



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII KOMÓRKI

ul. Rokietnicka 5D
60-806 Poznań
www.katbiolkom.ump.edu.pl

tel.: 61 854 71 70
fax: 61 854 71 69
e-mail: katbiolkom@ump.edu.pl

Poznań, 4 listopada 2025 r.

prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. **Mirosław Andrusiewicz**
Kierownik Pracowni Epigenetyki
Katedra i Zakład Biologii Komórki
Uniwersytet Medyczny im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Rokietnicka 5D
60-806 Poznań
tel./fax: 61 854 71 66/69
e-mail andrus@ump.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Sylwii Stanisławy Wilk

**w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora
w dziedzinie nauk weterynaryjnych, w dyscyplinie weterynaria**

pt.: „Ocena molekularnego mechanizmu przerzutowania komórek kostniakomięsaka psów – badania proteomiczne z uwzględnieniem zastosowania nanocząstek złota”

“Analysis of the molecular mechanism of canine osteosarcoma metastasis – proteomic analyses including the use of gold nanoparticles”

Recenzję opracowano na podstawie powołania przez Radę Dyscypliny Weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, na posiedzeniu w dniu 24 września 2025 r. uchwałą nr 57/WET-2024/2025 podpisaną przez Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria SGGW dr.hab. Tomasza Sadkowskiego, prof. SGGW oraz dostarczonej wersji egzemplarza pracy doktorskiej.

Promotor rozprawy doktorskiej: dr hab. **Katarzyna Agnieszka Zabielska-Koczywąs**, prof. SGGW
Laboratorium Nanoonkologii Doświadczalnej i Klinicznej
Katedra Chorób Małych Zwierząt i Klinika
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Znaczenie podjętej tematyki

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. wet. **Sylwii Stanisławy Wilk**, zatytułowana „*Ocena molekularnego mechanizmu przerzutowania komórek kostniakomięsaka psów – badania proteomiczne z uwzględnieniem zastosowania nanocząstek złota*”, koncentruje się na zrozumieniu molekularnych mechanizmów przerzutów kostniakomięsaka u psów i ocenie potencjału nanocząstek złota (AuNPs) w hamowaniu tego procesu. Biorąc pod uwagę agresywny charakter kostniakomięsaka i jego tendencję do szybkich przerzutów badania te wydają się być bardzo istotne, również w aspekcie wyników leczenia. Identyfikując kluczowe białka zaangażowane w przerzuty, takie jak A2M, badania przyczyniają się do lepszego zrozumienia biologii kostniakomięsaka. Autorka analizuje potencjał AuNPs jako środków terapeutycznych, które mogą stanowić podstawę do opracowania nowych strategii zwalczania przerzutów i poprawy wyników leczenia. Mimo, iż badania bezpośrednio odnoszą się do wyzwania w onkologii weterynaryjnej, odkrycia z badań u psów mogą potencjalnie zostać przeniesione na onkologię człowieka, oferując potencjalne narzędzia do poprawy leczenia kostniakomięsaka.

Ocena merytoryczna pracy

Badania nad kostniakomięsakiem stanowią istotne wyzwanie onkologii weterynaryjnej. Pomimo postępu w metodach leczenia, rokowania pozostają niepewne, co podkreśla pilną potrzebę opracowania nowych strategii terapeutycznych. Niniejsza rozprawa doktorska, autorstwa lek. wet. **Sylwii Stanisławy Wilk**, stanowi odpowiedź na to zapotrzebowanie, koncentrując się na molekularnych mechanizmach przerzutowania. Wykorzystując analizę proteomiczną oraz zastosowanie nanocząstek złota, autorka bada kluczowe aspekty progresji choroby. Biorąc pod uwagę złożoność i dewastujący wpływ kostniakomięsaka, praca Doktorantki wnosi istotny wkład w rozwój przedklinicznej onkologii weterynaryjnej, w szczególności badania nad rolą alfa-2-makroglobuliny (A2M) oraz potencjałem nanocząstek złota stabilizowanych glutationem (AuNPs-GSH), otwierają nowe perspektywy w poszukiwaniu skuteczniejszych terapii.

Oryginalność i trafność podjętej tematyki

Kostniakomięsak jest jednym z najczęściej występujących nowotworów kości u psów, powodującym ból, upośledzenie szeregu funkcji organizmu i skrócenie życia. Dostępne terapie (amputacja, chemioterapia) mają ograniczoną skuteczność, a dodatkowo wysoki odsetek przerzutów wpływa na proces leczenia. Istnieje pilna potrzeba opracowania

skuteczniejszych strategii terapeutycznych. Badania koncentrują się na zrozumieniu molekularnych mechanizmów, które napędzają rozwój, progresję i przerzutowanie osteosarcomy. Identyfikacja kluczowych genów, białek i szlaków sygnałowych jest niezbędna do opracowania terapii celowanych.

Nanocząstki złota wykazują obiecujące właściwości w zastosowaniach medycznych, w tym w onkologii. Mogą być wykorzystywane jako nośniki leków, środki obrazujące lub modyfikatory odpowiedzi biologicznej komórek nowotworowych. Ich potencjał w leczeniu nowotworów jest obecnie obszarem nie do końca zbadanym.

Oryginalność ocenianej rozprawy leży w jej kompleksowym podejściu, łączącym proteomikę i nanotechnologię w kontekście specyficznej choroby weterynaryjnej, jaką jest kostniakomięsak. Podczas gdy badania nad nanocząstkami złota w onkologii są coraz powszechniejsze, ich zastosowanie w odniesieniu do psiego kostniakomięsaka i szczegółowa analiza mechanizmów molekularnych (w tym roli A2M) stanowią innowacyjne połączenie.

Praca doktorska lek. wet. **Sylwii Stanisławy Wilk** miała na celu charakterystykę molekularną komórek kostniakomięsaka, w tym zbadanie wpływu alfa-2-makroglobuliny na biologię komórek, oraz ocenę, czy nanocząstki złota mogą modulować proces przerzutowania i czy wpływają na poziom A2M w warunkach *in vitro* oraz *in ovo*.

W celu lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów choroby przeanalizowano profile proteomiczne linii OSCA-8, OSCA-32 i CnOb oraz zidentyfikowano białka, które różnicują komórki OSA od zdrowych osteoblastów. Autorka skupia się na określeniu wpływu A2M na zdolność migracji komórek nowotworowych *in vitro* oraz analizie wpływu nanocząstek złota stabilizowanych glutationem na kluczowe etapy procesu przerzutowania, takie jak: migracja, angiogeneza i klonogenność, *in vitro* oraz *in ovo*. Dodatkowo Doktorantka zbadła wpływ AuNPs-GSH na modulację ekspresji A2M i ich potencjalnego mechanizmu przeciwnowotworowego.

Zważywszy na ograniczone opcje terapeutyczne i niekorzystne rokowania dla psów z kostniakomięsakami, poszukiwanie nowych celów terapeutycznych i metod leczenia ma bezpośredni wpływ na poprawę jakości i długości życia zwierząt dotkniętych tą chorobą. Dodatkowo, z uwagi na podobieństwa między ludzkim i psim kostniakomięsakiem, wyniki badań mogą potencjalnie przyczynić się do rozwoju onkologii komparatywnej i w przyszłości mieć implikacje dla leczenia nowotworów w populacji ludzkiej.

Ocena formalna i metodologiczna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. wet. **Sylwii Stanisławy Wilk** stanowi zbiór trzech manuskryptów opatrzonych wspólnym omówieniem. Opracowanie liczy 59

ponumerowanych stron. Dodatkowo załączono kopie trzech publikacji pełnotekstowych będących integralną częścią pracy i stanowiące podstawę przedstawionej do oceny rozprawy wraz z oświadczeniami współautorów dotyczące ich indywidualnego wkładu w powstanie prac.

Publikacja 1 (przeglądowa); IF=6,2; 140 pkt. MNiSW

Wilk, S. S., & Zabielska-Koczywąs, K. A. (2021). Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3639. <https://doi.org/10.3390/ijms22073639>

Keywords: canine OSA; metastasis; molecular mechanisms; cell lines; in vitro; in vivo; animal models

Udział doktorantki: przeprowadzenie przeglądu literatury, przygotowanie tabel i rycin, napisanie zasadniczej części manuskryptu.

Publikacja 2 (oryginalna); IF=4,9; 140 pkt. MNiSW

Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywąs, K. A. (2024). Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms25073989>

Keywords: A2M; canine osteosarcoma; MALDI-TOF/TOF MS; SimpleWestern; wound-healing assay

Udział doktorantki: zaplanowanie wraz z Promotorką koncepcji badań, pozyskanie dofinansowania, zarządzanie projektem, przeprowadzenie części eksperymentów, opracowanie metodologii, analiza i interpretacja wyników, walidacja i wizualizacja wyników, udział w przygotowaniu i powstaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Publikacja 3 (oryginalna); IF=4,9; 140 pkt. MNiSW

Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywąs, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles – A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102>

Keywords: alpha 2 macroglobulin; canine osteosarcoma; gold nanoparticles; metastasis; migration; Simple Western

Udział doktorantki: opracowanie koncepcji badań, pozyskanie finansowania, zarządzanie projektem, udział w prowadzeniu eksperymentów, opracowanie metodologii, walidacja i porządkowanie danych, przygotowanie części graficznej oraz napisanie pierwotnej wersji manuskryptu i udział w jego redakcji.

Łączny współczynnik oddziaływania prac składających się na rozprawę doktorską wynosi IF=16, a ich sumaryczna punktacja MNiSW 420 pkt.

We wszystkich pracach lek. wet. **Sylwia Stanisława Wilk** jest wiodącym autorem. Wszyscy współautorzy prac wchodzących w skład cyklu wyrazili zgodę na wykorzystanie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Oświadczenia Doktorantki, oraz współautorów a także CRediT *Author Statements* w publikacjach wskazują na indywidualny wkład Doktorantki w powstanie prac. Udział lek. wet. **Sylwii Stanisławy Wilk** w przygotowaniu wszystkich publikacji oraz w przeprowadzeniu części doświadczalnej prac oryginalnych, będących podstawą przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej był znaczący.

Omówienie wprowadzenia i cyklu publikacji będących podstawą recenzji

Wprowadzenie do cyklu prac

Zgodnie z obowiązującymi regulacjami, dopuszczającymi rozprawę doktorską w formie zbioru powiązanych tematycznie, opublikowanych artykułów naukowych, kluczowe staje się odpowiednie omówienie tego cyklu. Takie przedstawienie całości pozwala na zaprezentowanie wiedzy teoretycznej kandydata oraz jego umiejętności w zakresie samodzielnego prowadzenia badań i pisanie publikacji. W mojej opinii, tego typu wprowadzenie jest niezwykle ważne, ponieważ ułatwia recenzentom zrozumienie toku rozumowania doktorantki, celów badawczych, oryginalności wyników oraz spójności tematycznej poszczególnych prac.

Opracowanie ma standardowy układ. Po stronie tytułowej, oświadczeniu Promotorki i Doktorantki oraz podziękowaniach, występuje spis treści i streszczenie w języku polskim i angielskim.

Streszczenie dobrze wprowadza czytelnika w dalsze rozdziały. Spis treści zawiera jedynie główne rozdziały (brak podrozdziałów) utrudnia odnalezienie się w opracowaniu.

Następnie Autorka zamieszcza listę artykułów wchodzących w skład cyklu rozprawy wraz z danymi bibliometrycznymi oraz wykaz skrótów po którym występują dalsze części opracowania.

Rozdział zatytułowany „Wprowadzenie” stanowi ciekawy początek do dalszych rozważań i omówienia poszczególnych prac. Przygotowany jest on bardzo starannie, podzielony na czytelne podrozdziały. Wskazuje na opanowanie przez Doktorantkę tła prowadzonych badań. Mimo niewielkich błędów edytorskich (np. brak spacji po kropce w wyjaśnianiu skrótów ang.), które również pojawiają się w dalszej części opracowania, wstęp jest bardzo klarowny i naświetla dalsze rozważania Autorki. Dużym atutem jest wskazanie na

końcu podrozdziału 1.1.2 ograniczeń związanych z publikacją pogładową, co świadczy o śledzeniu przez Doktorantkę bieżących badań w tej dziedzinie.

W mojej opinii zarówno cele, jak i hipoteza badawcza, są w większości prawidłowo zdefiniowane. Cele obejmują również publikację przeglądową, która często pomijana jest w tego typu opracowaniach.

Warto byłoby jednak w przypadku każdego z celów dodać informację dotyczącą publikacji, w której został on zrealizowany. Przykładowo, cel 1 został zrealizowany w publikacji 2, cele 2-4 w publikacji 2, cel 5 w publikacji 3 a ostatni cel 6 w publikacjach 2-3. Usystematyzowanie tego ułatwiłoby pracę recenzentowi.

W rozdziale 3 zostały scharakteryzowane materiały i metody części badawczej rozprawy doktorskiej (dotyczące artykułów 2 i 3). W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na silną stronę opracowania – Doktorantka dobrze opisała ogólne metody i skupiła się jedynie na szczegółach, które nie były w pełni opisane w publikacjach. Dodatkowym plusem jest również wskazanie kryteriów doboru analizowanych w pracach linii komórkowych.

Mimo widocznych starań Doktorantki, w tym rozdziale pojawia się żargon, często używany również przez bardziej doświadczonych naukowców a wynikający zapewne z publikowania głównie w czasopiśmie anglojęzycznym. Przykładem jest określenie „komórki traktowano” – bardziej trafne jest „inkubowano z”, „stymulowano” itp. Dodatkowo wraz z symbolem \geq następuje miejscowa zmiana kroju czcionki. W podrozdziale 3.2.9 w fragmencie średnia \pm odchylenie standardowe podano wyjaśnienie (ang. *standard deviation, SD*), który jest zbędny. Pojawia się również w wykazie skrótów. Wynika to najprawdopodobniej z tłumaczenia materiałów i metod opisanych w pracy 3. Dodatkowo, sugeruję zastąpienie określenia „test Tukeya po fakcie” określeniem „*post hoc* Tukeya” (uwaga ta dotyczy również dalszych części opracowania).

Kolejny rozdział zatytułowany „Wyniki” opisuje przede wszystkim prace oryginalne. Autorka wyjaśnia, w tym rozdziale m.in. dlaczego do dalszych analiz wytypowano A2M oraz opisuje główne wyniki badań. Chciałbym również zaakcentować pozytywny aspekt opracowania, gdyż Doktoranta odwołuje się do swoich prac oryginalnych, będących podstawą doktoratu, nie przepisując poszczególnych części tych prac. Drobnym mankamentem tego rozdziału jest nagromadzenie literówek w pierwszym zdaniu drugiego akapitu (W analizie Simple Western ...).

W przypadku przedstawionych przez Doktorantkę wyników nasuwają mi się następujące pytania, na które chciałbym uzyskać odpowiedź podczas publicznej obrony pracy:

Rozdział 4.3.

- jaka była podstawa wyboru stężeń A2M (10 mM i 30 mM) dla np. testu blizny (czy wybór ma uzasadnienie w literaturze czy przeprowadzono optymalizację eksperymentalną?)
- czy sprawdzono stężenie A2M w medium komórek (zarówno CnOB jak i OSCA-8, OSCA-32)?
- czy przeprowadzono test blizny dla linii nienowotworowej komórek, zarówno niestymulowanej, jak i stymulowanej podanymi stężeniami A2M?

Rozdział 4.4.

- jaka była podstawa wyboru stężeń AuNPs-GSH (200 $\mu\text{g/ml}$ i 500 $\mu\text{g/ml}$) np. dla testu migracji i w przypadku badań modelu CAM oraz pozostałych badań?

Rozdział 4.5.

- jaki może być potencjalny mechanizm (szlaki/geny docelowe) działania AuNPs-GH prowadzące do stymulacji ekspresji A2M?

W rozdziale Wyniki (ale również w publikacji oryginalnej stanowiącej podstawę opisu) znajdują się określenia typu „stwierdzono wysoce istotny ($p \leq 0,001$) wzrost ekspresji”, które odnosi się do uzyskanej wartości statystyki testowej i wartości p . W związku z tym, iż wartość statystyki i uzyskana dzięki niej wartość p odnosi się do hipotezy 0, **chciałbym aby doktorantka podczas obrony wyjaśniła dokładniej zastosowany skrót myślowy i wskazała na wartość, która może coś więcej powiedzieć o wielkości efektu.** Dlaczego samo " $p < 0,05$ " nie wystarcza i jakie inne miary (np. wielkość efektu, moc statystyczna) wzięła pod uwagę.

„Dyskusja” jest sprawnie poprowadzona i poza uwagami edytorskimi (żargon, zmiana rodzaju fontu itp.) nie mam do niej zastrzeżeń.

W mojej opinii bardzo istotną częścią pracy są wnioski. Zabrakło jednak połączenia celów i wniosków oraz wskazania, na podstawie których publikacji zostały wyciągnięte. Wydaje się jednak, że większość z wniosków odnosi się do publikacji nr 3. Dużym atutem jest wskazanie dalszych etapów i/lub znaczenia teoretycznego i praktycznego uzyskanych wyników.

Piśmiennictwo w opracowaniu zawiera 86 pozycji dotyczących omawianych zagadnień, w tym 40 pozycji z ostatniego dziesięciolecia, co wskazuje, iż doktorantka śledzi aktualne trendy naukowe. Tutaj jednak Doktorantka nie ustrzegła się błędu zbyt dużego zaufania do menagerów piśmiennictwa (np. niespójne formatowanie pozycji 45 i 80).

Opis wyników i wnioski z cyklu prac

Publikacja 1. "*Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis*", miała na celu podsumowanie i uporządkowanie wiedzy na temat molekularnych mechanizmów przerzutów w kontekście kostniakomięsaka (*osteosarcoma*, OSA) u psów. OSA charakteryzuje się wysoką złośliwością i częstymi przerzutami, zwłaszcza do płuc, co prowadzi do śmierci większości psów. Proces przerzutowy jest złożony i obejmuje wiele etapów. Zrozumienie mechanizmów molekularnych tego procesu jest kluczowe dla opracowania nowych strategii terapeutycznych. Ze względu na podobieństwo między OSA u psów i ludzi, psy mogą służyć jako model spontanicznej choroby u ludzi.

Przegląd miał na celu podsumowanie aktualnej wiedzy na temat genów i białek zaangażowanych w proces przerzutów OSA.

Autorzy omówili rolę różnych genów i białek, w tym p63, STAT3, Snail2, ezryny, p-ERM, HGF-SF, EGFR, miR-9 i miR-34a, które w badaniach *in vitro* i/lub *in vivo* wykazały potencjalny udział w kaskadzie przerzutowej OSA. Podkreślili, że dalsze badania były konieczne dla pełnego zrozumienia mechanizmów molekularnych przerzutów OSA.

Określenie molekularnych postaw procesu przerzutowania może przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych. W przeglądzie podkreślono rolę kilku białek w przerzutach u psów, w tym EGFR w migracji komórek nowotworowych, HGF-SF i receptor Met w inwazji oraz ANp63, ezrin, p-ERM, Snail2, miR-9 i miR-34a w migracji i inwazji. Autorzy sugerują, że w dalszych badaniach walidacja uzyskanych wyników powinna nastąpić metodami *in vivo*.

Artykuł ten stanowi obszerne i dobrze zorganizowane podsumowanie aktualnej wiedzy na temat molekularnych mechanizmów przerzutów kostniakomięsaka u psów. Szczególnie cenne jest uwzględnienie zarówno badań *in vitro*, jak i *in vivo*, co pozwala na pełniejsze zrozumienie złożoności tego procesu. Autorki trafnie podkreślają podobieństwa między kostniakomięsakiem u psów i ludzi, co uwydatnia potencjał wykorzystania tych zwierząt jako modelu choroby. Skupienie uwagi na konkretnych genach i białkach, oraz mikroRNA, w połączeniu z jasnym przedstawieniem ich roli w poszczególnych etapach metastazy, czyni przegląd cennym źródłem wiedzy dla naukowców i klinicystów zajmujących się badaniem i leczeniem nowotworów kości. Wyraźnie zidentyfikowane kierunki przyszłych badań dodatkowo podkreślają wartość artykułu, wskazując na obszary, które wymagają dalszej eksploracji w celu opracowania skutecznych strategii terapeutycznych.

W załączonej **Publikacji 2.** "*Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration*" autorzy skupiają się na identyfikacji molekularnych celów, wpływających na metastazę, która jest kluczowa dla opracowania nowych strategii terapeutycznych OSA.

Głównym celem badania było zidentyfikowanie białek, które różnią się ekspresją w liniach komórkowych OSA o różnym stopniu złośliwości, w porównaniu z prawidłowymi psimi osteoblastami. Dodatkowym celem było porównanie zdolności migracji komórek OSA i powiązanie ich z cechami złośliwości poszczególnych linii komórkowych.

Analiza proteomiczna z wykorzystaniem spektrometrii masowej MALDI-TOF/TOF MS pozwoliła na zidentyfikowanie ośmiu białek, które różniły się ekspresją w liniach komórkowych OSA w porównaniu z prawidłowymi osteoblastami. Były to: białko związane z rzęskami i wićmi (CFAP298), ogólny czynnik transkrypcyjny II-I (GTF2I), białko związane z zespołem lustrzanego obrazu polidaktylii 1 (MIPOL1), alfa-2-makroglobulina, mutaza fosfoglicerynianowa 1 (PGAM1), ubikwityna (UB2L6), białko adapterowe związane z receptorem ectodysplazyny A (EDARADD) oraz białko 72 zawierające powtórzenia bogate w leucynę (LRRRC72). Analiza western blot potwierdziła niższą ekspresję A2M w komórkach OSA w porównaniu z osteoblastami. Badanie migracji komórek wykazało, że A2M hamuje migrację komórek OSA.

Badanie wskazuje, że A2M może odgrywać istotną rolę w procesie przerzutów kostniakomięsaka i potencjalnie działać jako środek przeciwdziałający przerzutom. Autorzy podkreślają jednak, że konieczne są dalsze badania *in vitro* i *in vivo*, aby potwierdzić tę rolę i zbadać mechanizmy działania A2M w OSA.

Identyfikacja potencjalnej roli A2M w kontekście przerzutów kostniakomięsaka jest nowym odkryciem. Zastosowanie spektrometrii masowej MALDI-TOF/TOF MS i techniki western blot zwiększa wiarygodność uzyskanych wyników. Porównanie linii komórkowych OSA o różnym stopniu złośliwości (OSCA-8 i OSCA-32) umożliwia lepsze zrozumienie wpływu identyfikowanych białek na proces przerzutów. Wyniki badań migracji komórek *in vitro* wspierają hipotezę o roli A2M jako inhibitora migracji.

Badanie opiera się jednak głównie na badaniach *in vitro*, co ogranicza możliwość bezpośredniego przełożenia wyników na sytuację *in vivo*. Badanie nie wyjaśnia też w pełni molekularnych mechanizmów, poprzez które A2M wpływa na migrację komórek OSA. Badanie skupia się na białku A2M, podczas gdy inne zidentyfikowane białka mogłyby również mieć znaczenie w procesie metastazy.

Ogólnie, artykuł ten przedstawia bardzo obiecujące wyniki dotyczące potencjalnej roli A2M w przeciwdziałaniu przerzutom kostniakomięsaka. Odkrycie to może być punktem wyjścia do opracowania nowych strategii terapeutycznych.

Nanocząstki złota, ze względu na swoje unikalne właściwości są obiecującymi narzędziami w terapii nowotworów, zarówno jako systemy dostarczania leków, jak i potencjalne materiały przeciwdziałające przerzutom. Celem **Publikacji 3**. "*The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles – A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines*" była ocena właściwości nanocząstek złota stabilizowanych glutationem (Au-GSH NPs) w aspekcie przeciwdziałania przerzutom, poprzez ich wpływ na migrację, proliferację i tworzenie kolonii przez komórki OSA *in vitro*, a także ich właściwości antyangiogenne na modelu błony kosmówkowo-omoczniowej (CAM) zarodka kurzego. Dodatkowo badano, czy efekty te są związane ze zmianami w ekspresji alfa-2-makroglobuliny, która odgrywa istotną rolę w procesie przerzutów.

Wykazano, że Au-GSH NPs znacząco hamują migrację i tworzenie kolonii w komórkach OSA (linie komórkowe OSCA-8, OSCA-32 i D-17) w stężeniu 200 µg/ml. Co ciekawe, w stężeniu 500 µg/ml Au-GSH NPs hamowały angiogenezę na modelu CAM i migrację komórek nowotworowych, ale miały słabszy wpływ na tworzenie kolonii. Badania wykazały również zwiększenie ekspresji A2M w komórkach nowotworowych po leczeniu Au-GSH NPs.

Połączenie badań *in vitro* na liniach komórkowych z modelem *in ovo* CAM zapewnia kompleksowy wgląd w działanie Au-GSH NPs na różnych etapach przerzutów. Analiza migracji, proliferacji, angiogenezy i ekspresji A2M pozwala na zrozumienie kompleksowego działania Au-GSH NPs. Wykorzystanie Au-GSH NPs, które wykazują niską immunogenność i dobrą rozpuszczalność, jest obiecujące w kontekście przyszłych zastosowań. Odkrycie, że działanie Au-GSH NPs wiąże się ze wzrostem ekspresji A2M, dostarcza nowego wglądu w mechanizmy działania tych nanocząstek.

W pracy tej wykazano potencjał nanocząstek Au-GSH NPs w przeciwdziałaniu przerzutom w kostniakomięsaka u psów, co może być związane ze zwiększeniem ekspresji A2M. Jednak jak sami autorzy wskazują, istnieje konieczność dalszych badania *in vitro*, a w szczególności *in vivo*, aby lepiej zrozumieć mechanizmy molekularne leżące u podstaw tych efektów i ocenić znaczenie kliniczne AuNPs w onkologii weterynaryjnej.

Podsumowanie artykułów jako cyklu prac

Niniejszy cykl prac opatrzony wspólnym tytułem „*Ocena molekularnego mechanizmu przerzutowania komórek kostniakomięsaka psów – badania proteomiczne z uwzględnieniem zastosowania nanocząstek złota*”, stanowiący podstawę rozprawy doktorskiej, skupia się na badaniu mechanizmów molekularnych i możliwości terapeutycznych w kontekście przerzutów kostniakomięsaka u psów, dla którego leczenie pozostaje wyzwaniem. Prace te łączy cel nadrzędny: identyfikacja czynników wpływających na proces metastazy i opracowanie nowych strategii, które mogłyby poprawić rokowania psów z OSA. Pierwsza praca stanowiła kompleksowy przegląd literaturowy, w którym zidentyfikowano kluczowe geny i białka potencjalnie zaangażowane w przerzuty OSA. Analiza ta posłużyła jako fundament do ukierunkowania dalszych badań eksperymentalnych.

Druuga praca miała charakter proteomiczny i koncentrowała się na identyfikacji białek, które różnicują komórki OSA o różnym stopniu złośliwości. Odkryto, że alfa-2-makroglobulina wykazuje obiecujące właściwości hamujące migrację komórek nowotworowych, co sugeruje jej rolę w procesie metastazy. Wyniki te stanowiły podstawę do pogłębionych badań nad A2M, również w trzeciej pracy, która kontynuuje wątek terapeutyczny, badając wpływ nanocząstek złota stabilizowanych glutationem na różne etapy przerzutów OSA, w tym angiogenezę, migrację komórek i tworzenie kolonii. Odkryto, że Au-GSH NPs wykazują potencjał przeciwdziałania przerzutom, co łączy się ze zwiększeniem ekspresji A2M, stanowiąc potencjalną strategię terapeutyczną.

Podsumowując, cykl prac stanowi spójną całość, od szerokiego przeglądu literaturowego po identyfikację konkretnych celów molekularnych i testowanie potencjalnych strategii terapeutycznych opartych na nanocząstkach. Badania te wnoszą istotny wkład w zrozumienie molekularnych mechanizmów metastazy OSA u psów i otwierają drogę do opracowania nowych, skuteczniejszych metod leczenia.

Chciałbym dodatkowo podkreślić, że przytoczone przeze mnie w recenzji uwagi i wątpliwości nie podważają merytorycznej wartości rozprawy i nie wpływają na moją pozytywną ocenę zawartości pracy.

Wnioski końcowe

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w formie cyklu artykułów i jej opracowanie pt.: „*Ocena molekularnego mechanizmu przerzutowania komórek kostniakomięsaka psów – badania proteomiczne z uwzględnieniem zastosowania nanocząstek złota*” autorstwa lek. wet

Sylwii Stanisławy Wilk została starannie przygotowana. Doktorantka poprawnie sformułowała problem naukowy i zaproponowała odpowiednie metody badawcze zarówno w przypadku modeli *in vitro*, jak i *in ovo*. Wyniki badań są cenne i stanowią ważny punkt wyjścia do dalszych prac nad mechanizmami powstawania, rozwoju i przerzutowania OSA. Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca lek. wet. Sylwii Stanisławy Wilk odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim przewidzianym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) oraz Uchwale Nr 89-2022/2023 Senatu SGGW z dnia 26 czerwca 2023 roku w sprawie uchwalenia Regulaminów przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Biorąc powyższe, wnioskuję o dopuszczenie lek. wet. Sylwii Stanisławy Wilk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając nowatorski charakter badań i wagę podjętej tematyki prac składających się na rozprawę doktorską (co przełożyło się na wysokie wskaźniki bibliometryczne: IF=16, punktacja MNiSW 420 pkt., liczba cytacji bez autocytacji – 21) wnoszę do Rady Dyscypliny Weterynarii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o **wyróżnienie pracy**.

Uzasadnienie szczegółowe wniosku o wyróżnienie

Rozprawa doktorska lek. wet. Sylwii Stanisławy Wilk stanowi znaczący wkład w rozwój wiedzy na temat złożonego procesu przerzutowania w kostniakomięsaku u psów. Uzasadniając wyróżnienie tej pracy, podkreślam jej nowatorski charakter, kompleksowość podejścia badawczego oraz potencjalne implikacje kliniczne. Praca integruje różne metody badawcze, zaczynając od przeglądu literatury, poprzez analizy proteomiczne, aż po badania *in vitro* i *in ovo* w celu holistycznego zrozumienia mechanizmów przerzutowania. Takie podejście interdyscyplinarne pozwala na uzyskanie bardziej kompleksowych i wiarygodnych wyników niż w przypadku zastosowania tylko jednej metody.

Podsumowując, rozprawa doktorska autorstwa Sylwii Stanisławy Wilk charakteryzuje się nowatorskim podejściem, wysokim poziomem naukowym oraz potencjalnymi implikacjami terapeutycznymi. Ponadto jest to praca, która w sposób istotny poszerza wiedzę na temat biologii kostniakomięsaka psów i zasługuje na wyróżnienie.

Poznań, 4 listopada 2025 r.



PODPIS ZAUFANY

**MIROSLAW
ANDRUSIEWICZ**

04.11.2025 14:35:48 GMT+1

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym