



# SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO W WARSZAWIE

## WYDZIAŁ NAUK O ŻYWIENIU CZŁOWIEKA I KONSUMPCJI

Warszawa, 09.09.2019 r.

Prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska  
Zakład Fizjologii Żywienia  
Katedra Dietetyki  
Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

### RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Damiana Krzyżanowskiego pt.: *„Ekspresja transporterów oporności wielolekowej jako czynnik modulujący wrażliwość komórek na stres oksydacyjny”* wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Bartosza jako promotora i dr Agnieszki Grzelak jako promotora pomocniczego

#### Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Podstawą formalno-prawną opracowania niniejszej recenzji było pismo Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego prof. dr hab. Andrzeja Kruka z dnia 27.06.2019 roku. Przedmiotem recenzji jest ocena czy rozprawa spełnia warunki ustawowe określone w art. 31 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. *o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz.U. z 2014 r. poz. 1852 z późn. zm.) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 stycznia 2018 r. *w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora* (Dz. U. z 2018 r. poz. 261).

Recenzja zawiera szczegółowo uzasadnioną ocenę spełnienia przez rozprawę doktorską warunków określonych w art. 13 ust. 1 Ustawy, a w szczególności czy stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie naukowej *nauki biologiczne* oraz Jego umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

## Ocena wyboru tematyki rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska oparta jest na wynikach badań wykonanych w Katedrze Biofizyki Molekularnej Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego w ramach realizacji dwóch projektów: (1) projektu współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej Program Operacyjny „Innowacyjna Gospodarka” (POIG.01.03.01-24-019/80-00) oraz (2) projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (konkurs Preludium 7, nr 2014/13/N/NZ3/02692). Były to badania *in vitro* wykonane na czterech liniach komórek: trzech liniach komórek nowotworowych człowieka i jednej linii komórek nerki pochodzenia psiego z dwoma liniami klonów stabilnie transferowanych ludzkimi genami białek ABCB1 i ABCG2.

Ze względu na fakt, że choroby nowotworowe są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów w społeczeństwach krajów Europy i obu Ameryk, a zachorowalność na nowotwory w wielu społeczeństwach rośnie lawinowo, poszukuje się nowych, skutecznych, możliwie mało inwazyjnych metod leczenia raka. Jednym z zasadniczych problemów jakie stoją na drodze skutecznej terapii farmakologicznej nowotworów jest oporność komórek nowotworowych na stosowane preparaty. Ta swoista obrona komórek nowotworowych przed działaniem różnych substancji chemicznych stosowanych np. w chemioterapii, pierwotna bądź wtórna (nabyta w trakcie leczenia), skierowana przeciwko jednej substancji lub wielolekowa, utrudnia, a w wielu przypadkach uniemożliwia skuteczne leczenie, a tym samym stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia i życia pacjentów. Zmienione w komórkach nowotworowych szlaki metaboliczne są głównym celem działania wielu leków stosowanych w chemioterapii nowotworów, ale działanie to osłabiają lub uniemożliwiają swoiste białka błon komórkowych z nadrodziny ABC. Białka te są obecne we wszystkich komórkach organizmów *Eucariota* i *Procariota*, pełniąc funkcje transportowe. Są też jednym z elementów naturalnych barier chroniących narządy (np. krew-mózg czy krew-łożysko), a więc są jednym z podstawowych „zabezpieczeń” homeostazy organizmu. Niestety w przypadku komórek nowotworowych, w których ma miejsce nadekspresja białek ABC, te transportery błonowe są głównym utrudnieniem terapii farmakologicznej wynikającej z oporności wielolekowej i powodem dramatycznych rokowań dla pacjentów. Jest więc konieczność poszukiwania związków chemicznych, które specyficznie uwrażliwią odporne na działanie leków komórki nowotworowe. Jednym z potencjalnych mechanizmów działania takich związków jest ich zdolność do generowania reaktywnych form tlenu czyli nasilenia stresu oksydacyjnego, co zmienia „opór” komórek nowotworu na zastosowany specyfik.

W tym kontekście podjęcie przez Doktoranta badań, których wyniki są przedstawione w niniejszej rozprawie uważam za wyjątkowo trafne i w pełni uzasadnione. Za szczególnie cenną uważam próbę określenia wpływu nanosrebra na poziom ekspresji i aktywność transporterów oporności wielolekowej badanego na różnych modelach komórkowych, co może w niedalekiej przyszłości znaleźć bezpośrednie zastosowanie praktyczne w celowanej terapii nowotworów.

## **Ocena ogólna i formalna rozprawy**

Rozprawa doktorska mgr Damiana Krzyżanowskiego jest tradycyjnym, ale akceptowalnym przez znowelizowaną Ustawę *o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki*, opracowaniem w postaci zwartej książki o klasycznym układzie treści. Całość rozprawy to 130 stron tekstu wraz z rycinami i tabelami, drukowanych jednostronnie. Rozprawa podzielona została na kilka części (rozdziałów), w tym: „1. Wstęp”, czyli tzw. przegląd piśmiennictwa zawierający opis aktualnego stanu wiedzy z zakresu prowadzonych badań (28 stron), „2. Cele pracy” (1 strona), „3. Materiały i metody” (23 strony), „4. Wyniki” (39 stron), „5. Dyskusja” (12 stron), „6. Wnioski” (1 strona), „7. Streszczenie” w języku polskim (4 strony), „8. Abstract” w języku angielskim (4 strony), „9. Bibliografia” (7 stron) oraz „10. Suplement” (6 stron) zawierający 3 tabele, w których zamieszczono poziom ekspresji wybranych genów kodujących w komórkach konkretnej sublinii białka związane z apoptozą, białka związane ze szlakiem NF-κB oraz białka związane ze stresem oksydacyjnym. Rozdziały 1, 3 i 4 podzielono na podrozdziały co sprawia, że tekst nabiera przejrzystości i łatwiej się go czyta. Szkoda, że takiego podziału „na części” nie zastosowano do dyskusji. Zasadniczą część rozprawy poprzedza bardzo obszerny wykaz stosowanych skrótów (2,5 strony). Należy zaznaczyć, że jest on bardzo drobiazgowy, co wynika z mnogości stosowanych w tekście skrótów, chociaż chyba trochę przypadkiem znalazły się tam też skróty powszechnie znane, jak HIV, DNA czy RNA. Ta ostatnia uwaga jest oczywiście polemiczna.

Pozytywnie odbieram stronę edytorską rozprawy, która jest napisana komunikatywnym językiem, ma mało błędów literowych i interpunkcyjnych, co świadczy nie tylko o starannym przygotowaniu tekstu, ale też o szacunku dla czytelnika. Mocną stroną rozprawy jest także bogaty materiał ilustracyjny, który stanowi 30 rycin (w tym 22 ryciny to ilustracje wyników badań własnych Doktoranta) oraz 26 tabel (w tym 18 tabel zawiera wyniki badań własnych).

Oceniając rozprawę mgr Dominika Krzyżanowskiego od strony formalnej stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane tego rodzaju opracowaniom, a bogaty materiał ilustracyjny zwiększa znacząco jej wartość merytoryczną.

## **Ocena merytoryczna rozprawy**

Do trafności wyboru tematyki rozprawy odniosłam się już powyżej. Opisany we Wstępie aktualny stan wiedzy dotyczy epidemiologii i terapii chorób nowotworowych, charakterystyki transporterów ABC z omówieniem ich struktury i mechanizmów transportu, powstawania wolnych rodników i ich roli w etiologii nowotworów wraz zjawiskiem oporności wielolekowej i wrażliwości pobocznej, a także działaniu nanosrebra na komórki i organizm. Całość tego wstępu teoretycznego do badań prowadzonych przez Autora rozprawy jest zaplanowana dobrze jeżeli chodzi o zakres treści, natomiast mam wątpliwości czy faktycznie jest to „istniejący stan wiedzy”.

Nie polemizując ze słusnością takiego zakresu wyboru treści jakiego dokonał Doktorant, mam jednak daleko posunięte wątpliwości co do doboru źródeł literaturowych z jakich korzystał. Jak na tak dynamicznie rozwijający się obszar wiedzy jaki stanowi przedmiot rozprawy to cytowane pozycje są w wielu przypadkach stanowczo zbyt „wiekowe”. To jest dla mnie duże zaskoczenie, bo w bazach piśmiennictwa (np. PubMed) artykułów w tym zakresie wiedzy bardzo dużo, można powiedzieć – jest w czym przebierać. Czym wobec tego kierował się Autor rozprawy stosując taki dobór pozycji? Prosiłabym o wyjaśnienie, bo dla mnie jest to niezrozumiałe.

Na 107 cytowanych w tym rozdziale pozycji piśmiennictwa około 20% artykułów było opublikowane 20 i więcej lat temu. Przytoczę tu tylko kilka przykładów. Tabela na str. 10 – czy przez 15 lat nic nowego w tym aspekcie nie pojawiło się? Podobnie na str. 12 pozycje piśmiennictwa 17, 18 i 19 – czy nie pojawiły się żadne nowe informacje pomimo upływu 20 lat?; na str. 16 pozycja 51 bibliografii i tu cytat: „Do niedawna uważano, że ....”, a artykuł opublikowano w 1957 roku! Można było chociaż użyć innego sformułowania. I jeszcze jeden przykład – na str. 23 mechanizmy działania werapamilu zaczerpnięte zostały z artykułów opublikowanych w 1982, 1988 i 1994 roku, a więc trochę dawno. Nawet jeżeli podawane w tym rozdziale fakty nie zostały podważone w późniejszych badaniach, to warto jednak cytować artykuły nowsze. Trzeba jednak przyznać, że dużo cytowanych pozycji piśmiennictwa zostało opublikowanych w ostatnich latach.

Kolejna uwaga związana z cytowaniem piśmiennictwa dotyczy pozycji nr 48. Z całym szacunkiem, ale to jest (wydanie z 2019 r) podręcznik, a nie artykuł oryginalny, a w rozprawach doktorskich raczej unika się cytowania podręczników, chyba że nie ma innych pozycji na konkretny temat. W tym przypadku są i to dużo, a w tym fragmencie tekstu powinna być moim zdaniem zacytowana pozycja 45 z bibliografii.

I jeszcze jedna uwaga krytyczna do tej części rozprawy, a mianowicie na koniec teoretycznych rozważań opartych na opublikowanych już stwierdzonych faktach spodziewałabym się postawienia hipotez badawczych. Mamy jakiś stan wiedzy w konkretnym obszarze merytorycznym i to nas inspiruje do postawienia hipotezy czy hipotez badawczych. Takich hipotez nie znalazłam ani na końcu tego rozdziału, ani w rozdziale kolejnym, gdzie zaprezentowano cele badań.

Cele pracy (powinno być chyba „badań”) zostały sformułowane w trzech punktach. Z tym nie polemizuję, chociaż uważam, że zdanie kończące pierwszy akapit: „sprawdzenie czy nadekspresja transporterów wielolekowych powoduje nadwrażliwość na stres oksydacyjny” jest właśnie celem zasadniczym (czy głównym jak kto woli), natomiast wspomniane trzy cele zamieszczone na stronie 31 rozprawy to według mnie cele szczegółowe.

Stosowane w badaniach materiały i metody zostały opisane bardzo szczegółowo. W badaniach wykorzystano cztery linie komórkowe i ich sublinie (w przypadku komórek gruczolakoraka okrężnicy człowieka jedna i w przypadku komórek nerki pochodzenia psiego dwie). Na stronie 34 rozprawy jest szczegółowy opis tych modeli komórkowych, których wspólną

cechą był adherentny wzrost w kulturach jednowarstwowych. W prezentacji użytych w badaniach materiałów znalazł się też bardzo szczegółowy opis odczynników chemicznych i zestawów komercyjnych, a także jednorazowych materiałów laboratoryjnych.

Zastosowane w badaniach metody zarówno w hodowli komórkowej, jak i w kolejnych analizach są opisane prawidłowo, ze wszystkimi niezbędnymi szczegółami ułatwiającymi ocenę każdej metody. Zakres stosowanych metod jest imponujący i obrazuje ogrom pracy jaką wykonał Doktorant aby osiągnąć zamierzone cele. Szkoda jednak, że tok postępowania w przypadku poszczególnych linii i sublinii komórkowych (a nie było to postępowanie identyczne we wszystkich przypadkach) nie został przedstawiony graficznie na prostych schematach, co zazwyczaj ma miejsce w tego rodzaju opracowaniach i bardzo ułatwia czytelnikowi percepcję całości. Nie zmienia to faktu, że dobór zarówno materiałów, jak i metod badawczych uważam za nowatorski i adekwatny do zrealizowania postawionych w rozprawie celów.

Opis uzyskanych wyników jest napisany bardzo dobrze, bogato ilustrowany wykresami i tabelami, o czym wspominałam już powyżej. Wyników jest imponująco dużo od cytotoksyczności związków utleniających wobec komórek różnych linii, poprzez analizę endogennej produkcji reaktywnych form tlenu, potencjału mitochondrialnego, zmian poziomu ATP i uwalniania cytochromu c przez komórki testowanych linii. I kolejno – zależne od testowanej linii komórkowej wybrane parametry redoks, ekspresja genów kodujących konkretne białka ABC otrzymana metodą qPCR i na poziomie mRNA. Ponadto uszkodzenia i naprawa DNA. Powyższe wyniki, poza oceną cytotoksyczności, posłużyły do identyfikacji mechanizmów oporności pobocznej. Ostatnim etapem badań było określenie wpływu nanosrebra o średnicy 20 nm na wybrane linie komórkowe zarówno w aspekcie cytotoksyczności, jak i zmian ekspresji genów kodujących białka ABC i ekspresji tychże białek. Jak już wspominałam powyżej, opis wyników jest prawidłowy, jednak zabrakło mi końcowego, jeszcze przed dyskusją, krótkiego podsumowania. Lektura drobiazgowego prawie czterdziestostronicowego opisu ze znaczną ilością danych liczbowych jest trudna, natomiast zrekapitulowanie na pół strony najważniejszych wyników pozwoliłyby na docenienie osiągnięć Doktoranta. Tu też odczuwa się brak hipotez badawczych, gdyż parę zdań podsumowujących wyniki jednocześnie pozwoliłoby na pozytywną czy negatywną weryfikację tychże hipotez.

Za nieprawidłowe uważam rozmieszczanie tej samej ryciny na dwóch czy nawet trzech kolejnych stronach rozprawy. W ten sposób przedstawiono większość graficznych ilustracji wyników, co utrudnia porównanie poszczególnych elementów tych obrazów. Wystarczyło nieco zmniejszyć wykresy lub umieścić je na kolejnej stronie, poprzednią wypełniając tekstem.

Zebranie i próby interpretacji wyników znajdują się w dyskusji, która napisana jest logicznie i na szczęście nie powiela, przynajmniej w większości przypadków, cytowania „wiekowych” artykułów. Należy stwierdzić, że ta część rozprawy, pomimo że pozornie krótka w porównaniu z opisem metodyki i wyników, napisana jest ciekawie, a to w jaki sposób jest napisana

świadczy o umiejętności właściwej interpretacji wyników własnych Doktoranta, a więc o Jego dojrzałości naukowej.

O tej dojrzałości i właściwym interpretowaniu uzyskanych wyników świadczy szczególnie ostatni akapit dyskusji (str. 107), który jest jej zwieńczeniem podsumowującym całość rozprawy. Lektura tego kluczowego zdaniem recenzenta fragmentu w pewnym sensie zaciera wcześniejsze niekoniernie pozytywne wrażenia. Podobnie pozytywnie odbieram streszczenie, a właściwie ze względu na obszerny tekst – podsumowanie całości rozprawy.

Ocenianą dysertację wieńczą trzy wnioski, które są dosłowną odpowiedzią na przedstawione wcześniej cele badań. Zdaniem recenzenta ta część dysertacji wymaga dopracowania, jakiegoś uogólnienia, a materiałem do takich przemyśleń może być wspomniany powyżej ostatni akapit dyskusji. Może też warto zastanowić się nad jakimś wnioskiem praktycznym gdyż badania, na podstawie których opracowano przedłożoną do oceny rozprawę, mogą mieć zastosowanie w lecznictwie.

### **Wniosek końcowy**

Reasumując, rozprawa doktorska mgr Damiana Krzyżanowskiego spełnia warunki określone w art. 13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytułach oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2003 r. (Dziennik Ustaw nr 65 pozycja 595 z 2003 r. z późniejszymi zmianami) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 stycznia 2018 r. *w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora* (Dz. U. z 2018 r. poz. 261).

Pomimo licznych krytycznych uwag, które w wielu aspektach mają zapewne charakter polemiczny, a biorąc pod uwagę ogrom pracy eksperymentalnej i analitycznej oraz zasób wiedzy Doktoranta, a także ciekawą dyskusję i staranne opracowanie edytorskie rozprawę oceniam pozytywnie. Stwierdzam, że stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wnosi nową wiedzę do dyscypliny *nauki biologiczne*, a Doktorant wykazał się znajomością ogólnej wiedzy z obszaru będącego przedmiotem rozprawy, a także umiejętnością prowadzenia badań naukowych.

Wnioskuje zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pana mgr Damiana Krzyżanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



