



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Toksykologii

Kierownik: prof. dr hab. Agnieszka Piwowar



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farmacji Andrzeja Nowickiego
pt. *“Ocena działania przeciwnowotworowego DMU-214 (3'-hydroksy-3,4,5,4'-
tetrametoksystylbenu) i jego formulacji liposomalnej w modelu raka jajnika”*
na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu,
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.**

Przedstawiony cykl publikacji przedłożony do recenzji poświęcony jest ocenie działania przeciwnowotworowego DMU-214 (3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu) i jego formulacji liposomalnej badanych w modelu raka jajnika (2D - linia komórkowa SKOV-3 oraz 3D - komórek P-3 pobranych od pacjentki z rakiem jajnika). Rak jajnika stanowi istotny problem zdrowotny i społeczno-ekonomiczny na całym Świecie. W Polsce jest piątym pod względem zapadalności na nowotwory złośliwe u kobiet i jest czwartą przyczyną zgonów. Potwierdza to aktualność i ważność podjętego tematu badawczego, który wpisuje się bardzo dobrze w aktualne trendy badań naukowych, skupiających się na poszukiwaniu nowych, przeciwnowotworowych substancji leczniczych, nowych postaci leków oraz bardziej skutecznych strategii terapeutycznych.

Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego, Kolegium Nauk Farmaceutycznych, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Hanny Piotrowskiej-Kempisty, promotorem pomocniczym jest Pani dr hab. Paulina Skupin-Mrugalska.

Podstawą ubiegania się przez Pana mgr Andrzeja Nowickiego o nadanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych jest cykl 3 spójnych tematycznie publikacji, opublikowanych w ostatnich latach (2020, 2021 i 2023), w czasopiśmie z listy MEiN oraz Journal Citation Reports, w tym dwóch ze współczynnikiem wpływu. Łączny współczynnik wpływu IF wynosi 19,417, a punktacja MEiN to 380 punktów. Pierwsza publikacja jest obszerną pracą o charakterze poglądowym, stanowiącym bardzo dobre wprowadzenie do podjętego tematu badawczego, a dwie pozostałe są pracami

eksperymentalnymi, zrealizowanymi w oparciu o badania modelowe aktywności przeciwnowotworowej DMU-214 oraz jego formulacji liposomalnych przeprowadzone na liniach komórkowych w formule 2D i 3D. We wszystkich tych pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a liczba wszystkich współautorów to odpowiednio 10, 9 i 9. Na wiodącą rolę Doktoranta, wskazują oświadczenia współautorów dołączone do rozprawy, a rola ta polegała na: napisaniu 3 rozdziałów, opracowaniu rysunków, zebraniu piśmiennictwa, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i korekcie manuskryptu przed złożeniem do druku (publikacja nr 1); prowadzeniu hodowli *in vitro* linii komórkowej raka jajnika SKOV-3, współwykonaniu analizy mikromacierzy mRNA, wykonaniu badania RT-qPCR, oznaczenie poziomu mRNA (SMAD7, THBS1, IGFBP3, KLF4, IL6, IL1A, SOX-4, IL15, SRF, RGCC, GPR56), wykonaniu badania techniką Western blot i oznaczeniu poziomu białek (GPR56, RGCC, SRF, THBS1, SMAD7), przygotowaniu większości manuskryptu, opracowaniu rysunków, zebraniu piśmiennictwa i korekcie manuskryptu przed złożeniem do druku (publikacja nr 2); prowadzeniu hodowli linii komórkowej raka jajnika, udziale w przygotowaniu liposomów, badaniu właściwości liposomów i badaniu uwalniania DMU-214 z liposomów, przygotowaniu większości manuskryptu, prezentacji graficznej wyników i opracowaniu rysunków, zebraniu piśmiennictwa i korekcie manuskryptu przed złożeniem do druku (publikacja 3). W opinii Recenzenta należałoby doprecyzować na czym konkretnie polegał udział niektórych współautorów, gdzie w załączonych oświadczeniach został on określony i opisany jako udział we „współtworzeniu” czy „współprzygotowaniu manuskryptu” jako „wersja wstępna” (dr Magdalena Kulus, mgr Rutyl Bryl, mgr Katarzyna Stefańska, lek wet Maria Wieczorkiewicz).

Przedłożona rozprawa doktorska, wg. spisu treści, składa się z 12 rozdziałów ułożonych w logiczny sposób. Oprócz cyklu 3 monotematycznych publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień dr n. farm, praca zawiera również informacje o pozostałych 5 publikacjach nie wchodzących w skład rozprawy doktorskiej ale brak jest danych o wielkości współczynnika wpływu i punktacji MEiN. Dobrym uzupełnieniem byłoby dołączenie potwierdzonego przez właściwą bibliotekę dorobku całkowitego Pana magistra. Na uwagę zasługuje opis sylwetki Doktoranta, z której wynika, iż już w okresie studiów wykazywał się On dużą aktywnością naukową, o czym świadczy choćby praca magisterska, która powstała podczas sześciomiesięcznego pobytu w Technische Universität Dortmund (Niemcy) w ramach programu Erasmus. Opieka nad studentami zagranicznymi w macierzystej Uczelni oraz odbyte praktyki w trakcie studiów zagraniczne i krajowe, pozwoliły na ukształtowanie sylwetki Pana magistra jako świadomego farmaceuty oraz młodego naukowca o dużym potencjale badawczym. Taki sposób realizacji wszystkich efektów uczenia się przewidzianych w toku studiów pozwolił na wydobycie potencjału naukowego Doktoranta, poznanie różnych metod i technik badawczych, co stworzyło okazje do wymiany doświadczeń i nawiązania międzynarodowych relacji. Na podkreślenie zasługuje umiejętność łączenia pracy zawodowej i naukowej Pana magistra, który realizował studia

doktoranckie w ramach Podyplomowego Niestacjonarnego Studium Metodologii Badań Naukowych UMP prowadząc badania w dwóch jednostkach (Katedrze i Zakładzie Toksykologii UMP oraz w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej UMP), co wskazuje na bardzo duże kompetencje badawcze Doktoranta.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska posiada typowy układ charakterystyczny dla tego rodzaju opracowań opierających się na monotematycznym cyklu prac. Oprócz wykazu publikacji stanowiących rozprawę doktorską i kopii tych publikacji oraz oświadczeń wszystkich współautorów określających indywidualny ich wkład w powstawanie tych prac, zawiera wykaz publikacji niewchodzących w cykl rozprawy doktorskiej, wykaz użytych skrótów, piśmiennictwo zacytowane w przedłożonym opracowaniu. Najważniejszymi elementami rozprawy doktorskiej są rozdziały: wstęp, cel pracy, omówienie publikacji składających się na cykl rozprawy doktorskiej, wnioski i streszczenie w języku polskim i angielskim. Zanim przejdę do oceny zasadniczej części pracy, tj. cyklu 3 publikacji będących monotematycznym opracowaniem podjętego tematu badawczego, co do wartości naukowej nie mam żadnych wątpliwości i uważam za niezwykle cenne i oparte na obszernym przeglądzie piśmiennictwa (publikacja nr 1) oraz rozległych badaniach i ich wynikach przedstawionych w publikacjach eksperymentalnych (publikacja nr 2 i 3), to chciałam zwrócić uwagę, na raczej skromy i bardzo krótki rozdział pt. „Wstęp”, który uważam za zbyt skrótowy jak dla tak ważnego i obszernego tematu badawczego. Wydaje się, iż przydatnym dla wzmocnienia ważności niniejszej rozprawy byłoby także dołączenie rozdziału, w którym w sposób syntetyczny byłyby przedstawione/zestawione metody i techniki badawcze, które w dużym stopniu stanowią o ważności uzyskanych wyników, a nie są jednak tak powszechnie stosowane w badaniach naukowych w rozprawach doktorskich.

W rozdziale „Cel pracy” Doktorant podaje, iż głównym celem pracy doktorskiej była ocena działania przeciwnowotworowego DMU-214 oraz jego formułacji liposomalnych w komórkach raka jajnika. Celami szczegółowymi rozprawy doktorskiej była: i). analiza antymigracyjnego i antyproliferacyjnego mechanizmu działania DMU-214 w linii komórkowej raka jajnika SKOV-3, oraz ii). zaprojektowanie i scharakteryzowanie liposomalnych formułacji DMU-214 i ocena ich aktywności biologicznej w liniach komórkowych raka jajnika SKOV-3 oraz pozyskanej od pacjentki z surowiczym rakiem jajnika.

Kolejny rozdział stanowi „Omówienie publikacji składających się na cykl rozprawy doktorskiej”, co stanowi bardzo dobry opis dokonanego przeglądu piśmiennictwa w publikacji 1 oraz wyników wykonanych badań, które zostały przedstawione w pracach nr 2 i 3, stanowiących podstawę ubiegania się o stopień dr n. farm. W opinii Recenzenta dobrym uzupełnieniem tego rozdziału byłoby krótkie opisanie zawierające uzasadnienie połączenia tych publikacji w cykl.

W pierwszej publikacji (***„Ovarian Cancer and Cancer Stem Cells-Cellular and Molecular Characteristics, Signaling Pathways, and Usefulness as a Diagnostic Tool in Medicine and Oncology”***) o charakterze przeglądowym, Doktorant przedstawił aktualny stan wiedzy na temat epidemiologii raka jajnika, charakterystyki histologicznej i molekularnej, ścieżki sygnałowe zaangażowane w proces kancerogenezy jajnika, charakterystykę nowotworowych komórek macierzystych jajnika oraz stosowane terapie celowane i nowe cele diagnostyczne. Jest to bardzo obszerne i szczegółowe opracowanie liczące 21 stron i zawierające liczne schematy doskonale obrazujące omawiane zagadnienie. W publikacji tej Doktorant zwraca uwagę na dwie terapie celowane: jednej polegającej na zahamowaniu replikacji komórek macierzystych, np. poprzez indukcję różnicowania komórek przez kwas retinowy i drugiej, opartą o inhibitory ścieżek sygnałowych (Wnt, Notch, Sonic hedgehog). Doktorant konkluduje, iż największym wyzwaniem w leczeniu raka jajnika jest duże ryzyko nawrotu choroby oraz wysoka oporność komórek nowotworowych na obecnie stosowane chemioterapeutyki. Stąd podjęty temat badawczy w dwóch kolejnych pracach eksperymentalnych jest wysoce uzasadniony, aktualny i interesujący.

W drugiej publikacji (***„The Effect of 3'-Hydroxy-3,4,5,4'-Tetramethoxy-stilbene, the Metabolite of the Resveratrol Analogue DMU-212, on the Motility and Proliferation of Ovarian Cancer Cells”***) Doktorant badał mechanizm aktywności przeciwnowotworowej DMU-214 w komórkach raka jajnika SKOV-3, które w badaniach modelowych są uznawane za odporne na działanie chemioterapeutyków, zaś zdolności migracyjne i proliferacyjne komórek nowotworowych determinują ich inwazyjność. Jako najważniejsze Doktorant wykazał po raz pierwszy, iż DMU-214 znacząco hamuje zdolność komórek raka jajnika SKOV-3 do migracji oraz obniża poziom ekspresji mRNA i białka SRF w tej linii komórkowej. Ponadto wskazał na udział białek SMAD7 i SRF w antymigracyjnym i antyproliferacyjnym mechanizmie działania DMU-214 w linii komórkowej SKOV-3. Ponadto wykazał zdolność DMU-214 do podwyższania poziomu transkryptu THBS1, a w konsekwencji zahamowania migracji komórek SKOV-3 pozbawionych białka p53. Również zaobserwował zmniejszoną zdolność do migracji komórek SKOV-3 przy obniżonym poziomie ekspresji GPR56 pod wpływem DMU-214. Również zaobserwował wzrost poziomu transkryptu KLF4 oraz INT6 pod wpływem DMU-214. Zasugerował, że działanie antyproliferacyjne DMU-214 poprzez negatywną regulację ekspresji białka RGCC może być związane z zahamowaniem cyklu komórkowego w fazie G2/M w komórkach SKOV-3. Są to bardzo interesujące obserwacje, nie tylko o dużej wartości naukowej ale również wskazujące na duży potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników w zakresie regulacji ścieżek sygnalizacyjnych migracji i proliferacji. Kontynuacja badań w tym zakresie może stać się podstawą przyszłych działań terapeutycznych.

Druga z publikacji eksperymentalnych (***„Enhanced biological activity of liposomal methylated resveratrol analog 3'-hydroxy-3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-214) in 3D***

patient-derived ovarian cancer model") dotyczy badań nad nowymi formułacjami liposomowymi DMU-214, w zakresie zaprojektowania, charakterystyki oraz oceny cytotoksyczności tych postaci w komórkach SKOV-3 (model 2D i 3D) oraz linii komórkowej wyprowadzonej od pacjentki z surowiczym rakiem jajnika (model 3D). Do otrzymania liposomalnej formułacji DMU-214 Doktorant wykorzystał metodę hydratacji cienkiego filmu lipidowego używając kilka pochodnych fosfatydylocholiny (DMPC, DPPC, POPC, POPG), jako podstawowy składnik strukturalny formujący liposomalny DMU-214. Wydajność inkorporacji DMU-214 w błonę utworzonych liposomów nie przekroczyła 50%, zaś wyższą wydajność inkorporacji DMU-214 Doktorat zaobserwował dla liposomów zawierających POPC i posiadała akceptowalną stabilność. Oceniona aktywność biologiczna liposomalnych formułacji DMU-214, zbadana w modelach raka jajnika 2D (linia komórkowa SKOV-3) oraz 3D (SKOV-3 i P-3 - linia komórkowa wyprowadzona z guza pacjentki z surowiczym rakiem jajnika) pokazała wyższą cytotoksyczność (około 2-4 krotnie większą) wszystkich trzech formułacji liposomalnych badanego związku w porównaniu do niezwiązanego DMU-214, w hodowli 2D, a spośród trzech badanych formułacji liposomalnych, DMU-214/POPC/POPG wykazały najwyższy potencjał przeciwnowotworowy w linii komórkowej SKOV-3. W kolejnym kroku, Doktorant zbadał również cytotoksyczność w modelu 3D wybranych formułacji zawierających najwyższe stężenia DMU-214 potwierdzając ich działanie cytotoksyczne. Badania przeprowadzone w hodowli pierwotnej w modelu 3D, która jest oparta na materiale pobranym od pacjentki, pozwalają na uzyskanie bardziej wiarygodnych wyników, gdyż takie hodowle precyzyjnie odzwierciedlają procesy biologiczne zachodzące w warunkach *in vivo*, co czyni uzyskane wyniki tym bardziej wartościowymi i ważnymi. Jako potencjalny efektywny system terapeutyczny w leczeniu raka jajnika Doktorant wskazał wszystkie liposomowe formułacje badanego związku, a zwłaszcza DMU-214/POPC/POPG). Obserwacja ta jest warta podkreślenia i docenienia, gdyż posiada duży potencjał aplikacyjny.

Uzyskane wyniki i poczynione obserwacje zostały przez Doktoranta podsumowane w rozdziale 8 pt. „Wnioski” w postaci 3 ogólnych punktów, z których oprócz wniosków z obydwu prac eksperymentalnych, jasno wynika, iż istnieje pilna potrzeba kontynuowania badań naukowych w zakresie rozwoju nowych strategii terapeutycznych raka jajnika ze względu na wysokie ryzyko nawrotu choroby oraz szybko rozwijającą się oporność komórek nowotworowych na stosowane obecnie chemioterapeutyki, z czym Recenzent całkowicie się zgadza. Pan magister przekonująco omówił wyniki wyływające z własnych badań (publikacje nr 2 i 3) w odniesieniu do danych dostępnych w piśmiennictwie światowym, oraz badań własnych Promotora, co wskazuje na Jego dojrzałość naukową i doświadczenie badawcze oraz dogłębne poznanie tematu badawczego, co zostało zaprezentowane w publikacji przeglądowej nr 1. Drobne niedociągnięcia

edytorskie zauważone przez Recenzenta w żaden sposób nie wpływają na wysoką ocenę przedłożonej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, Pan mgr Andrzej Nowicki w sposób prawidłowy zaplanował, zaprojektował i przeprowadził badania, których wyniki z powodzeniem zostały opublikowane i zaprezentowane w postaci cyklu publikacji składających się na recenzowaną pracę doktorską. Poczynione obserwacje i uzyskane wyniki mają dużą wartość naukową, a oprócz aspektów poznawczych, również silny potencjał aplikacyjny. Zachęcam więc Doktoranta do kontynuowania badań, co z pewnością wzmocni aspekt aplikacyjny uzyskanych wyników.

W oparciu o powyższe, z przyjemnością mogę stwierdzić, iż przedłożona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ww. Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i wnoszę do Kolegium Nauk Farmaceutycznych, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, o dopuszczenie Pana mgr Andrzeja Nowickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również do Kolegium Nauk Farmaceutycznych o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana magistra Andrzeja Nowickiego zatytułowanej "Ocena działania przeciwnowotworowego DMU-214 (3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu) i jego formułacji liposomalnej w modelu raka jajnika" stosowną nagrodą ze względu na wysoką punktację i IF cyklu prac składających się na rozprawę doktorską oraz wysoką wartość naukową, zastosowany warsztat badawczy oraz potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII

kierownik

prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

Wrocław, 19.06.2023r.