

Recenzja wniosku Pani dr n. med. Karoliny Wojtowicz o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o zdrowiu

1. Dane o karierze naukowej

1.1. Uzyskanie dyplomu/stopni naukowych

Dr n. med. **Karolina Wojtowicz** uzyskała:

- ✓ W **2011 r.** dyplom **mgr** biotechnologii (Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, kierunek Biotechnologia, specjalność Biotechnologia medyczna),
- ✓ W **2017 r.** stopień **dr n. med.** w zakresie biologii medycznej (Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu). Tytuł rozprawy doktorskiej „Wpływ glikozylacji na mechanizmy obronne komórek związane z nadekspresją białek MDR oraz kryptami komórkowymi”.

Dr n. med. Karolina Wojtowicz **spełnia przesłankę**, o której mowa w art. 219 ust. 1 pkt 1. ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) **dotyczącą posiadania stopnia doktora.**

1.2. Zatrudnienie

Dr n. med. Karolina Wojtowicz w latach **2011–2012** była zatrudniona na stanowisku samodzielnego referenta technicznego, w latach **2012–2018** na stanowisku asystenta, z kolei od 2018 r. do chwili obecnej na stanowisku adiunkta w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

2. Osiągnięcie naukowe, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

Podstawą do ubiegania się o nadania stopnia dr hab. w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o zdrowiu jest cykl **3** powiązanych tematycznie oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w recenzowanych czasopiśmie naukowych wykazywanych w bazie *Journal Citation Reports (JCR)*, objętych wspólnym tytułem: **„Zróżnicowanie mechanizmów oporności komórek raka jajnika na leki przeciwnowotworowe”**. Łączny współczynnik wpływu (IF, ang. *Impact Factor*) tych prac wynosi **12,008**, natomiast liczba punktów MNiSW **340**. We wszystkich publikacjach Habilitantka jest **pierwszym autorem**. Udział procentowy indywidualnego wkładu pracy Autorki w powstanie podanych artykułów wynosi kolejno: 75%, 85% i 90%. Zakres wkładu obejmował: ustalenie koncepcji badań, zdefiniowanie metodologii, w tym zastosowanych

metod statystycznych, wykonanie większości eksperymentów, interpretacja wyników, opracowanie i redagowanie manuskryptu. Wszyscy współautorzy prac wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego złożyli oświadczenie, w którym wyrazili zgodę na włączenie danej publikacji w ten cykl.

W skład cyklu habilitacyjnego wchodzi następujące publikacje:

- **Wojtowicz Karolina**, Sterzyńska Karolina, Świerczewska Monika, Nowicki Michał, Zabel Maciej, Januchowski Radosław: *Piperine targets different drug resistance mechanisms in human ovarian cancer cell lines leading to increased sensitivity to cytotoxic drugs*. Int. J. Mol. Sci. 2021: Vol. 22, nr 8, art. 4243 [s. 1-22]. **IF = 6,208; punktacja MNiSW = 140**
- **Wojtowicz Karolina**, Świerczewska Monika, Nowicki Michał, Januchowski Radosław: *The TGFBI gene and protein expression in Topotecan resistant ovarian cancer cell lines*. Adv Med Sci. 2023 Sep 68(2). **IF = 2,700; punktacja MNiSW = 100**
- **Wojtowicz Karolina**, Nowicki Michał: *The characterization of the sensitive ovarian cancer cell lines A2780 and W1 in response to ovarian CAFs*. Biochem Biophys Res Commun 2023;662:1-7. **IF = 3,100; punktacja MNiSW = 100**

Badania prezentowane w cyklu habilitacyjnym dotyczą charakterystyki molekularnej komórek nowotworowych i ich mikrośrodowiska w kontekście zróżnicowanych mechanizmów oporności tych komórek na leki przeciwnowotworowe. Zostały przeprowadzone na **komórkach nowotworowych linii raka jajnika**. Temat podjęty przez Habilitantkę jest **niezwykle aktualny i potrzebny**, nie tylko z powodu środowiskowego zagrożenia związkami karcinogennymi, ale także ze względu na dobrane odpowiednich algorytmów postępowania terapeutycznego w chorobie nowotworowej. Z danych epidemiologicznych wynika, że pozytywna odpowiedź nowotworu jajnika na leczenie cytostatykami nie zawsze jest zadowalająca. Efekty leczenia w dużej mierze zależne są od predyspozycji genetycznych pacjenta, które między innymi określają potencjał biologiczny komórek nowotworowych, a w tym ich inwazyjność. Istotne znaczenie ma pojawienie się oporności lekowej/wielolekowej tych komórek, zarówno tej pierwotnej, jak i wtórnej związanej z uruchomieniem przez nie odpowiednich mechanizmów, co w konsekwencji prowadzi do braku efektu terapeutycznego stosowanych leków i progresu choroby nowotworowej. Nie można pominąć faktu, że molekularne mechanizmy odpowiedzialne za oporność lekową **nie są do końca poznane**, zwłaszcza te związane z **mikrośrodowiskiem nowotworu**, a więc z macierzą zewnątrzkomórkową i komórkami nienowotworowymi. Zatem badania weryfikujące odpowiedzi komórek nowotworowych na dane leki cytotoksyczne, ze szczególnym uwzględnieniem procesów za nie odpowiedzialnych są **cenne i uzasadnione**. Nie tylko **poszerzają naszą wiedzę** w tym obszarze, ale wnoszą także **wartość kliniczną**.

Pragnę podkreślić, że zainteresowania Habilitantki związane z cyklem habilitacyjnym nie są incydentalne, ale są **kontynuacją** wcześniej sprecyzowanych zainteresowań, których uwieńczeniem była rozprawa doktorska i opublikowane wyniki badań w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, w których dr Karolina Wojtowicz jest **współautorem**

(np. Januchowski i wsp., 2013¹, 2016²; Sterzyńska i wsp., 2018³; Świerczewska i wsp., 2019⁴). Udział Habilitantki w badaniach poprzedzających cykl habilitacyjny pozwolił na stworzenie odpowiedniego **modelu doświadczalnego i opracowanie szeregu metod**, przede wszystkim z zakresu biologii i genetyki molekularnej niezbędnych do realizacji zamierzeń badawczych.

2.1. **Wojtowicz Karolina**, Sterzyńska Karolina, Świerczewska Monika, Nowicki Michał, Zabel Maciej, Januchowski Radosław: *Piperine targets different drug resistance mechanisms in human ovarian cancer cell lines leading to increased sensitivity to cytotoxic drugs*. Int. J. Mol. Sci. 2021: Vol. 22, nr 8, art. 4243 [s. 1-22]. IF = 6,208; punktacja MNiSW = 140

Badania opublikowane w **2021 r.** (pierwsza praca z cyklu) wpisały się w nurt badań, w których poszukuje się naturalnych związków o właściwościach przeciwnowotworowych, aby ograniczyć mechanizmy obronne komórek nowotworowych i zwiększyć ich wrażliwość na stosowane leki. Przedmiotem badań była **piperyna** – substancja występująca w niektórych gatunkach pieprzu, o właściwościach antybakteryjnych, przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych. Habilitantka starała się odpowiedzieć na pytanie **na czym polega antynowotworowe działanie piperyny**, zwłaszcza w przypadku komórek opornych na leki cytostatyczne, i jaki jest molekularny mechanizm działania tej substancji – jakie białka są dla niej miejscem docelowym. W tym celu Habilitantka wykorzystała dobrze opracowany we wcześniejszych badaniach model hodowli linii komórek nowotworowych raka jajnika: komórki wrażliwe na leki (W1, komórki pozyskane od kobiety ze zdiagnozowanym nowotworem jajnika – gruczolakorak surowiczy jajnika) i komórki odporne na paklitaksel (PAC) – cytostatyk wiązany przez składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (linia komórkowa W1PR1 i W1PR2) i topotekan (TOP) – linia komórkowa W1TR. Komórki odporne na cytostatyki zostały uzyskane poprzez eksponowanie komórek wrażliwych na leki na stopniowo zwiększające się stężenie leku.

Autorka udowodniła, że piperyna powodowała obniżenie żywotności komórek, które były odporne na PAC. Związek ten zwiększał cytotoksyczny efekt zarówno PAC, jak i TOP w przypadku linii komórkowych opornych na działanie tych leków (test MTT). Zaobserwowała, że piperyna obniżała ekspresję transporterów wypompowujących cytostatyki z komórki – białek transbłonowych związanych z opornością wielolekową (MDR, ang. *multidrug resistance*): glikoproteiny P (transporter ABCB1) i białka BCRP (transporter ABCG2) występującego w raku piersi (ocena immunofluorescencyjna, metoda Western blot).

Ponieważ mechanizm oporności komórek nowotworowych na leki wiąże się z poziomem fosforylacji określonych białek zależnych od wzrostu ekspresji kinaz dokonujących tej fosforylacji (fosforylacja tyrozyn) i zmniejszenia aktywności fosfataz, Autorka zbadała wpływ piperyny na ekspresję receptora fosfatazy tyrozynowej typu K (PTPRK) i poziom fosforylacji tyrozyn (ocena immunofluorescencyjna). Wykazała, że piperyna powoduje wzrost ekspresji

¹ Januchowski R, **Wojtowicz K**, Sujka-Kordowska P, Andrzejewska M, Zabel M. MDR Gene Expression Analysis of Six Drug-Resistant Ovarian Cancer Cell Lines. BioMed Res Int. 2013;2013:241763.

² Januchowski R, **Wojtowicz K**, Sterzyńska K, Sosińska P, Andrzejewska M, Zawierucha P, i wsp. Inhibition of ALDH1A1 activity decreases expression of drug transporters and reduces chemotherapy resistance in ovarian cancer cell lines. Int J Biochem Cell Biol. 2016;78:248–259.

³ Sterzyńska K, Klejowski A, **Wojtowicz K**, Świerczewska M, Nowacka M, Kaźmierczak D, i wsp. Mutual Expression of ALDH1A1, LOX, and Collagens in Ovarian Cancer Cell Lines as Combined CSCs- and ECM-Related Models of Drug Resistance Development. Int J Mol Sci. 2018;23;20(1):54.

⁴ Świerczewska, Sterzyńska, **Wojtowicz K**, Kaźmierczak D, Iżycki D, Nowicki M, i wsp. PTPRK Expression Is Downregulated in Drug Resistant Ovarian Cancer Cell Lines, and Especially in ALDH1A1 Positive CSCs-Like Populations. Int J Mol Sci. 2019;25;20(8):2053.

wymienionego receptora i jednocześnie spadek fosforylacji tyrozyn w liniach komórek raka jajnika opornych na badane cytostatyki, co – jak sugeruje Habilitantka – mogło redukować sygnały transkrypcyjne związane z ekspresją genów opornych na leki.

Co więcej, przeprowadzając dalsze **trafne i komplementarne analizy** (ocena immunofluorescencyjna, metoda Western blot) Habilitantka ujawniła, że piperyna w przypadku komórek opornych na PAC zmniejszała populację nowotworowych komórek macierzystych (CSCs, ang. *cancer stem cells*) mających wysoką aktywność izoformy dehydrogenazy aldehydowej – ALDH1A1, natomiast całkowicie eliminowała te komórki w przypadku linii komórkowej opornej na TOP.

Ponadto, na podstawie analizy ekspresji markera proliferacji Ki67 (ocena immunofluorescencyjna), Autorka wykazała, że piperyna zmniejszała ekspresję Ki67 w badanych liniach komórkowych, co sugerowało antyproliferacyjne właściwości tej substancji. Z kolei w przypadku linii komórkowych opornych na TOP piperyna ograniczała migrację tych komórek.

Co ważne, Habilitantka mając wiedzę dotyczącą interakcji między lekami cytostatycznymi a mikrośrodowiskiem nowotworu, w tym składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) ujawniła, że piperyna znacząco zmniejszała ekspresję kolagenu typu 3 – COL3A1 wydzielanego poza komórkę, przede wszystkim w przypadku komórek nowotworowych opornych na TOP (ocena immunofluorescencyjna, metoda Western blot). Zmniejszenie zawartości COL3A1 – jak trafnie zauważyła Dr Karolina Wojtowicz – mogło ograniczać wiązanie się TOP ze składnikami ECM i przez to zwiększać skuteczność działania TOP, który mógł dyfundować do komórek nowotworowych. W ten sposób piperyna mogła zmniejszać oporność badanych komórek na zastosowany cytostatyk. Na tej podstawie dr Karolina Wojtowicz zasugerowała, że mogło dojść do obniżenia interakcji między ECM a receptorami powierzchniowymi komórki nowotworowej (np. receptorami integryn będącymi białkami adhezyjnymi), co mogło być podstawą zmniejszenia zjawiska oporności lekowej typu CAM-DR (ang. *cell adhesion-mediated drug resistance*). **W tym obszarze badań uzyskane wyniki i proponowane sugestie mają charakter nowatorski.**

Z kolei drugim analizowanym przez Autorkę białkiem wchodzącym w skład ECM było białko TGFBI (ang. *transforming growth factor-beta-induced protein*) mające zdolność wiązania się z różnymi komórkami (np. komórkami śródbłonna, mezenchymalnymi), jak również ze składnikami ECM (np. proteoglikanami, fibronektyną, integrynami, włóknami kolagenowymi). Wybór tego białka był jak najbardziej trafny. TGFBI uczestniczy w ważnych procesach fizjologicznych związanych z rozwojem (np. morfogeneza, angiogeneza, migracja i adhezja), jak również w patogenezie nowotworu, może być odpowiedzialne za inwazyjność raka jajnika. Ponadto, Habilitantka posiłkowała się wynikami badań wcześniej opublikowanymi przez Januchowskiego i wsp. (2017⁵). Z badań tych wynikało, że w komórkach linii nowotworowych raka jajnika wysoce opornych na TOP zwiększała się ekspresja TGFBI. Zatem interesujące było, czy piperyna może zmniejszać ekspresję tego białka. Dr Karolina Wojtowicz ujawniła, że badany związek nie wpływał na ekspresję TGFBI w komórkach nowotworowych opornych na TOP (ocena immunofluorescencyjna, metoda Western blot), niemniej jednak zmniejszał jego

⁵ Januchowski R, Sterzyńska K, Zawierucha P, Ruciński M, Świerczewska M, Partyka M, et al. Microarray-based detection and expression analysis of new genes associated with drug resistance in ovarian cancer cell lines. *Oncotarget*. 2017 Jul 25;8(30):49944–49958.

ekspresję poza komórką, co – jak sugeruje Autorka – mogło blokować ścieżkę sygnalizacyjną związaną z indukowaniem CAM-DR.

Podsumowanie

Należy podkreślić, że Dr Karolina Wojtowicz umiejętnie zintegrowała, a następnie **trafnie i jasno** zinterpretowała uzyskane wyniki badań. W omawianej publikacji, stosując różne, często **komplementarne metody** z zakresu biologii molekularnej udowodniła, że badane linie komórek nowotworowych odporne na TAC i PAC wykazują **różną wrażliwość** na piperynę. Zasugerowała, że w przypadku nowotworów opornych na leki i zastosowania monoterapii można spodziewać się **korzystnej wrażliwości** komórek nowotworowych na ten związek. Co więcej, Habilitantka doszła do wniosku, że w przypadku wszystkich badanych linii komórek nowotworowych opornych na leki piperyna **wzmacniała cytotoksyczne działanie** stosowanych chemioterapeutyków.

Na podstawie uzyskanych wyników badań oraz **szerokiej wiedzy** jaką posiada w zakresie badanych zagadnień, Dr Karolina Wojtowicz przedstawiła w postaci schematu molekularny mechanizm działania piperyny w komórkach raka jajnika opornych na stosowane cytostatyki, tłumacząc w jaki sposób piperyna mogła zmniejszać oporność komórek nowotworowych na leki. Wykazała jej **plejotropowe działanie**. Zaobserwowała bowiem, że piperyna może działać na różne mechanizmy związane z opornością, np. 1) obniża fosforylację białek uczestniczących w szlakach sygnalizacyjnych, przez co może obniżyć ekspresję genów związanych z opornością na leki, 2) zmniejsza ekspresję transporterów leków, przez co może zwiększać ich stężenie w komórce, 3) zmniejsza ekspresję składników macierzy zewnątrzkomórkowej, przez co może zwiększać dostępność leków i zwiększać ich stężenie w komórce i 4) ogranicza populację komórek macierzystych nowotworu. Zatem zasugerowała, że piperyna lub jej pochodne można uznać za **potencjalny lek przeciwnowotworowy**, który mógłby poprawić skuteczność chemioterapii u pacjentów chorych na raka.

2.2. **Wojtowicz Karolina**, Świerczewska Monika, Nowicki Michał, Januchowski Radosław: *The TGFBI gene and protein expression in Topotecan resistant ovarian cancer cell lines*. Adv Med Sci. 2023 Sep 68(2). IF = 2,700; punktacja MNiSW = 100

Druga publikacja cyklu habilitacyjnego dotyczy oceny ekspresji genu *TGFBI* (qPCR – weryfikacja poziomu mRNA) i białka przez nie kodowanego TGFBI (metoda Western blot) w przypadku komórek nowotworowych linii raka jajnika o różnych typach histologicznych (A2780, A2780TR1, A2780TR2, W1, W1TR, SKOV-3, PEA1, PEA2, PEO23). Wykorzystała linie komórek wrażliwych na leki, jak i opornych na cytostatyki, w tym na TOP, zgodnie z wynikami badań otrzymanymi przez Januchowskiego i wsp. (2017)⁶ oraz ze wstępnymi wynikami uzyskanymi w pierwszej publikacji z cyklu habilitacyjnego. Dla Autorki wyniki te były inspiracją do podjęcia się dalszych badań. Obok oceny ekspresji genu i białka TGFBI, Habilitantka starała się odpowiedzieć na pytanie czy analizowane białko może brać udział w odpowiedzi komórek nowotworowych na TOP, ale we wczesnych etapach leczenia i jaki jest mechanizm jego działania.

Dr Karolina Wojtowicz stwierdziła, że we wszystkich badanych liniach komórkowych opornych na TOP (A2780TR1, A2780TR2, W1TR) występowała zdecydowana nadekspresja

⁶ Januchowski R, Sterzyńska K, Zawierucha P, Ruciński M, Świerczewska M, Partyka M, et al. Microarray-based detection and expression analysis of new genes associated with drug resistance in ovarian cancer cell lines. Oncotarget. 2017 Jul 25;8(30):49944–49958.

genu *TGFBI*. W innych badanych liniach komórek nowotworowych także: PEA1 i PEA2 (linie komórkowe wysokoroznicowanego raka jajnika typu surowiczego, linia PEA2 oporna na cisplatynę), PEO23 (linia komórkowa niskoroznicowanego raka jajnika typu surowiczego, brak receptora estrogenowego w komórkach, linia oporna na cisplatynę i chlorambucyl), SCOV-3 (linia komórkowa raka typu surowiczego, linia oporna na cisplatynę). Wyniki te zgodne były z wynikami ekspresji białka TGFBI w badanych komórkach nowotworowych, z wyjątkiem linii PEO23.

Co więcej, Habilitantka słusznie zweryfikowała zawartość białka TGFBI w medium hodowlanym, gdyż obecność TGFBI w macierzy zewnątrzkomórkowej może mieć istotne znaczenie w patomechanizmie oporności na leki przeciwnowotworowe. Potwierdziła obecność wydzielniczego TGFBI w przypadku tych linii komórkowych, w komórkach których wykryła białko TGFBI.

Aby uzyskać odpowiedź dotyczącą udziału TGFBI w powstawaniu oporności na leki cytostatyczne we wczesnych etapach leczenia, Dr Karolina Wojtowicz komórki nowotworowe wrażliwe na leki (linia W1 i A2780) ekspozycja na TOP. Już po 24 godzinach inkubacji tych komórek z cytostatykiem zaobserwowała najwyższy poziom transkryptu genu *TGFBI*. Po 48 i 72 godzinach ekspresja genu zmniejszała się. Stąd, słusznie zasugerowała, że TGFBI odgrywa istotną rolę w powstawaniu oporności pierwotnej – pierwszej linii obrony przed lekiem.

Podsumowanie

W drugiej publikacji cyklu habilitacyjnego Dr Karolina Wojtowicz uzyskała ciekawe i interesujące wyniki badań. Habilitantka potwierdziła istotną rolę składników macierzy zewnątrzkomórkowej w patogenezie oporności komórek raka jajnika na cytostatyki, zwracając szczególną uwagę na nadekspresję białka TGFBI (w komórkach i poza nimi) w przypadku oporności na topotekan i inne cytostatyki. Udowodniła, że nadekspresja badanego białka występuje w różnych typach raka jajnika, zwłaszcza tych mających receptory estrogenowe. Ponadto, Autorka potwierdziła opinię, że TGFBI może być **potencjalnym markerem prognostycznym** służącym do opracowania nowych strategii terapeutycznych. Podchodząc jednak krytycznie do swoich badań i mając świadomość, że rola TGFBI w rozwoju raka jajnika jest najmniej poznana wskazuje na prowadzenie dalszych badań w tym kierunku.

2.3. **Wojtowicz Karolina**, Nowicki Michał: *The characterization of the sensitive ovarian cancer cell lines A2780 and W1 in response to ovarian CAFs*. Biochem Biophys Res Commun 2023;662:1-7. IF = 3,100; **punktacja MNiSW = 100**

Ostatnia publikacja cyklu habilitacyjnego jest kontynuacją badań dotyczących mikrośrodowiska raka jajnika, ze szczególnym uwzględnieniem **komórek nienowotworowych**, jakimi są transformowane fibroblasty powiązane z nowotworem (CAFs, ang. *cancer associated fibroblasts*), stanowiące heterogenną populację zaangażowaną w progresję nowotworu, jego inwazyjność oraz kształtowanie się specyficznej, zbitej macierzy zewnątrzkomórkowej utrudniającej np. dyfuzję leków cytostatycznych. Zatem, Habilitantka założyła, że zmodyfikowane niekorzystnie fibroblasty w otoczeniu nowotworu wydzielają szereg substancji/cząsteczek/czynników, które mogą uruchamiać mechanizmy lekooporności. Dlatego też, w przeprowadzonych badaniach Dr Karolina Wojtowicz postanowiła zweryfikować wpływ tych komórek na morfologię komórek nowotworowych linii raka jajnika wrażliwych na leki cytostatyczne (W1, A2780) (hodowle komórkowe w warunkach 2D i 3D)

oraz ekspresję wybranych genów badanych komórek nowotworowych (TaqMan qPCR) i białek mikrośrodowiska nowotworu (metoda Western blot).

Należy podkreślić, że przed przystąpieniem do eksperymentu, Dr Karolina Wojtowicz dokonała identyfikacji fenotypu komórek CAFs. Na podstawie wysokiej ekspresji α aktyny występującej w miocytach gładkich (α -SMA, ang. *α -smooth muscle actin*) doszła do wniosku, że komórki CAFs wykorzystane w eksperymencie mają fenotyp komórek o charakterze miofibroblastycznym (myCAFs, ang. *myofibroblastic CAFs*).

Habilitationka wykazała istotny wpływ CAFs (kokultury komórek nowotworowych raka jajnika i CAFs) na **dezintegrację** sferoidalnych agregatów badanych komórek nowotworowych, które tworzyły się podczas ich hodowli w nieobecności CAFs (kokultura prowadzona na podłożu nieadhezyjnym – warunki 3D). Co ciekawe, takich zmian morfologicznych Autorka nie zaobserwowała w przypadku dodania do hodowli komórek nowotworowych tylko medium pochodzącego z hodowli CAFs. Na tej podstawie Autorka stwierdziła, że za pośrednictwem CAFs dochodziło do **migracji** komórek nowotworowych.

Ponadto wykazała, że w obecności medium uzyskanego z hodowli CAFs miała miejsce, w badanych liniach komórek nowotworowych, nadekspresja takich genów jak *ABCC5*, *CYP2C8* i *CYP2C9*. Pierwszy z wymienionych koduje jedno z białek oporności wielolekowej MDR – *ABCC5*/MRP5 będące transporterem wypompowujących leki z komórki. Z kolei dwa następne geny kodują izoformy cytochromu p450 – *CYP2C9* i *CYP2C8* zaangażowane w katabolizm leków.

Interpretacja powyższych wyników przez Dr Karolinę Wojtowicz jest jak najbardziej **sluszna i trafna**. Uważa, że podwyższenie ekspresji genów *ABCC5*, *CYP2C8*, *CYP2C9* **wiąże się** z możliwością zwiększenia oporności na leki cytostatyczne komórek nowotworowych jajnika – zwiększenie wypompowywania i katabolizmu leków. Podkreśla, że białka MDR i cytochrom p450 mogą oddziaływać z podobną grupą leków. W ten sposób dowodzi, że substancje/cząsteczki/czynniki wydzielane przez CAFs mogą być odpowiedzialne za inicjowanie lekooporności badanych komórek nowotworowych, a miejscem docelowym jest białko MDR i cytochrom p450. Należy zaznaczyć, że w tym ostatnim przypadku wyniki badań i ich interpretacja nadają publikacji charakter **nowatorski**.

Co więcej, Dr Karolinę Wojtowicz ujawnia, że do nadekspresji doszło także w przypadku genu *DHFR*, Koduje on białko DHFR, będące reduktazą dihydrofolianu uczestniczącą w syntezie substratów do syntezy DNA, a zatem niezbędną do proliferacji komórek. Biorąc pod uwagę uzyskany wynik, Autorka sugeruje, że cząsteczki uwalniane przez CAFs mogą inicjować proliferację badanych komórek nowotworowych i w ten sposób zwiększać ich przeżywalność, także w warunkach chemoterapii – jak celnie dodaje Habilitationka.

Istotną częścią badań była ocena wpływu substancji wydzielanych przez CAFs na ekspresję białek macierzy zewnątrzkomórkowej (fibronektyna, kolagen COL3A1, LOX, E-katheryny) w przypadku hodowanych komórek nowotworowych. Wyniki wskazywały, że w obecności medium pozyskanego z hodowli CAFs dochodziło do wzrostu ekspresji fibronektyny i zmniejszenia ekspresji COL3A1. Z kolei ekspresja białka LOX była intensywna, ale nie zmieniała się. Podobnie ekspresja E-katheryny nie zmieniała się, była jednak niska, przede wszystkim w przypadku linii A2780.

W interpretacji powyższych wyników Habilitantka podkreśliła, że medium z hodowli CAFs najbardziej wpływało na nadekspresję fibronektyny. Glikoproteina ta – jak sugeruje Autorka – pod wpływem cząsteczek uwalnianych z CAFs mogła być intensywnie wydzielana przez komórki nowotworowe. Dalej wiązana przez fibroblasty może sprzyjać migracji komórek nowotworowych, co promuje inwazyjność nowotworu.

Z kolei w przypadku spadku ekspresji badanego kolagenu Dr Karolina Wojtowicz przedstawiła interesującą interpretację wykazując się umiejętnością **trafnej kompilacji** wyników swoich i innych autorów. Autorka uważa, że nadekspresja COL3A1 wykazana w poprzednich badaniach współautorskich (Januchowski i wsp., 2016⁷) i innych autorów mogła pochodzić z CAFs a nie z komórek nowotworowych. Zatem, Habilitantka wskazuje, że to CAFs głównie odpowiedzialne są za produkcję kolagenu w mikrośrodku nowotworu. W obecnie omawianej publikacji białka izolowane były z hodowli prowadzonych bez dodatku CAFs, tylko z dodatkiem medium z ich hodowli. Dalej podkreśla, że obserwowany spadek ekspresji COL3A1 współistniał z brakiem zmian w ekspresji LOX – białka odpowiedzialnego za tworzenie wiązań poprzecznych w kolagenie, co wydaje się logiczne.

Natomiast brak zmian w ekspresji E-kadheryny – markera komórek nabłonkowych, którego ekspresja zmniejsza się, gdy dochodzi do niekorzystnego przejścia epitelialno-mezenchymalnego – wg Autorki potwierdza fakt, że komórki CAFs uczestniczą w zwiększeniu migracji i inwazyjności komórek raka jajnika.

Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych danych Dr Karolina Wojtowicz wykazała, że **mikrośrodko nowotworu ma kluczowe znaczenie** w inicjowaniu oporności komórek raka jajnika na cytostatyki. Ujawniła, że lekooporność uruchamiana może być na różnych poziomach, zarówno na poziomie komórek nowotworowych, jak i na poziomie macierzy zewnątrzkomórkowej. Dowiodła, że istotną rolę w procesie lekooporności odgrywają komórki CAFs, które z jednej strony stymulują komórki nowotworowe do syntezy transporterów leków i enzymów metabolizujących leki (oporność wewnątrzkomórkowa), z drugiej zaś strony mogą uczestniczyć w **reorganizacji mikrośrodowiska nowotworu**. Ponadto, Habilitantka doszła do wniosku, że migracja i inwazyjność komórek raka jajnika może wynikać z aktywności CAFs. Stąd też uważa, że zatrzymanie aktywności tych komórek może być elementem **terapii przeciwnowotworowej**.

2.4. Wniosek końcowy dotyczący cyklu habilitacyjnego

Zarówno wyniki, jak i wnioski zawarte w poszczególnych publikacjach cyklu habilitacyjnego, opatrzone **szerokim i trafnym** komentarzem, mają **aspekt nie tylko poznawczy, ale i praktyczny**. Przeprowadzone badania są spójne, **wieloaspektowe** w kontekście przedmiotu badań, jak i zastosowanych metod. Kompleksowe podejście Dr Karoliny Wojtowicz do tematu zasługuje **na uznanie**, jest wyrazem dużej jej **dojrzałości i kreatywności naukowej**. Badania prezentują **wysoki poziom merytoryczny** i w ramach określonych, **dogłębnie** analizowanych zagadnień, są **nowatorskie**. Habilitantka dowiodła, że ma **szeroką i zintegrowaną interdyscyplinarną wiedzę w zakresie zróżnicowanych mechanizmów odpowiedzialnych za lekooporność komórek nowotworowych linii raka jajnika**.

⁷ Januchowski R, Świerczewska M, Sterzyńska K, Wojtowicz K, Nowicki M, Zabel M. Increased Expression of Several Collagen Genes is Associated with Drug Resistance in Ovarian Cancer Cell Lines. J Cancer. 2016;7(10):1295–1310.

Uważam, że prezentowane osiągnięcie naukowe w postaci oryginalnych, **spójnych** tematycznie, wzajemnie uzupełniających się publikacji dotyczących zagadnień z obszaru nauk medycznych i nauk o zdrowiu **wnosi istotny wkład** w rozwój wnioskowanej dyscypliny – nauki o zdrowiu. Dr Karolina Wojtowicz **spełnia przesłankę**, o której mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2b. ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) **dotyczącą posiadania w dorobku osiągnięcia naukowego w formie cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych**.

3. Aktywność naukowa, o której mowa w art. 219 ust. 1 pkt 3. ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

3.1. Aktywność naukowa i dane naukometryczne

Dr n. med. Karolina Wojtowicz jest współautorem **26** publikacji, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych (w tym **3** publikacje wchodzące w skład cyklu habilitacyjnego). Sumaryczny **IF** uzyskany za publikacje wynosi **71,930** (w tym **IF = 12** dotyczy 3 publikacji cyklu habilitacyjnego), liczba punktów **MNiSW = 1350** (w tym **punkty MNiSW = 340** dotyczą 3 publikacji cyklu habilitacyjnego) (wg biblioteki Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu). Dane naukometryczne dla prac poza cyklem: **IF = 59,922**; punkty **MNiSW = 1010**.

Liczba cytowań/bez autocytowań (wg bazy Web of Science): **749/661**.

Indeks Hirscha: 14 (dla całościowego dorobku naukowego).

Poza osiągnięciem naukowym wśród **23** publikacji:

- **17** pozycji to artykuły z **IF (IF = 56, 355; punkty MNiSW = 880)**,
- **1** pozycja to artykuł bez **IF (punkty MNiSW = 40)**,
- **5** pozycji to prace pogładowe (**IF = 3, 567; punkty MNiSW = 90**)

Pierwszym autorem Habilitantka jest w **5** publikacjach (**IF = 7, 962; punkty MNiSW = 95**), drugim autorem w **4** (**IF = 10, 342; punkty MNiSW = 115**), trzecim w **7** (**IF = 22, 341; punkty MNiSW = 450**). W pozostałych **7** publikacjach jest na dalszym miejscu.

Przed uzyskaniem dr n. med., w latach **2012–2017**, Habilitantka opublikowała **13** artykułów naukowych o łącznym **IF = 25,425**, liczbie punktów **MNiSW = 300**, z kolei po uzyskaniu stopnia doktora, w latach **2017–2022**, **10** artykułów naukowych o łącznym **IF = 34,497** i liczbie punktów **MNiSW = 710**.

Ponadto, jest współautorem **8** doniesień zjazdowych prezentowanych na zjazdach krajowych (**3** doniesienia) i zagranicznych (**5** doniesień, Austria, Grecja, Portugalia, Japonia, Niemcy).

Jeszcze przed otrzymaniem stopnia doktora, od **2013 r.** Dr Karolina Wojtowicz uczestniczyła aż w **5 projektach badawczych** jako główny wykonawca bądź wykonawca, a także była kierownikiem projektów badawczych (**4** projekty finansowane przez **Uniwersytet Medyczny w Poznaniu**). Jeden z tych **5** projektów finansowany był przez **Narodowe Centrum Nauki (NCN) (Projekt Harmonia 3, nr UMO-2012/06/M/NZ3/00054, funkcja wykonawca)**. Po uzyskaniu stopnia dr n. med. w **2021 r.** Dr Karolina Wojtowicz uzyskała dofinansowanie z

NCN na badania naukowe w ramach autorskiego projektu **Miniatura 5** (nr 2021/05/X/NZ5/01024). Ogółem uczestniczyła w 6 projektach badawczych.

Współpracowała z innymi instytucjami/uczelniami/. W ramach współpracy z Polską Akademią Nauk we Wrocławiu jest współautorem **publikacji naukowej o zasięgu międzynarodowym** (Krawczenko i wsp., 2017; IF = 2,766; punkty MNiSW = 40)⁸. Z kolei w ramach projektu Harmonia 3 ośrodkiem zagranicznym uczestniczącym we współpracy był **Boston University School of Medicine, Boston, USA**.

Odbyła **3 staże**, w tym **2** w ośrodkach krajowych (Kalisz, Opole) i **1** w ośrodku zagranicznym („**Top 500 Innovators**”, **Hass School of Business, University of California, Berkeley, USA**).

Za działalność naukową otrzymała **5** nagród (Nagroda Steffena za prace doktorską i nagrody Rektora Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 1 indywidualna i 3 zespołowe) oraz **1** wyróżnienie za prace doktorską.

Recenzowała 3 prace naukowe w czasopismach międzynarodowych.

3.2. Wniosek końcowy dotyczący aktywności naukowej

Całościowa twórczość naukowa Dr Karoliny Wojtowicz dotyczy zagadnień z obszaru nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Tematyka badań jest **spójna** i została **zdefiniowana** jeszcze przed uzyskaniem stopnia dr n. med. i dalej bardzo **konsekwentnie była kontynuowana**. Badania Habilitantki są ściśle związane z komórkami nowotworowymi, w tym raka jajnika. Od samego początku pracy naukowej zainteresowania Habilitantki oscylują wokół analizy zróżnicowanych molekularnych mechanizmów związanych z opornością tych komórek na leki cytostatyczne. Lekooporność badanych komórek (oporność wielolekowa MDR, oporność CAM-DR) rozpatrywana jest na poziomie ekspresji genów, transbłonowych białek transportowych, enzymatycznych, receptorowych, białek wydzielanych przez komórki nowotworowe i komórki nienowotworowe będące integralną częścią środowiska nowotworu.

Porównując dane naukometryczne przed i po uzyskaniu stopnia dr n. med., należy zaznaczyć, że dorobek naukowy Habilitantki został powielony, mimo iż był znaczący jeszcze przed uzyskaniem stopnia dr n. med. (stopień dr uzyskała w 2017 r.). Przede wszystkim należy zwrócić uwagę na wartość **Indeksu Hirscha = 14** i **liczbę cytowań bez autocytowań = 661** dla całościowego dorobku naukowego obejmującego **26** publikacji. Wielkość tych parametrów świadczy o dużej wartości naukowej publikowanych wyników badań, które znalazły **zainteresowanie i uznanie** wśród międzynarodowego środowiska naukowego.

Przytoczone dane naukometryczne i informacje związane z działalnością naukową świadczą o **dynamicznym rozwoju naukowym i ciągłym doskonaleniu** warsztatu naukowego Dr Karoliny Wojtowicz, czego wyrazem było Jej **kierownictwo i wykonawstwo** w projektach naukowych, nawiązywanie **współpracy** z innymi instytucjami/uczelniami i odbycie **staży**, w tym zagranicą. Habilitantka dowiodła, iż **spełnia kryteria samodzielnego pracownika naukowego**.

⁸ Krawczenko, Bielawska-Pohl A, Wojtowicz K, Jura R, Paprocka M, Wojdat E, i wsp. Expression and activity of multidrug resistance proteins in mature endothelial cells and their precursors: A challenging correlation. PLoS ONE. 2017;12(2): e0172371.

Należy podkreślić, że dynamiczny rozwój naukowy Habilitantki miał miejsce od samego początku, gdy po uzyskaniu dyplomu mgr biotechnologii zaczęła pracę w **2011 r.** w Zakładzie Histologii i Embriologii na Uniwersytecie Medycznym im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Nie można pominąć faktu, że Jednostka ta szczyci się dużymi osiągnięciami w kształceniu pracowników naukowych, zdobywaniu stopni i tytułów naukowych.

Uważam, że Habilitantka **spełnia przesłankę**, o której mowa w art. 219 ust. 1 pkt 3. ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) **dotyczącą istotnej aktywności naukowej.**

4. Aktywność dydaktyczna, organizacyjna i popularyzująca naukę

4.1. Aktywność dydaktyczna

Od **2012 r.** dr Karolina Wojtowicz na Uniwersytecie Medycznym im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu prowadzi **ćwiczenia, seminaria i wykłady w języku polskim** z zakresu histologii, histofizjologii jamy ustnej, cytofizjologii i embriologii dla studentów **wielu** kierunków: kierunku lekarskiego, lekarsko-dentystycznego, kosmetologii, analityki medycznej i biotechnologii. Ponadto w latach **2018–2019** dla studentów kierunku lekarskiego prowadziła zajęcia dotyczące wprowadzenia do badań naukowych, których celem było przygotowanie ze studentami publikacji przeglądowej.

Od **2012 r.** Habilitantka prowadzi także zajęcia dydaktyczne dla **studentów anglojęzycznych** kierunku lekarskiego (MD, Medicine Doctor/aktualnie Medicine) i dentystycznego (DDS, Doctor of Dental Surgery). Są to ćwiczenia, seminaria i wykłady z histologii i histofizjologii jamy ustnej. Dla studentów anglojęzycznych kierunku lekarskiego prowadziła również ćwiczenia laboratoryjne z przedmiotu „Evidence-Based Medicine”.

W **2016 r.** dr Karolina Wojtowicz była promotorem pomocniczym 3 prac licencjackich dla kierunku Kosmetologia, a w **2023 r.** recenzentem 2 prac magisterskich.

4.2. Aktywność organizacyjna – praca na rzecz Uczelni

Od **2015 r.** dr Karolina Wojtowicz jest **koordynatorem** przedmiotu Histologia dla kierunku studiów licencjackich Kosmetologia, z kolei od **2022 r.** przedmiotu Histologia z Embriologią i Cytologią dla kierunku lekarsko-dentystycznego. Z kolei w latach **2020–2021** była koordynatorem przedmiotu Histology and Embryology dla studentów anglojęzycznych kierunku lekarskiego, a od **2021 r.** jest koordynatorem przedmiotu Histology, Cytology and Embryology dla studentów anglojęzycznych kierunku lekarsko-dentystycznego

W latach **2021–2022** Habilitantka była koordynatorem przedmiotu Histologia dla studentów kierunku Kosmetologia na Państwowej Uczelni Stanisława Staszica w Pile.

4.3. Aktywność popularyzująca naukę

W **2014 r.** dr Karolina Wojtowicz prowadziła zajęcia w II LO w Ostrowie Wielkopolskim w ramach porozumień patronackich. Zajęcia przeznaczone były dla uczniów klas biologiczno-chemicznych i miały na celu **pogłębienie wiedzy z zakresu histologii.** Była to jednocześnie **promocja studiów** na Uniwersytecie Medycznym im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Ponadto, w 2017 r. Habilitantka opracowała scenariusze filmowe dotyczące dokładnej budowy histologicznej wybranych tkanek i narządów. Filmy udostępnione były na You-Tube

4.4. Wniosek końcowy dotyczący wymienionych aktywności

Działalność dydaktyczną dr Karoliny Wojtowicz **oceniam pozytywnie**. Jako nauczyciel akademicki wykazuje się **dużym potencjałem**, zarówno w zakresie prowadzenia zajęć dydaktycznych w języku polskim, jak i angielskim. Pozostała działalność organizacyjna i popularyzująca naukę nie budzi zastrzeżeń i uważam ją za **wystarczającą**.

5. Wniosek końcowy i ocena

Na podstawie przedstawionej mi dokumentacji stwierdzam, że zarówno **osiągnięcia naukowe** dr Karoliny Wojtowicz pt. „Zróznicowanie mechanizmów oporności komórek raka jajnika na leki przeciwnowotworowe”, jak i Jej pozostały **dorobek naukowy** stanowią spójną i wartościową całość, którą **oceniam wysoko**. Jestem przekonana, że twórczość naukowa Habilitantki wnosi **istotny, oryginalny wkład** w reprezentowaną dziedzinę i dyscyplinę. **Poszerza naszą wiedzę** w zakresie molekularnych patomechanizmów prowadzących do lekooporności komórek raka jajnika i daje nadzieję na zwiększenie skuteczności chemioterapii.

Całościowa aktywność naukowa, dydaktyczna, organizacyjna i popularyzująca naukę świadczą o tym, że dr Karolina Wojtowicz jest **dynamicznie** rozwijającym się pracownikiem Uczelni i posiada **kwalifikacje do samodzielnego** prowadzenia badań. W mojej ocenie Habilitantka **spełnia warunki określone ustawą** z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 219 ust. 1 pkt. 1–3 (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). **Popieram wniosek** o nadanie dr Karolinie Wojtowicz – adiunktowi w Zakładzie Histologii i Embriologii, Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o zdrowiu.

Małgorzata Piasecka

KIEROWNIK
Zakładu Histologii i Biologii Rozwoju

prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Małgorzata Piasecka