



Dr hab. Jerzy Gubernator, prof. UWr

Wrocław, 18.11.2025

**Recenzja rozprawy doktorskiej Sylwii Stanisławy Wilk
pt. „Ocena molekularnego mechanizmu przerzutowania komórek kostniakomięsaka
psów – badania proteomiczne z uwzględnieniem zastosowania nanocząstek złota”**

Rozprawa Doktorska wykonana pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Agnieszki Zabielskiej-Koczywąg, prof. SGGW, z Laboratorium Nanoonkologii Doświadczalnej i Klinicznej, Katedry Chorób Małych Zwierząt i Kliniki w Instytucie Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie.

Kostniakomięsak psów (OSA) należy do najczęstszych i najbardziej agresywnych nowotworów układu kostnego, charakteryzując się szybkim tworzeniem przerzutów oraz opornością na stosowane metody leczenia. Pomimo postępu w chirurgii onkologicznej i chemioterapii, rokowanie pacjentów pozostaje niekorzystne, głównie z powodu wczesnego rozsiewu komórek nowotworowych do płuc. Zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za migrację i inwazję komórek nowotworowych, jak również poszukiwanie nowych terapii ukierunkowanych na proces przerzutowania, stanowi jeden z najważniejszych kierunków współczesnych badań w onkologii weterynaryjnej. Generalnie nowotwory kości są jednymi z najtrudniejszych nowotworów do leczenia, dotyczy to tak samo przerzutów innych nowotworów do kości, stąd też ważność zagadnienia którego podjęła się doktorantka. W tym kontekście rozprawa mgr Sylwii Stanisławy Wilk jest pracą kompleksową i ambitną, obejmującą zarówno dogłębną analizę molekularnych podstaw przerzutowania OSA, jak i ocenę przeciwp przerzutowego działania glutationowych nanocząstek złota (AuNPs-GSH).

Dysertacja, przygotowana jako cykl trzech publikacji o łącznym IF wynoszącym 16 oraz 420 pkt., wyróżnia się spójnością tematyczną, interdyscyplinarnym charakterem oraz znacznym udziałem autorki we wszystkich etapach badań. Dysertacja liczy ok. 80 stron części zasadniczej i została przygotowana jako praca oparta na cyklu trzech publikacji:

1. **Wilk, S. S., & Zabielska-Koczywąg, K. A. (2021).** Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3639. (IF=6.2, 140 MNiSW)
2. **Wilk, S. S., Michałak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywąg, 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. Artykuł oryginalny proteomiczny (IF=4.9, 140 MNiSW)
3. **Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywąg, 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. (IF=4.9, 140 MNiSW)

We wszystkich publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem co świadczy o jej dominującym wkładzie. Układ rozprawy jest przejrzysty i kompletny: Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz pełne artykuły wraz z oświadczeniami współautorów.

Praca została poprzedzona rozdziałami obejmującymi Streszczenie, Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki oraz Dyskusję syntetyczną. Rozdziały te zostały napisane starannie i spełniają swoją funkcję — łączą publikacje w jeden spójny projekt badawczy. Wstęp jest obszerny, aktualny i obejmuje szerokie spektrum zagadnień: od biologii kostniakomięsaka, przez regulację cytoszkieletu, czynniki transkrypcyjne, metaloproteiny, aż po angiogenezę. Autorka wykazała się dobrą orientacją w literaturze i umiejętnością selekcji najważniejszych informacji. Wprowadzenie uzasadnia wybór alfa-2-makroglobuliny (A2M) oraz nanocząstek złota jako kluczowych elementów badań. Zauważam jednak, że omówienie biofizycznej stabilności AuNPs-GSH — parametrów, które później okazały się istotne — mogłoby zostać nieco poszerzone. Podrozdział poświęcony zastosowaniu nanocząstek złota w onkologii mógłby być nieco rozwinięty i poprzedzony wprowadzeniem w nanotechnologię i nośniki leków oraz właściwości nowotworów ułatwiających stosowanie nanocząstek w celu lepszego zrozumienia celu stosowania wybranego modelu i nanotechnologii. Taki wstęp, choć z konieczności krótki, znajduje się w trzeciej załączonej publikacji jednakże w ogólnym wstępie do dysertacji mógłby przynieść więcej korzyści.

W syntetycznym rozdziale Wyniki doktorantka przedstawia najważniejsze rezultaty, a Dyskusja integruje treść trzech publikacji, co jest rozwiązaniem właściwym dla tej formy pracy. Zastosowane metody badawcze są interesujące i różnorodne, a tematyka pracy ma istotne znaczenie kliniczne. Z racji tego, że przedstawione w dysertacji publikacje zostały już poddane recenzji, a przez to dopracowane, pozostawiają niewiele miejsca na osobiste uwagi recenzenta.

Pierwsza publikacja stanowiąca część dysertacji ma charakter przeglądowy i przedstawia szczegółowe omówienie molekularnych mechanizmów przerzutowania kostniakomięsaka psów. Jest to praca dojrzała, syntetyczna i napisana z bardzo dobrą znajomością literatury. Autorka przedstawia liczne szlaki sygnałowe zaangażowane w migrację, inwazję i angiogenezę, dokonując ich zestawienia w sposób przejrzysty i uporządkowany. Warto podkreślić, że publikacja ta stanowi mocny fundament merytoryczny dla późniejszych badań eksperymentalnych opisanych w kolejnych artykułach. Pewnym ograniczeniem, wynikającym z daty publikacji, jest brak uwzględnienia najnowszych doniesień dotyczących np. szlaku uPA/PLAUR, jednak nie wpływa to na wartość poznawczą pracy.

Druga publikacja, o charakterze oryginalnym, jest centralnym elementem dysertacji. Autorka przeprowadziła w niej analizę proteomiczną komórek kostniakomięsaka i osteoblastów, identyfikując białka różnicujące oba fenotypy. Najważniejszym wynikiem jest wykazanie istotnie obniżonej ekspresji alfa-2-makroglobuliny (A2M) w komórkach OSA oraz potwierdzenie jej roli jako czynnika hamującego migrację komórek nowotworowych. Wybór metod — w tym MALDI-TOF/TOF do analizy proteomicznej oraz Simple Western do walidacji poziomu białek — świadczy o wysokiej świadomości technicznej autorki. Wyniki te są oryginalne i znaczące, stanowią ważny wkład w poznanie biologii przerzutowania OSA. Można jedynie zauważyć, że badania funkcjonalne ograniczają się do migracji, natomiast dalsza analiza obejmująca markery EMT lub aktywność metaloprotein mogłaby jeszcze pełniej potwierdzić proponowany mechanizm działania A2M. Ta publikacja jest bardzo wartościowa. Mam też kilka pytań po jej przeczytaniu. W analizie proteomicznej zidentyfikowano osiem białek różnicujących komórki OSA i osteoblasty. Jakie kryteria decydowały o uznaniu danego białka za biologicznie istotne dla procesu przerzutowania, a nie jedynie za zmianę wtórną lub metaboliczną? W testach migracji wykazano hamujący wpływ egzogennej A2M. Czy doktorantka próbowała określić, czy efekt ten wynika

z bezpośredniego blokowania migracji, czy też z działania na metabolizm komórek (np. poprzez zmiany w glikolizie lub ROS)? Czy przeprowadzenie analizy korelacyjnej pomiędzy poziomem A2M a prędkością migracji komórek mogłoby ujawnić dodatkowe zależności? Co taka zależność mogłaby ujawnić?

Trzecia publikacja, również oryginalna, poświęcona jest ocenie działania opłaszczonych glutationem nanocząstek złota (AuNPs-GSH) jako potencjalnych inhibitorów przerzutowania. Autorka przeprowadziła szeroki zakres badań obejmujących charakterystykę fizykochemiczną nanocząstek, ocenę ich internalizacji za pomocą metody MP-AES, wpływ na migrację i klonogenność komórek nowotworowych oraz analizę angiogenezy na modelu CAM, który choć technicznie wymagający, nie jest tak powszechny jak modele mysie, ale umożliwia szybkie i bezpośrednie zobrazowanie angiogenezy. Z własnego doświadczenia wiem, że jest to także stosunkowo trudny model badawczy. Uzyskane podczas prac wyniki wskazują, że AuNPs-GSH wykazują działanie hamujące zarówno migrację komórek OSA, jak i ich zdolność do tworzenia kolonii, a ponadto redukują liczbę naczyń w modelu CAM, co może sugerować ich efekt antyangiogeny. Szczególnie interesująca jest obserwacja, że traktowanie nanocząstkami prowadziło do zwiększenia ekspresji A2M, co autorka uznała za jeden z możliwych mechanizmów ich działania. Ta interpretacja jest logiczna, choć wymagałaby uzupełnienia o ocenę markerów stresu oksydacyjnego lub EMT, aby pełniej przedstawić ogólny wpływ AuNPs na komórki nowotworowe. Wynik dotyczący różnic w absorpcji nanocząstek przy stężeniach 200 µg/ml i 500 µg/ml został przedstawiony rzetelnie, choć warto byłoby odnieść się w większym stopniu do roli otoczki białkowej, która może tłumaczyć obserwowane zjawisko. Mam kilka pytań związanych z nanocząstkami i ich użyciem. Dlaczego nie próbowano podawać nanocząstek złota drogą dożylną? Czy jest to w ogóle możliwe? Jak zachowują się zsyntetyzowane nanocząstki w kontakcie z osoczem? Czy jest możliwe, że efekt przeciwmigracyjny AuNPs-GSH wynika z ich internalizacji, czy też z działania „na powierzchni” komórki, np. poprzez interakcję z receptorami? W jaki sposób obecność glutationu jako stabilizatora wpływa zdaniem doktorantki na interakcję nanocząstek z błoną komórkową? Czy alternatywne stabilizatory mogłyby wzmocnić efekt antyprzerzutowy? Pytania te wynikają również z mojej ciekawości badawczej — być może nie wszystkie mają już pełne odpowiedzi, jednak proszę spróbować je przedyskutować podczas obrony.

Całość części metodologicznej rozprawy należy ocenić bardzo wysoko. Doktorantka zastosowała zestaw metod w pełni adekwatnych do problemu badawczego, obejmujących zarówno zaawansowane techniki proteomiczne, jak i metody analizy migracji, klonogenności i angiogenezy. Zastosowany model badawczy *in vivo* jest stosunkowo wymagający i wymaga bardzo dobrego opanowania swego warsztatu. Metody te zostały opisane szczegółowo, w sposób umożliwiający ich powtórzenie. Wyniki przedstawione są klarownie, opatrzone właściwą analizą statystyczną, a ich omówienie jest logiczne i spójne. Generalnie dyskusja wyników prac prezentuje wysoki poziom merytoryczny i świadczy o dobrej orientacji autorki w literaturze przedmiotu. Doktorantka umiejętnie interpretuje uzyskane wyniki, wskazuje ich znaczenie dla biologii nowotworów oraz przedstawia kierunki dalszych badań. Dyskusja jest dobrze wyważona — nie tylko podkreśla mocne strony uzyskanych wyników, ale także odnosi się do ograniczeń badań, zwłaszcza w odniesieniu do możliwości translacyjnych i konieczności walidacji w modelach *in vivo*. Wnioski końcowe zostały sformułowane jasno i są logiczną konsekwencją przeprowadzonych badań. Praca stanowi spójny cykl publikacji o wyraźnym wątku przewodnim, jakim jest próba zrozumienia i zahamowania procesów przerzutowania w kostniakomięsaku psów.

Podsumowując, rozprawa lek. wet. Sylwii Stanisławy Wilk jest dziełem dojrzałym, rzetelnym i wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy z zakresu onkologii weterynaryjnej oraz biologii przerzutowania. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością nowoczesnych technik badawczych, umiejętnością ich zastosowania oraz wysoką samodzielnością naukową. Pomimo pojedynczych drobnych uwag

krytycznych, praca w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przygotowywanym w formie cyklu publikacji.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wszystkie warunki ustawowe określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawa o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 późn. zm.), dlatego wnioskuję do wysokiej Rady Dyscypliny Weterynarii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani Sylwii Stanisławy Wilk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

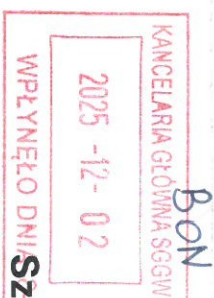
Język Czerwony

UNIWERSYTET WROCŁAWSKI
Wydział Biologii
50-383 Wrocław, ul. Joliot-Curie 14a
tel. 71 375 6200 • 375 2732

Zwroty kierować na:
**pl. Uniwersytecki 1,
50-137 Wrocław**

FUP Wrocław 48

13018 24-11-2025



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Biurow Obsługi Nauki

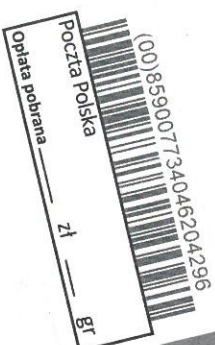
ul. Nowoursynowska 166, bud. 2, pok. 1

02-787 Warszawa

R



2025



POLECENY



RPW/34766/2025 N
Data: 2025-12-02