

Uniwersytet Rzeszowski
Al. Rejtana 16 C, 35-959 Rzeszów



Zakład Genetyki
Samodzielna Katedra Medycyny
Molekularnej
Wydział Medyczny
Uniwersytet Rzeszowski

Dr hab. n. med. Izabela Zawlik, prof. UR
Zakład Genetyki
Samodzielna Katedra Medycyny Molekularnej
Wydział Medyczny
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 22.04.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Roberta Żółtaszka pt.: „Modulacja wybranych biomarkerów przez pochodne kwasu glukarowego w chemicznie indukowanych nowotworach”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana magistra Roberta Żółtaszka została przygotowana pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Zofii M. Kiliańskiej w Katedrze Cytobiochemii, Wydziału Biologii i Ochrony środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego. Część doświadczalna pracy została zrealizowana pod opieką Pana Prof. Zbigniewa Wałaszka w Health Science Center, University of Texas w San Antonio, USA. Prace doświadczalne prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej finansowane były z następujących źródeł: trzech grantów National Institutes of Health, częściowo z American Cancer Research Center and Foundation oraz przez RJ Reynolds Tobacco Company.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie aktywności pochodnych kwasu D-glukarowego (GA) na przebieg karcynogenezy indukowanej chemicznie w skórze i płucach myszy. W pracy doświadczalnej zastosowano trzy modele chemicznie indukowanej karcynogenezy: (1) karcynogenezę indukowaną przez 7,12-dimetylobenzo[a]antracen (DMBA) i kondensat dymu tytoniowego (CSC) w skórze myszy; (2) karcynogenezę indukowaną przez 1,12-dimetylobenzo[a]antracen (DMBA) w skórze myszy oraz (3) karcynogenezę indukowaną przez benzo[a]piren (B[a]P) w płucach myszy. Ocenę aktywności czterech pochodnych GA przeprowadzono poprzez oznaczenie aktywności proliferacyjnej, aktywności β -

glukuronidazy, poziomu ekspresji dekarboksylazy ornitynowej, poziomu wybranych markerów stanu zapalnego oraz indukcji apoptozy.

Pracę doktorską stanowi cykl czterech spójnych tematycznie prac opublikowanych w latach 2006-2011; trzy z tych publikacji są pracami doświadczalnymi opublikowanymi w międzynarodowych renomowanych czasopismach, a jedna z tych publikacji jest pracą przeglądową opublikowaną w polskim czasopiśmie. Wszystkie prace są opracowaniami zbiorowymi; w jednej z prac oryginalnych opublikowanej w 2011 roku w *Oncology Letters* Pan magister Robert Żółtaszek jest pierwszym autorem. Sumaryczny pięcioletni współczynnik oddziaływania publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 8,945 (w punktacji MNiSW - 90 pkt.). W zakres tematyki badawczej zawartej w rozprawie doktorskiej wchodzi również cztery komunikaty zjazdowe; w trzech z nich magister Robert Żółtaszek jest pierwszym autorem. W rozprawie doktorskiej zawarto także pozostały dorobek publikacyjny Doktoranta, na który składają się oprócz wyżej wymienionych prac i komunikatów zjazdowych trzy publikacje o zasięgu międzynarodowym oraz osiem komunikatów zjazdowych. Sumaryczny pięcioletni współczynnik oddziaływania całego dorobku publikacyjnego łącznie z publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej wynosi 26,698, co w przeliczeniu na punktację MNiSW wynosi 180 pkt. Całkowity dorobek publikacyjny Pana mgra Roberta Żółtaszka jest imponujący na tak wczesnym etapie jego kariery naukowej. W rozprawie doktorskiej zawarto również oświadczenia współautorów artykułów wchodzących w skład doktoratu, które jednoznacznie wskazują na wiodącą rolę Doktoranta. Jedynie od trzech współautorów pracy pt.: „Short-term biomarkers of cigarette smoke condensate tumor promoting potential in mouse skin” pomimo wielomiesięcznych starań nie zdołano uzyskać potwierdzenia ich udziału w pracy. Jednakże opiekun tych badań i równocześnie Kierownik laboratorium podał informacje o wykonanych przez tych trzech współautorów pracach i zaświadczył, że Doktorant wykonał większą część badań eksperymentalnych w tej pracy. Udział Doktoranta we wszystkich przedstawionych pracach jest ogromny, przede wszystkim w wykonywaniu prac doświadczalnych. Wkład pracy mgra Roberta Żółtaszka został określony w pracy oryginalnej, w której jest on pierwszym autorem na 70%, w dwóch pracach oryginalnych, w których jest on czwartym autorem na 50%, natomiast w pracy przeglądowej, w której jest on pierwszym autorem na 75%. Tak duży udział

Doktoranta w opublikowanych pracach stanowi niezaprzeczalnie podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora na podstawie przedstawionego cyklu prac.

Wszystkie publikacje stanowiące rozprawę doktorską mają wysoką wartość merytoryczną i metodyczną. Problem badawczy podjęty przez Doktoranta jest istotny w poznaniu właściwości przeciwnowotworowych pochodnych kwasu D-glukarowego i ich zastosowaniu w zapobieganiu i leczeniu raka skóry i płuca. Pierwsza praca oryginalna pt.: „Dietary D-glucarate effects on the biomarkers of inflammation during early post-initiation stages of benzo[a]pyrene-induced lung tumorigenesis in A/J mice” opublikowana w 2011 roku, której Doktorant jest pierwszym autorem dotyczy analizy wpływu diety wzbogaconej glukaranem wapnia (GC) na poziom prozapalnych i przeciwzapalnych cytokin w surowicy krwi myszy oraz na indukcję apoptozy i poziom proliferacji komórkowej w tkance płuca na wczesnych etapach transformacji nowotworowej indukowanej przez benzo[a]piren. W surowicy myszy kontrolnych i traktowanych B[a]P oraz traktowanych B[a]P z dietą wzbogaconą GC określono poziom cytokin przy użyciu cytometrii przepływowej. W tkance płucnej badanych myszy poziom ekspresji podjednostki p37 kaspazy-9 indukującej apoptozę określono immunohistochemicznie, natomiast poziom proliferacji określono przy pomocy przeciwciał anti-BrdU. U myszy z zainicjowanym procesem karcynogenezy, którym zastosowano dietę wzbogaconą glukaranem wapnia zaobserwowano w surowicy spadek poziomu cytokin o działaniu prozapalnym (IL-6, TNF- α , IL12p70 i IL-10) i wzrost IFN- γ o działaniu przeciwzapalnym, a w tkance płucnej spadek proliferacji i indukcję apoptozy komórek nowotworowych. Wyniki tej pracy są bardzo istotne ponieważ pokazują, że pochodne kwasu D-glukarowego mogą znaleźć zastosowanie w prewencji rozwoju raka płuca. W kolejnej pracy wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt.: „Short-term biomarkers of cigarette smoke condensate tumor promoting potential in mouse skin” opublikowanej w 2006 roku zaobserwowano, że aplikacja 7,12-dimetylobenzo[a]antracenu (DMBA) i kondensatu dymu tytoniowego (CSC) na skórę myszy wywołuje wzrost aktywności proliferacyjnej, wzrost ekspresji dekarboksylazy ornitynowej oraz hiperplazję komórek w obszarze między-mieszkowym naskórka myszy. W pracy tej wykazano, również że pomimo zaprzestania stosowania CSC w obszarze około-mieszkowym naskórka myszy utrzymuje się wywołany wcześniej wzrost ekspresji dekarboksylazy ornitynowej i aktywność proliferacyjna komórek naskórka, co może być związane z przenikaniem

karcynogenów do mieszka włosowego. Wyniki tych badań sugerują, że obszar okotowotworowej skóry myszy jest prawdopodobnie głównym miejscem transformacji nowotworowej skóry u myszy. Trzecia praca oryginalna wchodząca w skład rozprawy doktorskiej pt.: „Modulation of biomarkers related to tumor initiation and promotion in mouse skin by a natural β -glucuronidase inhibitor and its precursors” opublikowana w 2011 roku dotyczyła badań nad wpływem pochodnych kwasu D-glukarowego na rozwój raka skóry u myszy indukowanego przez DMBA. W pracy tej zaobserwowano, że powierzchniowe podawanie pochodnych kwasu D-glukarowego: D-glukaro-1,4-laktonu (1,4-GL) lub D-glukurono- γ -laktonu (GLU) przed nałożeniem na skórę myszy karcynogenu DMBA w dawce 25 μ g hamuje proliferację naskórka myszy do ok. 57%. W pracy tej wykazano również, że zastosowanie 1,4-GL w raku skóry myszy indukowanym DMBA powoduje zmniejszenie aż do 78% częstości mutacji genu *H-ras* oraz hamowanie ekspresji prozapalnych białek: IL-1 α , Hsp90. Dodatkowo wykazano, że ograniczeniu proliferacji komórek nowotworowych skóry i stanu zapalnego towarzyszy spadek ekspresji β -glukuronidazy w naskórku i skórze właściwej myszy. Wyniki pokazują, że pochodne kwasu D-glukarowego mogą znaleźć zastosowanie w prewencji rozwoju raka skóry. Czwarta praca wchodząca w skład rozprawy doktorskiej, której Doktorant jest pierwszym autorem jest pracą przeglądową opublikowaną w 2008 roku przedstawia stan wiedzy na temat biologicznej roli kwasu D-glukarowego i jego pochodnych oraz ich potencjalnego zastosowania w medycynie. Przegląd literatury oraz własne badania współautorów wskazują, że związki te poprzez modyfikację gospodarki hormonalnej organizmu, hamowanie proliferacji komórek, zmniejszanie stanu zapalnego i indukcję apoptozy wykazują przede wszystkim działanie przeciwnowotworowe.

Podsumowując, wszystkie wieloletnie eksperymentalne prace składające się na rozprawę doktorską mają wysoką wartość metodyczną i poznawczą, a uzyskane wyniki są unikalne w skali światowej. Prace eksperymentalne zostały wykonane w solidny sposób przy użyciu adekwatnych do tego typu badań metod. Uzyskane wyniki badań jednoznacznie dostarczają dowodów na to, że kwas D-glukarowy i jego pochodne działają przeciwnowotworowo i stanowią podstawę do opracowania preparatów farmaceutycznych celem ich suplementacji. Wyniki prac oryginalnych składające się na rozprawę doktorską zostały opublikowane w trzech artykułach w anglojęzycznych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania,

co potwierdza ich wartość poznawczą i wysoki poziom naukowy pracy doktorskiej. Praca przeglądowa dobrze odzwierciedla ówczesny stan wiedzy na temat zastosowania pochodnych kwasu D-glukarowego w medycynie. Prace te były szczegółowo recenzowane i nie znajdują w nich błędów merytorycznych czy edytorskich. Wysoki poziom naukowy opublikowanych prac i znaczący w nich udział Doktoranta dokumentuje bardzo dobrze opanowany przez niego szeroki warsztat badawczy.

Wnioski Końcowe

Przedstawiona do oceny praca doktorska pt.: „Modulacja wybranych biomarkerów przez pochodne kwasu glukarowego w chemicznie indukowanych nowotworach” w pełni spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) dlatego wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pana magistra Roberta Żółtaszka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą prowadzonych badań pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Dr hab. n. med. Izabela Zawlik, prof. UR

