

Wersja w języku polskim

Recenzja rozprawy doktorskiej *Badanie roli sulforafanu w chemoprewencji i terapii skojarzonej trójnegatywnego raka piersi – potencjał niskich dawek i liposomowych nośników leków* autorstwa Anny Pogorzelskiej

Przedłożona rozprawa doktorska stanowi cykl trzech publikacji naukowych dotyczących aktywności sulforafanu (SFN) w raku piersi. Publikacje te są powiązane tematycznie, co spełnia wymóg określony w art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Rozprawa została opatrzona streszczeniem w języku polskim (s. 7) oraz w języku angielskim (s. 8), zgodnie z art. 187 ust. 4 ww. ustawy.

W skład cyklu monotematycznego publikacji stanowiących rozprawę doktorską wchodzi następujące prace:

- Kuran, D., Pogorzelska, A., & Wiktorska, K. (2020). *Breast Cancer Prevention-Is there a Future for Sulforaphane and Its Analogs? Nutrients*, 12(6), 1559,
- Pogorzelska, A., Mazur, M., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Sigorski, D., Fronczyk, K., & Wiktorska, K. (2023). *Anticancer effect and safety of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane liposomal formulation in triple-negative breast cancer (TNBC) animal model. Biomedicine & Pharmacotherapy*, 161, 114490,
- Pogorzelska, A., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Mazur, M., Milczarek, M., Medyńska, K., & Wiktorska, K. (2024). *Antitumor and antimetastatic effects of dietary sulforaphane in a triple-negative breast cancer models. Scientific Reports*, 14(1), 16016.

Cykl publikacji opatrzono ogólnym Wprowadzeniem, wykazem Celów rozprawy doktorskiej oraz streszczeniem prac badawczych opublikowanych przez Doktorantkę (*Wyniki badań*). Całość zamyka krótki rozdział zawierający *Wnioski*.

Cele badań zaprezentowanych w rozprawie przedstawiono w sekcji 5 na stronie 16. Obejmowały one wszechstronny przegląd literatury na temat aktywności SFN w prewencji raka piersi. Kolejny cel dotyczył opracowania i charakterystyki nośników leków dla SFN i DOX (doksorubicyny), a następnie zbadania wpływu niskich dawek SFN na wzrost guza TNBC (trójnegatywnego raka piersi) i jego potencjał przerzutowy. Każdy z celów został zrealizowany w oddzielnej publikacji. Prace wchodzące w skład rozprawy zostały już poddane recenzji i opublikowane, chciałbym jednak omówić pewne aspekty związane z projektowaniem eksperymentów i analizą danych. Prace te omawiam indywidualnie na kolejnych stronach niniejszej recenzji.

Kuran, D., Pogorzelska, A., & Wiktorska, K. (2020). *Breast Cancer Prevention-Is there a Future for Sulforaphane and Its Analogs? Nutrients*

Doktorantka przywołała prawie 150 publikacji, co wskazuje na znaczną ilość czasu i wysiłku włożonego w przygotowanie przeglądu. Niestety, zabrakło bardziej krytycznego spojrzenia na wyniki dostępne w literaturze. Autorzy często ograniczali się do wymienienia kluczowych danych zawartych w źródłach i podejmowali jedynie minimalną próbę syntezy wyników,

wyjaśnienia obserwowanych rozbieżności czy wskazania ograniczeń metodologicznych obecnych w niektórych pracach źródłowych.

Publikacja zawiera błędy, w tym literówki w nagłówkach [np. w sekcjach 5.1 (s. 11) i 5.2 (s. 20) pojawia się słowo *Demonstate* zamiast *Demonstrate*] oraz błędy językowe (np. na s. 2 widnieje *21th century* zamiast *21st century*). W całym tekście stosowane są niepoprawne jednostki; stężenia błędnie wyrażono w mikrometrach (μm) zamiast w mikromolach (μM). Niemniej jednak, artykuł przeglądowy dostarcza solidnego zbioru informacji na temat dotychczasowych eksperymentów dotyczących aktywności SFN w kontekście raka piersi, co potwierdza, że rozprawa doktorska dowodzi ogólnej wiedzy teoretycznej Doktorantki.

Pogorzelska, A., Mazur, M., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Sigorski, D., Fronczyk, K., & Wiktorska, K. (2023). *Anticancer effect and safety of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane liposomal formulation in triple-negative breast cancer (TNBC) animal model. Biomedicine & Pharmacotherapy*

Anna Pogorzelska jest pierwszą autorką pracy zatytułowanej *Anticancer effect and safety of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane liposomal formulation in triple-negative breast cancer (TNBC) animal model*. Artykuł został opublikowany w czasopiśmie *Biomedicine & Pharmacotherapy* w 2023 roku. Główna hipoteza pracy zakłada, że podawanie SFN w skojarzeniu z DOX może przynieść korzystne efekty w TNBC. Przeprowadzone badania *in vitro* uwypukliły korzystną, zróżnicowaną odpowiedź komórkową, która przemawia za selektywnością kombinacji DOX+SFN. W szczególności, te dwa związki działały synergistycznie, hamując aktywność metaboliczną/żywołność linii MDA-MB-231 (linia TNBC), jednocześnie działając antagonistycznie na MCF-10A (nienowotworowy nabłonek piersi). Sugeruje to, że SFN moduluje szlaki śmierci/przeżycia w sposób zależny od kontekstu komórkowego. Fakt zastosowania odpowiednich modeli matematycznych (tj. CI, DRI i Fa) do analizy danych z badań nad jednoczesnym podawaniem leków potwierdza, że A. Pogorzelska potrafi przeprowadzić modelowanie interakcji lekowych. Najbardziej istotnym klinicznie aspektem badania jest wykazanie ogólnoustrojowej chemoprotekcji (dane *in vivo*). Przedstawione dowody wskazują, że obecność SFN łagodzi toksyczność narządową (off-target) typowo kojarzoną z DOX. W szczególności analiza biochemiczna CK-MB i AST wskazuje, że SFN skutecznie chroni serce i wątrobę przed uszkodzeniami wywołanymi przez DOX. Wreszcie, praca dotycząca lokalizacji subkomórkowej oferuje interesujący wgląd w biologię działania badanych leków. Obrazowanie mikroskopią konfokalną ujawnia, że SFN ułatwia akumulację DOX w jądrze komórkowym komórek nowotworowych. Sugeruje to, że SFN kieruje chemioterapeutyk do jego miejsca docelowego (jądro/DNA). W połączeniu z potwierdzeniem translokacji Nrf2, badanie skutecznie waliduje aktywność biologiczną użytego SFN i dostarcza podstaw mechanistycznych dla przyszłych badań nad łączeniem fitozwiązków z tradycyjnymi chemioterapeutykami w celu poprawy ich okna terapeutycznego. Potwierdza to, że A. Pogorzelska jest zdolna do prowadzenia złożonych badań *in vivo* i łączenia wyników z wielu testów w celu wyciągnięcia ogólnych wniosków, co jest ważną częścią wnioskowania naukowego.

Powyższe ustalenia mogą być cenne dla farmakologii i onkologii. Istnieje jednak kilka kwestii związanych z projektowaniem eksperymentów, które potencjalnie podważają niektóre z pozostałych wniosków przedstawionych w artykule.

Po pierwsze, cały opis metodyki dotyczącej analizy statystycznej składa się zaledwie z dwóch zdań (strona 3, sekcja 2.9): *Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, US) with the use of appropriate tests for each experiment. $p < 0.05$ was considered statistically significant.* Sformułowanie „z użyciem odpowiednich testów” jest niedopuszczalne w tekście naukowym, ponieważ uniemożliwia czytelnikom weryfikację poprawności analizy danych. Nazwa testu statystycznego użytego do analizy danych została wymieniona w opisie Ryc. 4 (test Manna-Whitneya) i, jak się wydaje, tylko tam. Eksperyment obejmował 4–5 grup (zdrowe myszy, kontrola, SFN-lip, DOX-lip i DOX+SFN-lip). Fakt, że zdrowe myszy nie zostały przedstawione na panelach C–H, wymaga wyjaśnienia. Ponadto, test Manna-Whitneya jest testem nieparametrycznym służącym do porównania dwóch grup niezależnych. Stosowanie wielokrotnie testów Manna-Whitneya (porównania parami względem kontroli) bez stosownej korekty drastycznie zwiększa ryzyko błędu I rodzaju (wyniki fałszywie dodatnie) i świadczy o błędnym planie analizy danych. Uzyskane dane powinny zostać ponownie przeanalizowane przy użyciu odpowiednich testów dla wielu grup (np. ANOVA z poprawkami post-hoc), a wyniki powinny zostać ponownie ocenione w świetle tej rygorystycznej oceny statystycznej.

Odnosnie formulacji, A. Pogorzelska opisała wytworzenie trzech różnych rodzajów liposomów zawierających albo samą DOX, albo sam SFN, albo oba leki łącznie. Jednakże przedstawiono tylko jeden wykres rozkładu wielkości (Ryc. 1A) i zaraportowano jedną wartość PDI (sekcja 3.1). Towarzyszy temu pojedyncza wartość potencjału zeta (ZP) (Tabela 1). Ponieważ liposomy zamykały w sobie trzy różne ładunki lekowe, musiały powstać odmienne rodzaje liposomów o różnych właściwościach. W związku z tym należało zaraportować trzy zestawy parametrów. Ta niespójność wymaga wyjaśnienia.

Następnie, zaraportowana wartość ZP wydaje się wysoka i mało prawdopodobna. DMPC jest lipidem zwitterjonowym (tj. posiada obojętny ładunek netto). Zatem w środowisku wodnym przy neutralnym/fizjologicznym pH, ZP liposomów złożonych wyłącznie z obojętnego DMPC powinien pozostawać bliski 0 mV (10.3390/biomedicines9111672, 10.3390/jfb14060296, 10.1021/acs.langmuir.9b02163). Jakie jest źródło odnotowanego ładunku dodatniego? Jak ładunek ten różni się między liposomami obciążonymi różnymi lekami (DOX vs SFN)?

Zaraportowany wskaźnik polidispersji (PDI) jest niezwykle wysoki i spójny z szerokim rozkładem wielkości o dwóch pikach (sekcja 3.1 i Ryc. 1A). Taki bimodalny rozkład oznacza, że uzyskana mieszanina liposomów składa się z dwóch różnych frakcji, które będą wykazywać zupełnie odmienne zachowanie *in vivo*, w tym różny czas życia w krwioobiegu, profile biodystrybucji i tempo uwalniania leku. Różnicę tę można przypisać, po części, spodziewanemu wyższemu wiązaniu białek dopełniacza i późniejszemu wychwytywi frakcji 342 nm przez układ fagocytarny jednojądrzasty (10.1016/S0169-409X(99)00041-1). Wyniki *in vivo* wymagają reinterpretacji w świetle bimodalnego rozkładu wielkości uzyskanych liposomów.

Zaraportowana skuteczność enkapsulacji (Tabela 1) jest bliska 100%. Wydaje się to wartością niezwykle wysoką dla opisanej w sekcji 2.2 metody pasywnego zamykania leku. Aby uzyskać wysokie wskaźniki enkapsulacji, historycznie opracowano kilka metod aktywnych wymuszających wejście DOX do liposomu, np. gradienty siarczanu amonu czy gradienty pH; podejścia te doprowadziły do opracowania wprowadzonych na rynek liposomalnych formułacji DOX, odpowiednio Doxil i Myocet (10.1016/j.jconrel.2012.03.020, 10.3109/10611869609015970).

W celu wyeliminowania niezładowanych DOX i SFN użyto membrany o granicznej masie cząsteczkowej (cut-off) 100-500 Da. Masa cząsteczkowa wolnej zasady DOX wynosi 543,5 Da, a dla chlorowodoru DOX (DOX HCl) ok. 580 Da. Wydaje się, że cząsteczki DOX są większe niż maksymalna wielkość porów zastosowanej membrany, co sugeruje, że wolna (niezładowana) DOX nie mogła wydostać się z worka dializacyjnego. Zatem metodyka dializy wymaga uzasadnienia i wyjaśnienia.

DMPC jest jedynym składnikiem nieaktywnym wytworzonych liposomów. Nie dodano żadnych czynników maskujących (np. lipidów modyfikowanych PEG) ani stabilizatorów (np. cholesterolu). Temperatura przejścia fazowego DMPC wynosi ok. 22-24°C (10.1016/j.bbamem.2004.12.007, 10.1038/s41598-018-33107-5, 10.3390/molecules28135125). Oznacza to, że w warunkach badania uwalniania leku, tj. w 37°C (oraz podczas oceny *in vivo*), DMPC znajdowałby się w nieuporządkowanej fazie ciekłokrystalicznej, w której łańcuchy węglowodorowe są zorientowane losowo i płynne. Powinno to powodować szybkie uwalnianie leku (szczególnie *in vivo*, w obecności opsonin we krwi). Zaskakująco, zaraportowano stosunkowo powolne uwalnianie (Ryc. 1B). Wymaga to dyskusji.

Hipoteza, która wyjaśniałaby niektóre z wymienionych powyżej niespójności, jest następująca: Rzeczywista wydajność zamykania DOX była niska, prawdopodobnie poniżej 30%. Jednakże, z powodu nieskutecznej dializy, niezładowana DOX pozostała w roztworze, przyczyniając się do rzekomej wysokiej wydajności enkapsulacji (która w istocie była jedynie artefaktem wynikającym z błędu dializy). Wolna DOX mogła częściowo asocjować z powierzchnią wytworzonych liposomów (10.1021/acs.jpcc.5c03575). Jako że chlorowodorek doksorubicyny (DOX HCl) ma ładunek dodatni (10.1039/D2CP02714C), wyjaśniałoby to nieoczekiwany dodatni potencjał zeta liposomów otrzymanych wyłącznie z obojętnego DMPC. *In vivo*, jakkolwiek zamknięta DOX zostałaby szybko uwolniona z powodu upłynnienia DMPC w stosunkowo wysokiej temperaturze ciała myszy Balb/c. W konsekwencji wstrzykniętą dawkę leku należałoby traktować przede wszystkim jako wolny lek. Proszę o ustosunkowanie się do tej kwestii.

W sekcji wniosków (s. 28) Doktorantka wspomniała, że uzyskany nośnik dla SFN i DOX jest stabilny. Proszę wyjaśnić, jakie badania stabilności przeprowadzono i w jakich warunkach? Czy parametry takie jak PDI, ZP lub średnia średnica były stabilne w czasie?

Na stronie 29 Doktorantka wskazała, że jej wkład w badanie obejmował optymalizację nośnika liposomalnego. Proszę wyjaśnić, jakie kroki podjęto w celu optymalizacji.

Pogorzelska, A., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Mazur, M., Milczarek, M., Medyńska, K., & Wiktorska, K. (2024). Antitumor and antimetastatic effects of dietary sulforaphane in a triple-negative breast cancer models. Scientific Reports

Artykuł opisuje aktywność *in vivo* SFN w mysim modelu TNBC. Mocną stroną badania jest analiza niskich stężeń SFN, co wypełnia lukę w dziedzinie zdominowanej przez badania farmakologiczne z użyciem wysokich dawek. Wykorzystując immunokompetentny model *in vivo*, Doktorantka podkreśliła, że skuteczność SFN wynika prawdopodobnie z modulowania mikrośrodowiska guza i nacieku immunologicznego, a nie z bezpośredniej cytotoksyczności. Jest to wzmacnione odkryciem, że model sferoidów 3D wykazywał oporność w porównaniu z hodowlami 2D, co podkreśla znaczenie architektury tkankowej w badaniach przesiewowych leków. Doktorantka przedstawiła nowatorskie dane pokazujące, że komórki pochodzące ze struktur 3D zachowują zmienione fenotypy migracyjne, co sugeruje, że fizyczne środowisko guza trwale wpływa na potencjał przerzutowy.

Uważam jednak, że praca zawiera potencjalne wyolbrzymienia. Tytuł sugeruje, że badanie dostarcza danych na temat SFN w diecie (tj. dostarczanego z pokarmem); jednakże sekcja *Materiały i metody* ujawnia, że badany związek podawano dootrzewnowo. Tytuł sugeruje również działanie antymetastatyczne (przeciwprzerzutowe), jednak leczenie nie wpłynęło na liczbę przerzutów w płucach (Ryc. 1E).

W sekcji *Wnioski* (s. 28) Doktorantka wspomniała, że SFN ograniczył kardiotoxycywność wywołaną przez DOX. Proszę omówić to stwierdzenie w świetle danych przedstawionych na Ryc. 2 artykułu, które wskazują na wyraźny spadek masy serca w odpowiedzi na SFN. Statystycznie istotne zmniejszenie masy serca (atrofia serca) stanowi poważny problem bezpieczeństwa.

Podsumowując, rozprawa nosi znamiona oryginalnego dociekania naukowego w dziedzinach farmakologii i onkologii. Badania są nowatorskie, zdefiniowano też nowe cele badawcze istotne dla dziedziny. Doktorantka wykorzystwała szeroki panel technik laboratoryjnych w celu rozwiązania problemów badawczych. Ze względu na swoją oryginalność, przeprowadzone badania zostały opublikowane i prawdopodobnie będą cytowane. Poprzez odniesienie się do wątpliwości podniesionych w niniejszej recenzji, Doktorantka może potwierdzić zdolność do samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Na podstawie przeprowadzonej recenzji stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wymagania określone w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z powyższym rekomenduję dopuszczenie rozprawy doktorskiej pt. *Badanie roli sulforafanu w chemoprewencji i terapii skojarzonej trójnegatywnego raka piersi – potencjał niskich dawek i liposomowych nośników leków* autorstwa Anny Pogorzelskiej do publicznej obrony.

Z poważaniem,

dr hab. Artur Wnorowski

Lublin, 28-01-2026

English version

Review of the doctoral dissertation titled *Badanie roli sulforafanu w chemoprewencji i terapii skojarzonej trójnegatywnego raka piersi – potencjał niskich dawek i liposomowych nośników leków* by Anna Pogorzelska

The presented doctoral dissertation is a collection of three scientific publications on sulforaphane (SFN) activity in breast cancer. The publications are thematically related, which meets the requirement of point 3, Article 187 of the Act of 20 July 2018, the Law on Higher Education and Science (*Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*). The dissertation is accompanied by a summary in Polish (p. 7) and in English (p. 8), in accordance with point 4, Article 187 of the Act.

The thematic collection of publications constituting the doctoral dissertation includes the following works:

- Kuran, D., Pogorzelska, A., & Wiktorska, K. (2020). *Breast Cancer Prevention-Is there a Future for Sulforaphane and Its Analogs?* *Nutrients*, 12(6), 1559,
- Pogorzelska, A., Mazur, M., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Sigorski, D., Fronczyk, K., & Wiktorska, K. (2023). *Anticancer effect and safety of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane liposomal formulation in triple-negative breast cancer (TNBC) animal model.* *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 161, 114490,
- Pogorzelska, A., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Mazur, M., Milczarek, M., Medyńska, K., & Wiktorska, K. (2024). *Antitumor and antimetastatic effects of dietary sulforaphane in a triple-negative breast cancer models.* *Scientific Reports*, 14(1), 16016.

The papers are accompanied by the general introduction (*Wprowadzenie*), the list of aims (*Cele rozprawy doktorskiej*), and the summary of the research papers published by the PhD Candidate (*Wyniki badań*). These are followed by a short conclusions section (*Wnioski*).

The aims of the studies presented in the dissertation were provided in section 5, page 16. These involved a comprehensive literature review on SFN activity in breast cancer prevention. The next goal was related to the development and characterization of drug carriers for SFN and DOX followed by the investigation of the effects of low-dose SFN on TNBC tumor growth and metastatic capacity. Each of the goals was addressed in a separate paper. The papers included in the thesis have already been subjected to peer review and published; however, I would like to discuss some of the aspects related to experiment design and data analysis. The papers are discussed individually on the following pages of this review.

Kuran, D., Pogorzelska, A., & Wiktorska, K. (2020). *Breast Cancer Prevention-Is there a Future for Sulforaphane and Its Analogs?* *Nutrients*

The PhD Candidate referenced almost 150 publications, indicating a significant amount of time and effort dedicated to creating the review. Unfortunately, a more critical perspective on the results available in the literature was lacking. The authors often limited themselves to listing key data contained in the sources and made only a minimal attempt to synthesize the

findings, explain observed discrepancies, or point out methodological limitations present in some of the sources.

The publication contains errors, including typos in headings [e.g., in sections 5.1 (p. 11) and 5.2 (p. 20), the word *Demonstate* appears instead of *Demonstrate*], and linguistic errors (e.g., on page 2, *21th century* appears instead of *21st century*). Throughout the manuscript, incorrect units are used; concentrations are erroneously expressed in micrometers (μm) instead of micromolar (μM).

Nevertheless, the review provides a solid collection of information on experiments conducted to date regarding SFN activity in the context of breast cancer, which confirms that the doctoral dissertation demonstrates the Candidate's general theoretical knowledge.

Pogorzelska, A., Mazur, M., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Sigorski, D., Fronczyk, K., & Wiktorska, K. (2023). Anticancer effect and safety of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane liposomal formulation in triple-negative breast cancer (TNBC) animal model. Biomedicine & Pharmacotherapy

Anna Pogorzelska is the first author of the paper entitled *Anticancer effect and safety of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane liposomal formulation in triple-negative breast cancer (TNBC) animal model*. The paper was published in *Biomedicine & pharmacotherapy* in 2023. The main hypothesis of the paper is that SFN co-administration with DOX could have beneficial effects in TNBC. Conducted in vitro experiments highlighted a valuable differential cellular response that argues for the selectivity of DOX+SFN combination. In particular, the two compounds acted synergistically to suppress the metabolic activity/viability of MDA-MB-231 (TNBC cell line) while acting antagonistically on MCF-10A (non-cancerous breast epithelial). This suggests that SFN modulates death/survival pathways in a context-dependent manner. The fact that appropriate mathematical models (i.e. *CI*, *DRI*, and *Fa*) were utilized to analyze data from drug co-administration studies confirms that A. Pogorzelska is able to conduct the drug interaction modeling. The most clinically relevant aspect of the study is the demonstration of systemic chemoprotection (in vivo data). The provided evidence indicates that the presence of SFN mitigates the off-target toxicity typically associated with DOX. Specifically, the biochemical analysis of CK-MB and AST indicates that SFN successfully shields the heart and liver from DOX-induced damage. Finally, the work regarding subcellular localization offers interesting biological insight. The confocal microscopy imaging reveals that SFN facilitates the accumulation of DOX within the cell nucleus of cancer cells. It suggests that SFN drives the chemotherapy agent to its target site (nucleus/DNA). Coupled with the confirmation of Nrf2 translocation, the study successfully validates the biological activity of the SFN used and provides a mechanistic basis for future research into combining phytochemicals with traditional chemotherapeutics to enhance the therapeutic window. This confirms that A. Pogorzelska is able to conduct complex in vivo studies and combine results from multiple assays to draw general conclusions, which is important part of scientific reasoning.

The abovementioned findings may be valuable to the fields of pharmacology and oncology. However, there are several issues related to experiment design that potentially invalidate some of the other findings presented in the paper.

First, the entire description of the methodology related to the statistical analysis consists of merely two sentences (page 3, section 2.9): *Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 (Graph-Pad Software, San Diego, US) with the use of appropriate tests for each experiment. $p < 0.05$ was considered statistically significant.* The phrase *with the use of appropriate tests* is unacceptable in scientific writing, as it prevents readers from verifying if the data was analyzed correctly. The name of the statistical test used to analyze the data was mentioned in the description of Fig. 4 (the Mann-Whitney test), and, apparently, only there. The experiment involved 4 – 5 groups (healthy mice, control treatment, SFN-lip, DOX-lip, and DOX+SFN-lip). The fact that healthy mice were not depicted on panels C–H requires explanation. Furthermore, the Mann-Whitney test is a non-parametric test designed to compare two independent groups. Using multiple Mann-Whitney tests (pairwise comparisons against control) without correction drastically increases the risk of Type I errors (false positives) and indicates a flawed data analysis design. The obtained data should be re-analyzed using appropriate multi-group tests (e.g. ANOVA with post-hoc corrections), and the results should be then re-evaluated in light of this rigorous statistical evaluation.

Regarding the formulation, A. Pogorzelska described the generation of three distinct liposomal species containing either DOX alone, SFN alone, or both drugs combined. Yet, only a single size distribution plot is provided (Fig. 1A) and a single PDI value is reported (section 3.1). This is accompanied by a single ZP value (Table 1). As liposomes were loaded with three different cargos, different liposomal species of varying properties must have been obtained. Thus, three sets of parameters should be reported. This inconsistency requires explanation.

Next, the reported ZP value seems high and unlikely. DMPC is a zwitterionic lipid (i.e. it has a neutral net charge). Thus, in water environment at neutral/physiological pH, the ZP of liposomes composed solely of neutral DMPC should stay close to 0 mV (10.3390/biomedicines9111672, 10.3390/jfb14060296, 10.1021/acs.langmuir.9b02163). What is the source of the reported positive charge? How does this charge differ between liposomes loaded with different drugs (DOX vs SFN)?

The reported PDI is extremely high and consistent with *extended size distribution with two peaks* (section 3.1 and Fig. 1A). Such a bimodal distribution means that the obtained liposome mixture is composed of two different fractions that will display entirely different behavior in vivo, including varying circulation times, biodistribution profiles, and drug release rates. The difference can be attributed, in part, to expected higher complements binding and subsequent uptake by mononuclear phagocyte system of the 342 nm fraction (10.1016/S0169-409X(99)00041-1). The in vivo results require reinterpretation in light of the bimodal size distribution of the obtained liposomes.

The reported encapsulation efficiency (Table 1) is close to 100%. This seems extremely high for passive loading method described in section 2.2. To obtain high encapsulation rates,

several active approaches have historically been developed to force DOX into the liposome, e.g. ammonium sulfate gradients and pH gradients; these approaches led to the development of marketed liposomal DOX formulations, Doxil and Myocet, respectively (10.1016/j.jconrel.2012.03.020, 10.3109/10611869609015970).

To eliminate unencapsulated DOX and SFN, a membrane with a molecular weight cut-off of 100-500 Da was used. The molecular weight of free base DOX is 543.5 Da, and it is approx. 580 Da for DOX HCl. It seems that the DOX molecules are larger than the maximal pore size of the applied membrane, suggesting that the free (unencapsulated) DOX could not escape the dialysis bag. Thus, the dialysis methodology requires justification and clarification.

DMPC is the sole non-active component of the generated liposomes. No stealth agents (e.g. PEG-modified lipids) nor stabilizers (e.g. cholesterol) were added. The Phase Transition Temperature of DMPC is approx. 22-24°C (10.1016/j.bbamem.2004.12.007, 10.1038/s41598-018-33107-5, 10.3390/molecules28135125, <https://www.avantiresearch.com/en-gb/support-hub/physical-properties/phase-transition-temps>). This indicates that under the conditions of the drug release testing, i.e. at 37°C (and during in vivo evaluation), the DMPC would be in disordered liquid crystalline phase, where the hydrocarbon chains are randomly oriented and fluid. This should cause rapid drug release (especially in vivo, with opsonins present in the blood). Surprisingly, relatively slow release was reported (Fig. 1B). This requires discussion.

One hypothesis that would explain some of the inconsistencies listed above is as follows: Actual DOX encapsulation efficiency was low, likely below 30%. Yet, due to inefficient dialysis, unencapsulated DOX remained in the solution, contributing to apparent high encapsulation efficiency (that, in fact, was simply an artifact resulting from the dialysis error). Free DOX could partially associate with the surface of the generated liposomes (10.1021/acs.jpcc.5c03575). As DOX HCl is positively charged (10.1039/D2CP02714C), this would explain unexpected positive zeta potential of the liposomes obtained solely from neutral DMPC. In vivo, any encapsulated DOX would be rapidly released due to DMPC fluidification at relatively high body temperature of Balb/c mice. Consequently, injected dose of the drug should be treated primarily as free drug. Please dispute.

In the conclusions section (*Wnioski*, p. 28) the Candidate mentioned that the obtained carrier for SFN and DOX is stable. Please explain what stability tests were performed and under what conditions? Were the parameters like PDI, ZP, or average diameter stable over time?

On page 29, the Candidate indicated that her contribution to the study involved optimization of the liposomal carrier. Please explain what optimization steps were taken.

Pogorzelska, A., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Mazur, M., Milczarek, M., Medyńska, K., & Wiktorska, K. (2024). Antitumor and antimetastatic effects of dietary sulforaphane in a triple-negative breast cancer models. Scientific Reports

The paper describes the in vivo effect of SFN in a murine TNBC model. The study's strength lies in the investigation of low concentrations of SFN, addressing a gap in a field dominated

by high-dose pharmacological studies. By utilizing an immunocompetent in vivo model, the PhD Candidate highlighted that SFN efficacy is likely driven by modulating the tumor microenvironment and immune infiltration rather than direct cytotoxicity. This is reinforced by the finding that the 3D spheroid model exhibited resistance compared to 2D cultures, highlighting the importance of tissue architecture in drug screening. The Candidate presented novel data showing that cells derived from 3D structures retain altered migratory phenotypes, suggesting that the physical tumor environment permanently impacts metastatic potential.

However, I believe the paper contains potential overstatements. The title suggests the study provides the data on dietary SFN (i.e. provided via diet); however, the *Material and methods* section reveals the compound of interest was administered intraperitoneally. The title also suggests an antimetastatic effect, yet the number of metastases in the lungs was not affected by the treatment (Fig. 1E).

In the Conclusions section (*Wnioski*, p. 28), the Candidate mentioned that SFN limited the cardiotoxicity elicited by DOX. Please discuss this statement in the light of the data presented in Fig. 2 of the paper, which indicates a clear decrease in heart mass in response to SFN. A statistically significant reduction in heart mass (cardiac atrophy) is a major safety concern.

To summarize, the thesis has hallmarks of an original scientific investigation in the fields of pharmacology and oncology. The research is novel, and new research goals important for the field were defined. The Candidate utilized a wide panel of laboratory techniques aimed at resolving the research challenges. Due to its originality, the conducted research was published and likely will be cited. By addressing the concerns raised in this review, the PhD Candidate can confirm the ability to independently conduct scientific research.

Based on the conducted review, the presented thesis fulfills the requirements laid down in the Law on Higher Education and Science. Therefore, I recommend accepting the dissertation *Badanie roli sulforafanu w chemoprewencji i terapii skojarzonej trójnegatywnego raka piersi - potencjał niskich dawek i liposomowych nośników leków* by Anna Pogorzelska for her public PhD defense.

Sincerely,

Artur Wnorowski, PhD, DSc

Lublin, 28-01-2026