CENTRUM MEDYCZNE
KSZTAŁCENIA
PODYPLOMOWEGO

dr hab. Damian Gaweł, prof. CMKP
Zakład Biologii Komórki i Immunologii
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego
ul. Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa
tel. 22-5693-821
e-mail: damian.gawel@cmkp.edu.pl

Warszawa, dn. 28.03.2025

RECENZJA
osiągnięć naukowych, w tym cyklu publikacji pt. *„Ukierunkowany system dostarczania leków na bazie funkcjonalizowanego jedwabiu pajęczego w terapii nowotworów piersi"*
w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne
dr n. med. Anny Florczak-Substyk

Opinię przygotowano w odpowiedzi na pismo z dn. 27 stycznia 2024 r., przesłane przez Pana prof. dr hab. n. med. Przemysława Mitkowskiego, Przewodniczącego Rady Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w oparciu o art. 219 ust. 1 pkt. 2 lit. b) ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (z późniejszymi zmianami).

Przedstawione do oceny dokumenty odpowiadają ustawowym wymogom postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego.

1. Ocena przebiegu pracy zawodowej.

Pani dr Anna Florczak-Substyk karierę zawodową związała z Uniwersytetem Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (UMP). Kandydatka już jako studentka realizowała badania do pracy magisterskiej w Katedrze i Klinice Neurologii UMP. W roku 2009 r. obroniła pracę uzyskując tytuł *magistra inżyniera biotechnologii*. Studia doktoranckie odbyła w Centrum Nanobiomedycznym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Stopień *doktora nauk medycznych w zakresie biologia medyczna* został nadany Kandydatce uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego II UMP w 2015 r. na podstawie pracy doktorskiej, do której badania przeprowadziła na Wydziale Lekarskim II, UMP. Od 2014 r. Habilitantka pozostaje zatrudniona w UMP, kolejno na etacie asystenta i adiunkta naukowo-dydaktycznego.

Habilitantka czynnie brała udział w realizacji wielu projektów, w tym grantów OPUS, czy projektów finansowanych z funduszy Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Wyniki badań

prezentowała na kongresach krajowych i zagranicznych. Otrzymała szereg nagród, w tym Nagrodę Komitetu Biotechnologii im. Profesora Wacława Szybalskiego oraz Nagrody Rektora UMP za osiągnięcia naukowe (indywidualne i zespołowe).

Na szczególne wyróżnienie zasługują: (i) otrzymane przez Kandydatkę stypendium doktoranckie Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w ramach programu *Międzynarodowe Projekty Doktoranckie*, (ii) uzyskane dwa granty Narodowego Centrum Nauki: *Miniatura* oraz *Sonata* oraz (iii) odbyty 6-miesięczny staż naukowy w Centrum Biofizyki Molekularnej (CBM), Narodowego Centrum Badań Naukowych (CNRS) w Orleans we Francji.

Stwierdzam, że dotychczasowy przebieg kariery zawodowej Habilitantki w pełni odpowiada wymogom stawianym Kandydatom w przewodach habilitacyjnych. Zdobyte doświadczenie, duża aktywność naukowa, uzyskane granty, nagrody oraz odbyty zagraniczny staż naukowy potwierdzają gotowość Kandydatki do samodzielnego realizowania badań.

2. Ocena osiągnięcia naukowego będącego podstawą postępowania habilitacyjnego.

Habilitantka do oceny przedstawiła osiągnięcie naukowe pt. „*Ukierunkowany system dostarczania leków na bazie funkcjonalizowanego jedwabiu pajęczego w terapii nowotworów piersi*". Na osiągnięcie składa się cykl czterech prac oryginalnych o łącznym wskaźniku IF = 29.2 oraz punktacji MNiSW = 455 pkt. Prace zostały opublikowane w latach 2018-2020 i ich liczba cytacji jest wysoka, co świadczy o istotnym oddziaływaniu opublikowanych danych na środowisko naukowe. Wiodący udział Habilitantki w powstanie tych prac został odpowiednio w autoreferacie opisany. Habilitantka jest pierwszym autorem 3 publikacji, w jednej jest drugim autorem. Do dokumentacji dołączono również oświadczenia współautorów wskazujące na wiodącą rolę Kandydatki w planowaniu, wykonaniu badań oraz interpretacji wyników. W ostatniej ze wskazanych publikacji Habilitantka jest autorem korespondencyjnym.

Lista wskazanych jako cykl prac obejmuje:

[1]. „*Optimization of spider silk sphere formation processing conditions to obtain carriers with controlled characteristics*"; *J. Biomed. Mater. Res. A: 2018;* IF: 3,221;

[2]. „*Cellular uptake, intracellular distribution and degradation of Her2-targeting silk nanospheres*"; *Int. J. Nanomedicine: 2019;* IF: 5,115;

[3]. *„Drug affinity and targeted delivery: double functionalization of silk spheres for controlled doxorubicin delivery into Her2-positive cancer cells"; J. Nanobiotechnol.; 2020;* IF: 10,435*;*

[4]. *„Functionalized silk spheres selectively and effectively deliver a cytotoxic drug to targeted cancer cells in vivo"; J. Nanobiotechnol.; 2020*; IF: 10,435

Prowadzone przez Habilitantkę badania dotyczą poszukiwania nowych metod leczenia nowotworów. W swoim dziele opisuje doświadczenia, w których zastosowała model raka piersi, którego jeden z często diagnozowanych podtypów charakteryzuje się nadekspresją receptora HER2, wiązanego z nabywaniem przez komórki oporności na leki. Badania te są niezwykle istotne, ponieważ rak piersi jest najczęściej rozpoznawanym typem nowotworu u kobiet, a wyleczalność (pomimo pewnych sukcesów w leczeniu obserwowanych w ostatniej dekadzie) wciąż pozostaje poniżej oczekiwań. Zgodnie z danymi, rak piersi stanowi około 23% wszystkich zachorowań z powodu nowotworów złośliwych u kobiet i około 14% zgonów z tego powodu. Dlatego poszukiwanie nie tylko nowych leków, ale zwłaszcza zwiększanie skuteczności działania już istniejących związków, jest niezwykle istotne zarówno z klinicznego, jak i społecznego punktu widzenia.

Jedną ze strategii zwiększania efektywności działania związków antynowotworowych jest zmiana sposobu ich podawania, co niejednokrotnie pozwala na ukierunkowane działanie (tylko do komórek nowotworowych) i osiąganie efektu terapeutycznego przy niższych dawkach leku, co z kolei prowadzi do zmniejszenia cytotoksyczności względem komórek nienowotworowych. Obecnie duże zainteresowanie budzą nośniki leków, w konstrukcji których wykorzystuje się nanotechnologię. Do ich syntezy wykorzystuje się m.in. metale szlachetne tj. złoto, czy platynę, węgiel, czy krzem. Bardzo interesującą grupę stanowią nanonośniki lipidowe. Habilitantka wpisuje się swoimi zainteresowanymi i badaniami w trend poszukiwania nowych wydajnych systemów do transportu leków i skupia się na badaniach nad sferami z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego. Badała dwa białka: MS1 i MS2, które powstały w oparciu o sekwencje naturalnych białek MaSp1 i MaSp2 pochodzących od jedwabiu pająka złotego. Biomateriały oparte o cząsteczki jedwabiu budzą duże zainteresowanie, ponieważ są biokompatybilne, biodegradowalne, nietoksyczne i łatwe w przygotowaniu. Nośnik ten oferuje zmienną pojemność oraz kontrolowaną szybkość uwalniania leku. Co ważne, sam nośnik po uwolnieniu leku ulega enzymatycznej degradacji. Dodatkowo, modyfikowane białka jedwabiu można "dekorować", np. peptydami, które wiążą się do obecnych

na powierzchni komórek rakowych receptorów (tj. HER2), co pozwala na stosowanie ich w terapii celowanej.

W pierwszej ze wskazanych w cyklu prac (opublikowana w *J. Biomed. Mater. Res. A: 2018*) Habilitantka opisuje badania nad optymalizacją warunków powtarzalnego uzyskiwania i oczyszczania badanych cząsteczek jedwabiu oraz formowania ich w postaci sfer. Praca jest obszerna, wyniki są prezentowane nie tylko w postaci tabel/wykresów, ale również doskonałych zdjęć z mikroskopu elektronowego i konfokalnego. Praca, bardzo bogata metodologicznie, przedstawia wyczerpującą charakterystykę właściwości fizykochemicznych i biologicznych badanych struktur. Badane były jedwabie MS1 i MS2, pochodne białek MaSp1 i MaSp2. Kandydatka wykazała, że zastosowanie systemu ich mikromieszania w procesie produkcji struktur sferycznych przyspiesza proces produkcji cząstek, i że technika ta może być stosowana również do produkcji cząsteczek jedwabiu pajęczego z sekwencjami celującymi na powierzchni.

W drugiej z prac Habilitantka podjęła się analizy biologicznych właściwości syntetyzowanych konstruktów/sfer opartych o cząsteczki jedwabiu. W badaniach użyła konstrukty hybrydowe uzyskane przez dodanie peptydu wiążącego receptor HER2. Stabilne cząsteczki jedwabiu utworzyła w oparciu o procedury opisane w poprzedniej publikacji. Ponownie w badaniach zastosowała bogatą metodologię. Użyła inhibitorów endocytozy oraz termiczną inhibicję receptora w celu określenia ścieżki wychwytu komórkowego jedwabnych nanocząstek do komórek HER2-pozytywnych (SKBR3). Badała proces wiązania internalizacji funkcjonalizowanych jedwabnych sfer oraz ich wewnątrzkomórkowej dystrybucji oraz degradacji. Badania te potwierdziły, że funkcjonalizowane nanocząstki jedwabiu stanowią obiecujące narzędzie do transportu leków w leczeniu nowotworów.

Prace nr 3 i 4 (obie opublikowane w *J. Nanobiotechnol.*) są ze sobą powiązane. W pierwszej z tych prac Habilitantka badała jedwab MS1 i MS2. Pierwszy z nich funkcjonalizowała peptydem H2.1 (H2.1MS1), który selektywnie wiąże się do receptora HER2. Drugi użyła do uzyskania rekombinowanego jedwabiu DOXMS2. Wykazywał on powinowactwo do doksorubicyny. Zmieszała oba konstrukty uzyskując zoptymalizowany system dostarczania leku, charakteryzujący się wysoką pojemnością ładowania doksorubicyny, zdolnością selektywnego wiązania do komórek HER2-dodatnich oraz wykazujący zredukowane, a w efekcie bardziej długotrwałe uwalnianie leku. Badania były prowadzone z zastosowaniem komórek SKBR3 (HER2-dodatni rak piersi) oraz panelu technik

molekularnych. Uzyskane przez Habilitantkę wyniki potwierdziły, że strategia mikromieszania jedwabi pozwala uzyskiwać nowatorskie systemy dostarczania leków wyposażone w odpowiednie ligandy czy leki, które można nakierowywać na komórki i uwalniać w sposób kontrolowany. W ostatniej z prac wykazała wysoką skuteczność wcześniej badanych sfer H2.1MS1 (ukierunkowanych na receptor HER2) na modelu mysim. Doksorubicyna dostarczana przez konstrukt H2.1MS1 hamowała wzrost raka HER2-dodatniego. Habilitantka wykazała, że sfery H2.1MS1 nie dostarczały leku do HER2-negatywnych komórek kontrolnych oraz nie powodowały toksycznych ogólnoustrojowych skutków ubocznych u myszy.

Podsumowując, Habilitantka stworzyła oraz z sukcesami rozwija opartą o bioinżynierowany jedwab pajęczy nowoczesną platformę dla dostarczania substancji czynnych selektywnie do określonych komórek nowotworowych, zdolną do biodegradacji w komórkach organizmu. Publikacje zostały opublikowane w pismach z grupy Q1, o wysokich wskaźnikach. Wiodący udział Habilitantki w powstanie tych prac nie budzi wątpliwości. Prace są spójne tematycznie oraz zaawansowane metodologicznie. Mają charakter interdyscyplinarny, a ich wysoka liczba cytowań (w/g Scopus - 90) świadczy o istotnym oddziaływaniu opisanych badań na środowisko naukowe. Stwierdzam, że osiągnięcie pt. *„Ukierunkowany system dostarczania leków na bazie funkcjonalizowanego jedwabiu pajęczego w terapii nowotworów piersi"* przedstawione w formie cyklu czterech prac odpowiada wymogom stawianym Kandydatom w przewodach habilitacyjnych.

3. Ocena pozostałego (nie wchodzącego w skład dzieła) dorobku naukowego.

Dorobek publikacyjny nie wchodzący w skład dzieła obejmuje 20 prac, w tym 12 oryginalnych, o łącznym wskaźniku IF > 86 (1583 pkt. MNiSW). Habilitantka jest pierwszym autorem w 7 z tych publikacji. Referaty, plakaty były prezentowane na 90 zjazdach, w tym 12 zagranicznych.

Nieopisane w dziele badania dotyczą biologii syntetycznej, bioinżynierii białek, biotechnologii, biomateriałów i terapii nowotworów. Bardzo ciekawym i ważnym kierunkiem badań Habilitantki są projekty nad system dostarczania terapeutycznych kwasów nukleinowych za pomocą jedwabnych nośników np. w celu hamowania ekspresji genów. Stanowić mogą one alternatywę do klasycznych metod opartych o lipofektaminę i oferować lepsze efekty biologiczne poprzez wydłużenie wyciszania docelowego genu. Innym interesującym kierunkiem są badania nad zastosowaniem funkcjonalizowanych jedwabnych nośników ukierunkowanych na unaczynienie

guza, czy cele związane z mikrośrodowiskiem guza. W jednej z najnowszych publikacji Kandydatka opisała system reagujący na obecność metaloproteinaz w macierzy zewnątrzkomórkowej umożliwiający kontrolowane dostarczania i uwalniania leków w mikrośrodowisku guza. Od 2022 r. Habilitantka kieruje grantem NCN pt. "*Nowe strategie w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca oparte o jedwabne nanonośniki ukierunkowane na unaczynienie guza*".

Uzyskany znaczący dorobek naukowy Habilitantki wykazany poza dziełem, świadczy o dużej aktywności naukowej Habilitantki. Co ważne, badania te są często prowadzone we współpracy z innymi zespołami i ośrodkami, co świadczy o otwartości naukowej Habilitantki i gotowości do realizowania projektów w ramach współpracy międzyuczelnianej. Wysoka liczba cytacji tego dorobku (>400) świadczy o istotnym wkładzie opublikowanych danych w rozwój nauk biomedycznych. W mojej opinii osiągnięcia nie wchodzące w skład dzieła w pełni odpowiadają wymogom ustawowym w przewodzie habilitacyjnym.

4. Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej.

Aktywność dydaktyczna Habilitantki związana jest z zajęciami prowadzonymi w Zakładzie Immunologii Nowotworów, w Katedrze Biotechnologii Medycznej UMP. Opracowała program nauczania i prowadzi zajęcia z przedmiotu "*Inżynieria genetyczna*". Jest inicjatorem wprowadzenia zajęć "*Zwierzęta laboratoryjne*" na kierunku biotechnologia medyczna. W ramach działalności dydaktycznej była lub jest opiekunem, promotorem lub promotorem pomocniczym prac magisterskich i licencjackich oraz pracy doktorskiej. Angażuje się w działalność na rzecz Uczelni. Była członkiem komitetów organizacyjnym konferencji „*Summer Symposium on Nanomaterials and their application to Biology and Medicine*" czy „*Young Scientist Forum 2.0*". Zasiada w uczelnianych i wydziałowych komisjach UMP, m.in. w Radzie Kolegium Nauk Medycznych UMP. Kandydatka jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiego Stowarzyszenia Biomateriałów oraz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Przedstawiony do oceny dorobek dydaktyczny i organizacyjny oceniam wysoko i stwierdzam, że w pełni spełnia on wymagania ustawowe.

5. Wniosek końcowy.

W oparciu o pozytywną ocenę dorobku naukowego, w tym osiągnięcia naukowego zatytułowanego *„Ukierunkowany system dostarczania leków na bazie funkcjonalizowanego jedwabiu pajęczego w terapii nowotworów piersi"*, będącego podstawą postępowania habilitacyjnego, a także przedstawionej informacji o dorobku dydaktycznym i organizacyjnym, stwierdzam, że dr Anna Florczak-Substyk spełnia ustawowe wymogi stawiane Kandydatom do stopnia doktora habilitowanego.

Pozytywnie opiniuję wniosek Pani dr n. med. Anny Florczak-Substyk o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne, i wnoszę do Wysokiej Rady Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pani dr n. med. Anny Florczak-Substyk do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

dr hab. n. med. Damian Gaweł, prof. CMKP

Signed by /
Podpisano przez:

Damian Kamil
Gaweł

Date / Data:
2025-03-28 22:20