.3390/cancers15205003. IF=5,207 2. MNiSW=200
- Chmielewska-Kassassir M., Woźniak L.A.: Phytochemicals in Malignant Pleural Mesothelioma Treatment-Review on the Current Trends of Therapies. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15):8279. doi: 10.3390/ijms22158279. IF=6,208 3. MNiSW=140
- Chmielewska-Kassassir M., Sobierajska K., Ciszewski W.M., Bukowiecka Matusiak M., Szczęsna D., Burzyńska-Pędziwiatr I., Wiczkowski W., Wagner W., Woźniak L.A.: Polyphenol Extract from Evening Primrose (*Oenothera paradoxa*) Inhibits Invasion Properties of Human Malignant Pleural Mesothelioma Cells, *Biomolecules*. 2020;10(11):1574. doi: 10.3390/biom10111574. IF=4,879 MNiSW=100

Rozprawa doktorska przygotowana jest w sposób staranny, dopracowany edycyjnie, klarowny i napisana jest z dużą erudycją, z umiejętnością przedstawiania informacji w sposób łatwy dla czytelnika. To niewątpliwie świadczy o dobrej znajomości tematu i doświadczeniu naukowym Doktorantki. Ponadto, dysertacja jest kompletna pod względem istniejącej wiedzy. Należy podkreślić, że tematykę badawczą ujęto w sposób obszerny, tłumaczący wszystkie zagadnienia ujęte w pracy doktorskiej, nie pozostawiając miejsca na zadanie doprecyzowujących pytań przez Recenzenta.

Co ważne, kandydatka realizowała pracę dokorską częściowo w ramach projektu PRELUDIUM (2015/19/N/NZ3/01497), ze środków przyznanych dla Młodych Naukowców grant nr 502-04-028 z Ministerstwa Nauki Szkolnictwa Wyższego oraz działalności statutowej

Zakładu Biologii Strukturalnej nr 503/0-160-01/503-01-001-19-00. W dwóch pierwszych projektach Doktorantka była ich kierownikiem. Stąd, jak sędzę, tak interesujące i dojrzałe przedstawienie tematyki badawczej przez panią dr inż. Małgorzatę Chmielewską-Kassassir.

Praca doktorska zawiera: alfabetyczny wykaz używanych skrótów; streszczenie w języku polskim i angielskim; wstęp, w którym Doktorantka opisuje epidemiologię, etiologię, stosowaną terapię i kliniczne aspekty ZMO, podłoże molekularne tego nowotworu i zastosowanie związków polifenolowych oraz ekstraktów roślinnych w jego terapii. Następnie Doktorantka przedstawia cel pracy i jej hipotezę, by przejść do opisu wyników poszczególnych publikacji, przedstawionego w sposób szczegółowy i bardzo interesujący. Chciałabym podkreślić, że oprócz wymaganych części dysertacji, jak wnioski, finansowanie badań, bibliografia, wykaz rycin i tabel, dołączone kopie omawianych publikacji, oświadczenia współautorów i wykaz pozostałego dorobku naukowego, Doktorantka przedstawiła jeszcze swoje przemyślenia, jako podsumowanie przeprowadzonych badań, a także opisała równie interesująco, wpływ uzyskanych wyników na rozwój dyscypliny nauki medyczne.

Pani mgr inż. Małgorzata Chmielewska-Kassassir zaplanowała szczegółowo szeroki zakres prac badawczych na podstawie przedstawionej hipotezy badawczej. Doktorantka postawiła hipotezę zakładającą, że polifenolowy ekstrakt z odtłuszczonych nasion wiesiołka dziwnego (EPE) hamuje aktywność proliferacyjną i zdolności inwazyjne komórek ZMO poprzez obniżenie poziomu enzymu syntazy tymidylanowej (TYMS), enzymu kluczowego dla biosyntezy DNA.

Doktorantka postawiła przed sobą cztery cele badawcze, do realizacji których zaplanowała szeroko zakrojone analizy z wykorzystaniem nowoczesnych i wielokierunkowych technik badawczych. Należy jeszcze podkreślić, że w celu realizacji założonej hipotezy, w pierwszym etapie badań Doktorantka zoptymalizowała warunki ekstrakcji polifenoli z odtłuszczonych nasion wiesiołka dziwnego, pozyskane z firmy farmaceutycznej Agrofarm S.A. z Tuszyńska k/Łodzi, a następnie przeprowadziła analizę ilościową polifenoli, selekcję ekstraktu o najwyższej ich zawartości i wykazała jego stabilność przez co najmniej trzy lata przechowywania w warunkach chłodniczych. W tym celu wykorzystywała szereg metod analitycznych, w tym technikę LC-MS.

Doktorantka zaangażowana była bezpośrednio w wykonywanie eksperymentów komórkowych, testy migracyjne i inwazyjne (ocena żywotności komórek z wykorzystaniem sulfrodaminy B, analiza cyklu komórkowego i apoptozy z zastosowaniem cytometrii przepływowej; analiza ruchliwości komórek z wykorzystaniem technik mikroskopowych, w tym migracja komórek (test zarastania rysy) oraz inwazyjność komórek (migracja przez barierę względem czynnika wywołującego chemotaksję)), analizy molekularne (analiza ekspresji genów metodą RT-PCR, analiza poziomu białek metodą Western Blot), fluorescencyjne oznaczenie białek metodą mikroskopii konfokalnej, badanie oddziaływań DNA-białko metodą EMSA. Część analiz wykonywał zespół z Zakładu Molekularnych Mechanizmów Komórkowych, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Podsumowując, chciałabym wskazać na pionierskość badań przeprowadzonych przez Doktorantkę. Z przeprowadzonej przeze mnie analizy piśmiennictwa widać jednoznacznie, że badaniem związków polifenolowych w ekstrakcie uzyskanym z odtłuszczonych nasion z wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa*) zajmują się głównie polskie zespoły naukowe: z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Politechniki Łódzkiej, a także Uniwersytetu Medycznego w Warszawie. Wiesiołek uprawiany jest w Polsce i Centralnej Europie, przede wszystkim do pozyskiwania kwasów tłuszczowych stosowanych w farmakoterapii i kosmetologii. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki są bardzo interesujące i mają duży charakter aplikacyjny. Tak obiecujące wyniki rozprawy doktorskiej, bazujące na EPE uzyskanych z odtłuszczonych nasion wiesiołka dziwnego, wskazuje bowiem na możliwość skutecznego wykorzystania terapeutycznego tych odpadów poprodukcyjnych.

Uwrażliwienie komórek nowotworowych na działanie chemioterapeutyków przez związki pochodzenia naturalnego stanowi potencjały kierunku terapii ZMO. Doktorantka przedstawiła również następne kroki naukowe, których podjęcie wynika bezpośrednio z jej badań, tj. zbadanie biodostępności EPE, pogłębione badania *in vitro* oraz konieczność wykonywania dalszych badań na zwierzętach, być może badań przedklinicznych *in vivo*.

Recenzentowi nasuwa się jedynie jeden polemiczny komentarz, który może uzupełnić te bardzo interesujące i obiecujące dla społeczeństwa wyniki badań pani mgr. inż. Małgorzaty Chmielewskiej-Kassasir. W swojej dysertacji Doktorantka uzupełniła wyniki swoich badań o wyniki innych, gdzie naturalne związki polifenolowe, w tym EPE hamowały proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT) oraz enzym syntazę tymidylanową TYMS w innych typach nowotworów. Jaka jest przewaga wyłoczyn z wiesiołka dziwnego nad innymi roślinami zawierającymi polifenole? Czy wiesiołek dziwny posiada silniejszy efekt antynowotworowy niż inne rośliny bogate w polifenole?

Ponadto, Doktorantka wykazała, że ekstrakt EPE wykazywał silniejsze działanie niż jego składowe: kwas elagowy i galusowy oraz metabolit kwasu elagowego - urolityna A. Czy istnieją badania, gdzie obserwowano podobne efekty silniejszego działania antynowotworowego ekstraktów uzyskanych z innych roślin bogatych w polifenole, w porównaniu z ich składowymi, jak np. rezweratrol, kwercetyna, kurkumina, galusan epigallokatechiny?

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Chmielewskiej-Kassasir,

- 1) stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, który wnosi istotne, nowe treści do rozwoju dyscypliny,
- 2) potwierdza bardzo wysoki poziom wiedzy teoretycznej Doktorantki w zakresie szerokiego wachlarza obszarów naukowych, które mieszczą się w dyscyplinie nauki medyczne, a także w sposób niebudzący żadnych wątpliwości

3) potwierdza jego umiejętność samodzielnego i odważnego prowadzenia pracy naukowej.

W ten sposób spełnia w pełni formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r. poz. 1789 ze zm.) oraz określone w art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 1018r. poz. 1669 ze zm.).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej przede wszystkim 1) ze względu na dojrzałe i wyczerpujące przedstawienie stanu wiedzy, przedyskutowanie wyników i postawienie wniosków z uzyskanych badań, 2) ze względu na opanowanie i stosowanie przez Doktorantkę nowatorskich metod i narzędzi badawczych oraz 3) ze względu na uzyskanie pionierskich wyników przekładających się na duże walory poznawcze i aplikacyjne badań nad fitoterapeutykami.

Poniżej przedstawiam uzasadnienie.

Sposób przygotowania rozprawy doktorskiej przez Panią mgr inż. Małgorzatę Chmielewską-Kassassir wskazuje, że Doktorantka była bardzo dobrze merytorycznie przygotowana do podjęcia badań naukowych dotyczących złośliwego międzybłoniaka opłucnej oraz ekstraktów polifenolowych z wiesiołka dziwnego.-Kandydatka wykazała się również umiejętnością prowadzenia dyskusji naukowej w sposób bardzo wnikliwy i wymagający dużej wiedzy oraz wyciągania ze swoich badań kluczowych spostrzeżeń i wniosków. Doktorantka wykonała ambitne i ciekawe badania, wymagające dużego zaangażowania w pracę laboratoryjną oraz efektywnie zaplanowała prace badawcze. Zastosowanie technik z zakresu chemii medycznej, chemii analitycznej, biologii molekularnej, biologii komórki, biochemii, do celów identyfikacji terapeutycznych związków o potencjale antykancerogennym, to niewątpliwie model interdyscyplinarny, który znajduje swój związek z dyscypliną nauki medyczne. Znacznie zwiększyło to wartość naukową dysertacji.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska jest niewątpliwie oryginalna. Należy podkreślić, że pomysł i koncepcja pracy doktorskiej są pionierskie. Poszukiwanie celów molekularnych i mechanizmów działania naturalnych związków chemicznych, stanowi unikalne podejście w poszukiwaniu nowych terapii przeciwnowotworowych, w tym uwrażliwienia na stosowanie chemioterapeutyków, co stanowi potencjalny ekscytujący obszar przyszłych badań oraz obszar do opracowania nowych strategii terapeutycznych, w celu zapewnienia większej skuteczności terapii nowotworowych.

14.06.2024r.

