

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
mgr Anny Pogorzelskiej  
pod tytułem**

***„Badanie roli sulforafanu w chemoprewencji i terapii skojarzonej trójnegatywnego raka  
piersi – potencjał niskich dawek i liposomowych nośników leków”***

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Pogorzelskiej została wykonana pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Wiktorskiej oraz promotora pomocniczego Pani dr Małgorzaty Milczarek w Narodowym Instytucie Leków.

Badania prezentowane w pracy doktorskiej częściowo zrealizowano w ramach projektu PRELUDIUM 20 (nr projektu: 2021/41/N/NZ7/02530) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Problematyka pracy doktorskiej jest bardzo aktualna. Potrójnie ujemny rak piersi odznaczający się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER2 (TNBC) jest agresywną postacią nowotworu o ograniczonych opcjach terapeutycznych, co uzasadnia poszukiwanie nowych strategii, takich jak terapie skojarzone z wykorzystaniem nanoosiłków. Doktorantka trafnie zidentyfikowała lukę w obecnych protokołach medycznych. Jak zauważa Doktorantka TNBC jest odporny na terapie celowane, a standardowa chemioterapia wiąże się z wysoką toksycznością i częstymi nawrotami, co skutkuje drastycznie niskim wskaźnikiem przeżywalności. W tym kontekście, wybór sulforafanu (SFN) jako substancji wspomagającej jest merytorycznie uzasadniony ze względu na opisywane w literaturze jego wielokierunkowe działanie przeciwnowotworowe, obejmujące indukcję apoptozy i hamowanie komórek macierzystych nowotworu.

Innowacyjność i słuszność strategii przejawia się szczególnie w skupieniu uwagi na dotychczas słabo zbadanym wpływie niskich dawek SFN oraz jego synergii z klasyczną doksorubicyną. Zastosowanie nowoczesnego, liposomalnego systemu dostarczania obu substancji jednocześnie stanowi kluczowy element metodologiczny, który pozwala na skuteczne dotarcie do tkanki nowotworowej przy jednoczesnej ochronie zdrowych komórek, co bezpośrednio adresuje problem toksyczności ogólnoustrojowej. Przyjęta trój etapowa metodologia – obejmująca analizę teoretyczną, projektowanie układu dostarczania leku oraz weryfikację w modelach *in vitro* i *in vivo* – tworzy logiczny i spójny ciąg dowodowy. Ostatecznym potwierdzeniem słuszności tego podejścia są uzyskane wyniki: zahamowanie

wzrostu guza, działanie antymetastatyczne oraz wzmocnienie efektu terapeutycznego przy zmniejszeniu skutków ubocznych, co otwiera realne perspektywy na opracowanie skuteczniejszych i bezpieczniejszych strategii leczenia pacjentek onkologicznych.

Rozprawę doktorską Pani mgr Anny Pogorzelskiej stanowi zbiór trzech oryginalnych artykułów opublikowanych w latach 2020-2024 w recenzowanych zagranicznych czasopismach znajdujących się w aktualnym wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MNiSW. Są to następujące prace:

- 1) Kuran D, **Pogorzelska A**, Wiktorska K. Breast Cancer Prevention-Is there a Future for Sulforaphane and Its Analogs? *Nutrients*. 2020 May 27;12(6):1559. doi: 10.3390/nu12061559.
- 2) **Pogorzelska A**, Mazur M, Świtalska M, Wietrzyk J, Sigorski D, Fronczyk K, Wiktorska K. Anticancer effect and safety of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane liposomal formulation in triple-negative breast cancer (TNBC) animal model. *Biomed Pharmacother*. 2023 May;161:114490. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114490.
- 3) **Pogorzelska A**, Świtalska M, Wietrzyk J, Mazur M, Milczarek M, Medyńska K, Wiktorska K. Antitumor and antimetastatic effects of dietary sulforaphane in a triple-negative breast cancer models. *Sci Rep*. 2024 Jul 11;14(1):16016. doi: 10.1038/s41598-024-65455-w

Dwa artykuły stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej to prace prezentujące oryginalne wyniki eksperymentalne, w których Doktorantka pełni rolę pierwszego autora. Udział mgr. Pogorzelskiej w przedstawionym dorobku publikacyjnym ma charakter kompleksowy i ewolucyjny – od przygotowania fundamentów teoretycznych, przez zaawansowane prace technologiczne, aż po samodzielną realizację kluczowych etapów badawczych w fazie eksperymentalnej.

W początkowej fazie prac Doktorantka wniosła istotny wkład w usystematyzowanie wiedzy na temat chemoprewencji raka piersi. Odpowiadała za krytyczny przegląd literatury naukowej, ze szczególnym uwzględnieniem specyfiki potrójnie ujemnego raka piersi (TNBC) oraz analizę dotychczasowych badań klinicznych nad sulforafanem (SFN). Jej rola obejmowała nie tylko syntezę danych, ale także wizualizację wyników poprzez przygotowanie rycin i tabel oraz aktywny udział w redagowaniu manuskryptu.



W kolejnym etapie badaczka wykazała się kompetencjami w zakresie opracowania i optymalizacji nośnika liposomalnego, który służył do jednoczesnego dostarczenia doksorubicyny i sulforafanu. Przeprowadziła kluczową charakterystykę fizykochemiczną tego układu, w tym badania profili uwalniania substancji czynnych, co stanowiło punkt wyjścia do oceny skuteczności nowej formy terapii.

Doktorantka samodzielnie zrealizowała wszystkie badania w modelach *in vitro*, oceniając wpływ badanych substancji na komórki nowotworowe. Brała również aktywny udział w badaniach przedklinicznych na modelach zwierzęcych (*in vivo*), uczestnicząc w końcowych etapach doświadczeń, zbieraniu materiału biologicznego oraz analizie efektów przeciwnowotworowych i antymetastatycznych (przeciwprzerzutowych).

Wkład doktorantki wykraczał poza prace laboratoryjne i obejmował: samodzielną interpretację wyników, przeprowadzanie zaawansowanych analiz statystycznych oraz graficzne opracowanie danych do publikacji, udział w tworzeniu koncepcji i metodologii badań dla kluczowych projektów doświadczalnych, aktywne pozyskiwanie środków finansowych na realizację części badań oraz kluczowy udział w procesie pisania i redagowania manuskryptów we wszystkich trzech publikacjach.

Wiodący udział mgr Pogorzelskiej w prowadzeniu badań będących podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora jest bezsprzeczny i jest zgodny z deklaracjami pozostałych współautorów oraz informacjami zawartymi w artykułach w sekcji „*Author contributions*”.

Prezentacja zbioru artykułów została poprzedzona streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, wykazem skrótów, wprowadzeniem w tematykę rozprawy doktorskiej, prezentacją hipotezy badawczej, celu i zakresu pracy, omówieniem głównych wyników przeprowadzonych doświadczeń. Następnie zamieszczono wnioski, wykaz rycin i tabel, bibliografię oraz wykaz osiągnięć. Do ocenianej dysertacji dołączono pełne teksty publikacji, które stanowią podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora.

### **Ocena spójności tematycznej zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych**

Zbiór publikacji cechuje się **pełną spójnością tematyczną**. Przejście od szerokiego przeglądu właściwości sulforafanu, przez zaprojektowanie nowoczesnego nośnika leku, aż po szczegółowe badania jego wpływu na przerzutowanie, świadczy o precyzyjnie zaplanowanym

procesie naukowym. Całość stanowi jednotematyczny, logicznie zamknięty cykl, który wnosi nową wiedzę w zakresie terapii skojarzonych i prewencji raka piersi.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że wszystkie załączone publikacje stanowią spójny tematycznie zbiór prac odpowiadający tematowi dysertacji. Dlatego stwierdzam także, że warunek ustawowy jaki powinna spełniać praca doktorska, w tym zakresie należy uznać za spełniony.

### **Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

Jak wspomniano powyżej rozprawa doktorska mgr Anny Pogorzelskiej opiera się na cyklu trzech publikacji naukowych, które koncentrują się na wykorzystaniu sulforafanu (SFN) – związku pochodzenia naturalnego występującego w warzywach kapustnych – w prewencji i terapii trójnegatywnego raka piersi (TNBC). Pierwsza publikacja wykazała, że SFN ma duży potencjał jako środek w chemoprewencji raka piersi oraz jako adjuwant (substancja wspomagająca) w terapiach skojarzonych z tradycyjnymi cytostatykami. SFN pomaga utrzymać funkcje homeostatyczne organizmu i może modulować odpowiedź na leczenie.

W drugiej publikacji opracowano i scharakteryzowano nowatorski liposomalny system dostarczania leków, zawierający jednocześnie sulforafan i doksorubicynę (DOX). Wykazano, że SFN podawany razem z DOX w formie liposomów wzmacnia działanie toksyczne na komórki nowotworowe, jednocześnie chroniąc prawidłowe komórki nabłonka gruczołu sutkowego. Doktorantka postuluje, że SFN zwiększa aktywność przeciwnowotworową DOX poprzez hamowanie mitozy oraz ułatwianie akumulacji doksorubicyny bezpośrednio w jądrze komórkowym. W badaniach na zwierzętach preparat ten niemal dwukrotnie silniej hamował wzrost guza TNBC w porównaniu do liposomów zawierających tylko doksorubicynę.

Trzecia faza badań skupiła się na wpływie niskich dawek SFN na progresję nowotworu i przerzuty. Potwierdzono, że niskie stężenia SFN skutecznie zmniejszają objętość guza oraz, co kluczowe, redukują liczbę przerzutów. Po raz pierwszy udowodniono, że SFN może chronić nie tylko przed uszkodzeniem serca (kardiotoksycznością), ale także istotnie ograniczać nefrotoksyczność (uszkodzenie nerek) oraz hepatotoksyczność (uszkodzenie wątroby) wywołaną przez chemioterapię doksorubicyną.

Doktorantka wykazała, że działanie SFN opiera się nie tylko na bezpośrednim niszczeniu komórek raka, ale także na modulowaniu układu odpornościowego i hamowaniu

procesu transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT), co utrudnia nowotworowi rozprzestrzenianie się.

Doktorantka poprawnie definiuje TNBC poprzez brak receptorów ER, PR oraz HER2. Warto jednak zauważyć, że w diagnostyce klinicznej (według wytycznych ASCO/CAP) za wynik negatywny dla ER i PR uznaje się ekspresję w mniej niż 1% jąder komórek nowotworowych. Sformułowanie „brak ekspresji” jest dopuszczalnym uproszczeniem, ale w pracy doktorskiej warto zaznaczyć, że chodzi o brak istotnej klinicznie ekspresji.

W punkcie 3. wniosków Doktorantka wskazuje, że sulforafan (SFN) zwiększa aktywność doksorubicyny (DOX) poprzez „kierowanie DOX do jądra komórkowego”. Doksorubicyna z natury wykazuje powinowactwo do jądra komórkowego (jako interkalator DNA). Jeśli SFN modyfikuje ten proces, warto doprecyzować, czy dzieje się to poprzez hamowanie pomp wypływu (np. glikoproteiny P), czy poprzez zmiany w przepuszczalności błon. Sformułowanie „kierowanie do jądra” brzmi nieco potocznie jak na mechanizm molekularny. Doktorantka słusznie zauważa w punkcie 5. i 6. wniosków, że niskie stężenia SFN mogą hamować wzrost guza i modulować układ odpornościowy. Należy jednak zaznaczyć, że zjawisko hormezy jest obosieczne. W literaturze przedmiotu wskazuje się czasem, że bardzo niskie dawki przeciwutleniaczy mogą paradoksalnie chronić komórki nowotworowe przed stresem oksydacyjnym indukowanym przez chemioterapię. Doktorantka powinna upewnić się, że wyniki badań własnych jednoznacznie rozstrzygają, iż w badanym modelu efekt był wyłącznie hamujący (przeciwnowotworowy). Doktorantka w dysertacji wymienia sześć podtypów molekularnych (BL1, BL2, M itd.). Nie jest jasne, czy Doktorantka odnosi się do klasyfikacji Lehmana z 2011 roku (6 podtypów), czy do jej późniejszej rewizji z 2016 roku, w której liczbę podtypów ograniczono do czterech (BL1, BL2, M i LAR), wykluczając podtypy IM (immunomodulacyjny) i MSL (mezenchymalny macierzopodobny) jako reprezentujące komponenty mikrośrodowiska, a nie same komórki guza.

Jeden z wniosków stwierdza, że efekt niskich dawek jest powiązany z "modulacją funkcjonowania układu odpornościowego". Jest to stwierdzenie bardzo ogólne. Brak informacji, czy Doktorantka miała na myśli aktywację limfocytów T cytotoksycznych, czy hamowanie komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego (MDSCs), czy może polaryzacji makrofagów z M2 na M1. Bez doprecyzowania, o jaki rodzaj immunomodulacji chodzi, wniosek ten ma niską wartość informacyjną.

Wspomniano o opracowaniu "stabilnego nośnika dla SFN i DOX". W podsumowaniu brakuje kluczowych parametrów tego nośnika. Stabilność SFN w roztworach wodnych jest problematyczna. Krytycznym punktem jest wykazanie, czy nośnik rzeczywiście poprawia stabilność SFN w porównaniu do wolnego związku w warunkach fizjologicznych, co w tekście zostało potraktowane bardzo skrótowo.

We wstępie Doktorantka wymienia sześć podtypów TNBC, ale w wynikach mówi o "skuteczności wobec TNBC" jako całości. Biorąc pod uwagę ogromną różnorodność TNBC (podtyp mezenchymalny reaguje inaczej niż podtyp luminalny z receptorem androgenowym), wyciąganie ogólnego wniosku o skuteczności bez zaznaczenia, na jakich konkretnie liniach komórkowych (modelach) uzyskano wyniki, jest nadinterpretacją.

Wyniki wskazują na skuteczne opracowanie stabilnego nośnika liposomowego dla sulforafanu (SFN) i doksorubicyny (DOX). Kluczowym wynikiem jest jednak wykazanie synergizmu działania obu substancji zamkniętych w jednym nośniku. Jest to istotne, ponieważ SFN jest związkiem o niskiej stabilności chemicznej. Wykazanie, że enkapsulacja chroni SFN przed degradacją, a jednocześnie pozwala na kontrolowane uwalnianie, jest mocnym punktem pracy. Warto byłoby szerzej skomentować, jak nośnik wpływa na farmakokinetykę DOX – czy ograniczenie jej biodostępności dla kardiomiocytów (serca) na rzecz kumulacji w guzie zostało bezpośrednio zmierzone w tkankach (biodystrybucja), czy wynika jedynie z obserwowanej mniejszej toksyczności ogólnej.

W pracy wykazano, że SFN redukuje toksyczne skutki uboczne DOX. Jest to jeden z najciekawszych wyników doświadczalnych. Mechanizm ten autorzy wiążą z właściwościami antyoksydacyjnymi SFN. Należy zwrócić uwagę na tzw. "paradoks antyoksydacyjny". Istnieje ryzyko, że substancja chroniąca serce przed stresem oksydacyjnym może również chronić komórki nowotworowe przed działaniem DOX (która częściowo działa poprzez indukcję RFT). Wyniki pracy sugerują jednak efekt odwrotny – nasilenie działania przeciwnowotworowego. Ten "selektywny synergizm" (ochrona komórek zdrowych przy jednoczesnym uwrażliwieniu rakowych) jest wynikiem wyjątkowym i wymaga bardzo silnego uzasadnienia mechanistycznego (np. poprzez szlak Nrf2).

Praca kładzie duży nacisk na potencjał niskich dawek SFN. Wyniki pokazują, że niskie stężenia SFN skutecznie hamują przerzutowanie i wzrost guza. Jest to podejście odważne, gdyż w toksykologii niskie dawki często kojarzone są z efektem hormetycznym (stymulacją). Wyniki wskazujące na modulację mikrośrodowiska guza (immunomodulację) przy niskich

dawkach są nowatorskie, ale wymagają doprecyzowania, które konkretnie populacje komórek układu odpornościowego (np. limfocyty Treg, MDSC) uległy zmianie.

Jak już wspomniano w podsumowaniu pracy pojawia się wniosek, że SFN zwiększa aktywność DOX poprzez „kierowanie jej do jądra komórkowego”. To stwierdzenie wymaga bardzo precyzyjnego opisu w sekcji wyników. Czy SFN wpływa na płynność błon, czy może hamuje pompy białkowe (MDR/P-gp), które aktywnie usuwają dokсорubicynę z jądra? Sam proces "kierowania" jest mało prawdopodobny bez udziału konkretnego transportera lub zmiany w strukturze chromatyny. Wykazanie tego mechanizmu za pomocą mikroskopii konfokalnej byłoby kluczowym dowodem wizualnym.

Analizy danych zawartych w rozprawie doktorskiej mgr Anny Pogorzelskiej, wskazuje, że:

- Wykres rozkładu wielkości (Ryc. 2A) dowodzi na obecność dwóch populacji cząstek: ok. 86 nm i 342 nm. Z punktu widzenia farmaceutycznego jest to układ polidispersyjny. Choć autorka słusznie zauważa, że obie populacje mieszczą się w limicie 400 nm pozwalającym na bierne celowanie w guz (efekt EPR), to jednak duża polidispersyjność może wpływać na powtarzalność uwalniania leku.
- Dodatni potencjał zeta jest interpretowany jako wskaźnik wysokiej stabilności i małej skłonności do agregacji. Warto byłoby jednak uzupełnić te dane o wykres zmian potencjału w czasie (np. po 30 dniach przechowywania), aby w pełni potwierdzić stabilność fizyczną nośnika.
- Wykresy uwalniania w pH 7,4 wykazują niemal zerowy wyciek DOX i SFN. To kluczowa informacja merytoryczna potwierdzająca bezpieczeństwo – lek nie uwalnia się przedwcześnie w krążeniu ogólnym.
- W środowisku kwaśnym (pH odpowiadające guzowi) uwalnianie wzrasta, ale osiąga jedynie 10% dla DOX i 1% dla SFN. Z punktu widzenia terapeutycznego jest to wartość relatywnie niska; można zadać pytanie, czy tak mała frakcja uwolniona w krótkim czasie jest wystarczająca do wywołania gwałtownego efektu cytotoksycznego, czy też mechanizm opiera się na endocytozie całych liposomów.
- Dane w tabeli 2 pokazują, że dla komórek TNBC (MDA-MB-231) wartości CI są znacznie poniżej 1 (np. 0.26 dla wyższych stężeń), co jednoznacznie potwierdza synergizm. Niezwykle istotnym elementem merytorycznym tej części jest wynik dla linii prawidłowej (MCF-10A), gdzie CI często przekracza 1 (np. 1.88 lub nawet 4.88), co wskazuje na antagonizm. Na wykresach i w tabelach jest to dowód na to, że SFN

chroni zdrowe komórki przed toksycznością DOX, jednocześnie nasilając jej działanie w raku.

- Wykresy kinetyki (Ryc. 3A) pokazują, że linia dla (DOX+SFN)-lip odchyła się znacząco od pozostałych grup po drugim podaniu leku.
- Doktorantka stosuje test Manna-Whitneya oraz inne testy istotności ( $p < 0,05$  do  $p < 0,0001$ ). Wysoka istotność statystyczna (\*\*\*\*) przy parametrach wzrostu guza uwiarygadnia wnioski o przewadze terapii skojarzonej nad monoterapią DOX-lip.
- Wykresy słupkowe poziomów ALT, AST (wątroba), mocznika (nerki) oraz CK-MB (serce) są kluczowe dla oceny profilu bezpieczeństwa. Co ciekawe, zauważalny jest statystycznie istotny spadek poziomów tych markerów w grupie (DOX+SFN)-lip w porównaniu do wolnej DOX lub nawet DOX-lip. Jest to bezpośredni, graficzny dowód na wielonarządowe działanie ochronne sulforafanu.
- Ciekawe spostrzeżenie merytoryczne wynika z porównania wykresów E i F (Rycina 3). Mimo że indeks proliferacji (Ki-67) pozostaje wysoki, indeks mitotyczny spada dwukrotnie. Sugeruje to, że mechanizm działania prezentowany na schematach nie polega na całkowitym zatrzymaniu cyklu komórkowego we wczesnych fazach, ale na blokowaniu samej mitozy, co jest spójne z mechanizmem działania SFN jako inhibitora tubuliny.

Podsumowując, dane na wykresach są zaprezentowane w sposób rzetelny, z zachowaniem standardów analizy statystycznej. Największą wartość merytoryczną przedstawia graficzne potwierdzenie selektywności działania liposomów skojarzonych.

Niezależnie od moich uwag i pytań, uważam, że największą wartością naukową pracy są trzy aspekty zaproponowane przez Doktorantkę:

- Połączenie suplementacji dietetycznej (SFN) z klasyczną chemioterapią w celu poprawy indeksu terapeutycznego leku.
- Doktorantka odważnie podejmuje temat „hormozy” i wykazuje, że niskie stężenia SFN, osiągalne drogą pokarmową, mają realny wpływ na mikrośrodowisko guza i hamowanie przerzutów.
- Opracowanie i charakterystyka współ-enkapsulowanych liposomów (SFN+DOX) stanowi istotny krok w stronę personalizacji medycyny i ograniczania toksyczności ogólnoustrojowej.


Metodyka badań jest kompleksowa – obejmuje badania fizykochemiczne nośników, testy *in vitro* na liniach komórkowych oraz zaawansowane modele *in vivo*. Doktorantka udowodniła, że SFN działa synergistycznie z DOX, nie tylko nasilając jej efekt cytotoksyczny w komórkach nowotworowych, ale – co kluczowe – chroniąc komórki prawidłowe (serca, nerek, wątroby). Wyniki dotyczące immunomodulacyjnego wpływu niskich dawek SFN są nowatorskie i otwierają nowe pole do dyskusji nad dietoprofilaktyką w trakcie aktywnej terapii onkologicznej. Podsumowując, rozprawa mgr Anny Pogorzelskiej stanowi spójny, dojrzały naukowo i rzetelnie przygotowany materiał. Doktorantka wykazała umiejętność planowania skomplikowanych doświadczeń i krytycznej analizy danych. **Praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Rekomenduję ją jako wartościowy wkład w rozwój nauk farmaceutycznych.**

#### Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Anny Pogorzelskiej spełnia warunki określone w art.187 ust. 1 i 2 Ustawie Prawo o szkolnictwo wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2023 r. poz. 742). Doktorantka dowiodła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. Stwierdzam także, że oceniana przeze mnie praca doktorska istotnie poszerza stan wiedzy w dyscyplinie nauk farmaceutycznych. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Leków w Warszawie o dopuszczenie mgr Anny Pogorzelskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową otrzymanych przez Doktorantkę wyników o charakterze aplikacyjnym, posiadających bardzo duży potencjał komercyjny wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Leków w Warszawie o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 10/01/2026



prof. dr hab. Maciej Wnuk