



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr. farmacji Patryka Nowakowskiego
pt. „Wpływ ekstraktów z wybranych grzybów jadalnych
na komórki glejaka wielopostaciowego”
wykonanej w Zakładzie Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
pod kierunkiem naukowym promotora dr hab. n. farm. Renaty Markiewicz-Żukowskiej**

Formalna struktura rozprawy

Praca doktorska mgr. Patryka Nowakowskiego ma układ monografii, która jest wprowadzeniem do wykonanych badań, skrótowym opisem tychże badań i ich wyników. Natomiast bardziej szczegółowy opis badań, które mgr Patryk Nowakowski przeprowadził i opisał w swojej rozprawie na stopień doktora nauk farmaceutycznych, znajduje się w dwóch z czterech załączonych pełnych wersji publikacji naukowych. Wszystkie cztery prace składają się na spójny tematycznie cykl. Doktorant był pierwszym i zarazem korespondującym autorem w dwóch pracach z tego cyklu, w dwóch pozostałych – autorem pierwszym, lecz nie korespondującym. Dwie pierwsze prace mają charakter przeglądowy, następne dwie pozostałe są oryginalnymi pracami badawczymi. Wszystkie prace powstały w latach 2020-2021. Łączny Impact Factor całego cyklu wynosi 23,492 (a poszczególnych publikacji zawiera się w przedziale od 4,556 do 6,529) i odpowiada łącznej liczbie punktów MEiN równej 400,0. Jak wynika z indywidualnych oświadczeń współautorów wszystkich prac, udział Doktoranta w ich powstawaniu należy uznać za dominujący (60-70%). Doktorant miał niewątpliwie przeważający wkład w realizację przeprowadzonych badań, ponieważ był autorem ich koncepcji i planu, wykonawcą części eksperymentalnej, a także osobą zaangażowaną w opracowanie i interpretację wyników oraz redagowanie manuskryptu.

Zakład Bromatologii

ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, tel. +48 12 620 56 70, faks +48 12 620 56 93

e-mail: bromatologia@uj.edu.pl, www.farmacja.cm.uj.edu.pl

upł. 24.06.2022 JR

Wszystkie prace wchodzące w skład ocenianego cyklu zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych, były więc już poddane szczegółowej ocenie przez specjalistów z odpowiednich dziedzin. Zespoły redakcyjne tych czasopism są rękojmią wysokiego poziomu naukowego i oryginalności publikowanych artykułów.

Oprócz kopii wymienionych publikacji, recenzowana praca doktorska obejmuje następujące części: wprowadzenie, cel pracy, metodologię, uzyskane wyniki wraz z dyskusją, wnioski, piśmiennictwo, graficzny abstrakt pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim.

Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie

Badania nad terapią glejaków mózgu są obecnie uważane za jeden z najbardziej obiecujących, ale i najtrudniejszych kierunków w onkologii. Glejak wielopostaciowy – guz mózgu o najwyższym stopniu złośliwości histologicznej, będący przedmiotem szczegółowych dociekań Doktoranta, najczęściej występuje u osób dorosłych, powyżej 50 roku życia. W Polsce zapada na tę chorobę ok. 2 tys. osób rocznie. Do tej pory nie można niestety mówić o istnieniu jednoznacznie skutecznych interwencji terapeutycznych w przypadku tej choroby – średni okres przeżywalności z rozpoznaniem glejakiem mózgu wynosi około półtora roku. Leczenie kompleksowe (operacyjnie, radio- i chemioterapią) może go wydłużyć, jednak rokowanie w większości przypadków wciąż pozostaje niepomyślne. Zatem badania Doktoranta, zmierzające do włączenia nowych preparatów pochodzących z grzybów jadalnych do standardowego leczenia glejaka, stanowią bardzo innowacyjne podejście do wyjaśnienia i rozwiązania zagadnienia, trudnego zarówno z naukowego, jak i z medycznego punktu widzenia. Nie wątpię, że w przyszłości wyniki badań Doktoranta mają szansę posłużyć do opracowania nowego schematu wspomagania terapii groźnego nowotworu.

Metodyka badawcza (cel, metody)

Głównym celem recenzowanej pracy było przebadanie działania przeciwnowotworowego ekstraktów z czterech wybranych gatunków grzybów jadalnych. Działanie to oceniono wobec komórek glejaka wielopostaciowego oraz komórek astrogleju ludzkiego. W metodyce prac doświadczalnych Doktorant uwzględnił ocenę aktywności przeciwnowotworowej w kilku odrębnych modelach *in vitro*, dzięki czemu przedstawione badania zyskały walor studiów wnikliwych i całościowych, co dobrze świadczy o kreatywności Doktoranta i wysokim poziomie jego warsztatu badawczego, zapewniając prawidłową realizację zakładanych celów badawczych.

Szczegółowa ocena merytoryczna poszczególnych publikacji wchodzących w skład rozprawy

Wprowadzeniem do eksperymentalno-badawczej części rozprawy jest przegląd piśmiennictwa, kompetentnie dokonany w dwóch pierwszych publikacjach (**P1** i **P2**), których treść w interesujący sposób przybliża zagadnienia związane z celem tej dysertacji. Każda z prac przeglądowych składa się z kilku rozdziałów, a ujęte łącznie uwzględniają bardzo szeroki wachlarz zagadnień. Badania własne Autora obejmują dwie części przedstawione, odpowiednio, w pracach **P3** i **P4**.

W pracy **P1** Autor i współpracownicy scharakteryzowali mniej znany gatunek grzybów, znany pod nazwą czernidłak kołpakowaty. Praca ta ma charakter monografii, kompletnej pod względem merytorycznym, zawierającej wszechstronny, drobiazgowy opis niemal wszystkich aspektów biochemii tego gatunku grzybów. W artykule przedstawiono wiele wartościowych danych eksperymentalnych i wniosków pochodzących z badań innych autorów. Ich dyskusja i krytyczna ocena potwierdza dojrzałość naukową Autora. Ta część pracy napisana jest przejrzysto i z dużą znajomością przedstawianych zagadnień.

Praca **P2** stanowi usystematyzowane kompendium wiedzy na temat 92 gatunków grzybów, których ekstrakty charakteryzują się aktywnością przeciwnowotworową. W pracy tej zebrano udokumentowane wyniki badań przeprowadzonych na wielu typach nowotworów i przy zastosowaniu wielu różnych modeli eksperymentalnych, z uwzględnieniem rozmaitych mechanizmów działania cytotoksycznej substancji zawartych w takich ekstraktach. Złożona patogeneza i niejednorodność wielu zmian nowotworowych (w tym – glejaków mózgu) uzasadnia przeprowadzenie tak szerokiej analizy literatury naukowej umożliwiającej wiarygodne podsumowanie stanu wiedzy w tej dziedzinie. Dobrane piśmiennictwo jest bogate i zróżnicowane. Świadczy to o umiejętności Doktoranta korzystania z aktualnych zasobów literaturowych przedmiotu, zawartych głównie w renomowanych czasopismach.

Wartości stężeń pierwiastków toksycznych (Hg, Pb, Cd i As), wyznaczone w blisko pięćdziesięciu gatunkach grzybów leśnych, zostały podane w pracy **P3**. W badaniach Doktoranta uwzględniony został aspekt bezpieczeństwa spożycia badanych grzybów, wynikający z ryzyka ich intoksykacji pierwiastkami szkodliwymi dla człowieka. Ryzyko to oszacowano przy pomocy pięciu różnych wskaźników, co świadczy o kompleksowym ujęciu tego aspektu badań.

Konsekwentnie, w oparciu o gruntowną analizę źródeł (praca **P2**), a także wiedzę i wyniki zgromadzone w pracach **P1** i **P3**, Autor wytypował do swoich finalnych badań (praca **P4**) cztery gatunki grzybów, nieprzebadanych dotychczas pod kątem skuteczności ich działania

przeciwnowotworowego względem komórek glejaka wielopostaciowego, a różniących się stopniem poznania aktywności biologicznej tych gatunków. Ta część całego cyklu jest najciekawsza i najważniejsza. Znajdują się tu m.in. wyniki analizy cytotoksyczności ekstraktów z badanych grzybów, ocena syntezy DNA w komórkach poddanych działaniu tych ekstraktów, wyniki wyznaczania aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP2 i MMP9), a także – ewaluacja zmian przebiegu cyklu komórkowego wywołanych działaniem ekstraktów. Wyniki pracy P4 dają silne przesłanki do wytypowania tych grzybów, których ekstrakty mogą w największym stopniu ograniczać progresję i przerzutowanie glejaka wielopostaciowego, nie szkodząc równocześnie komórkom zdrowym.

Każda z dwóch publikacji eksperymentalnych zawiera drobiazgowy i rzetelny opis procedur laboratoryjnych. Tam gdzie to możliwe, procedury te zostały odpowiednio zwalidowane. Wszystkie pomiary wykonano starannie. Wyniki badań poddane zostały ocenie statystycznej, z wykorzystaniem standardowych testów a także mapy ciepła i analizy składowych głównych. Interpretacja wyników nie budzi zastrzeżeń.

Z przeprowadzonych badań i studiów literaturowych Autor wysnuł cztery logiczne i dobrze uzasadnione wnioski, które, podane zwięźle i jasno, odzwierciedlają najważniejsze osiągnięcia. Recenzent zgadza się również z ogólną konkluzją, iż dotychczasowe badania powinny znaleźć swoje przedłużenie w eksperymentach na modelach zwierzęcych.

Inne uwagi

Części: redakcyjna, formalna i edytorska całej pracy wykonane została bardzo starannie. Jedynie z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na kilka potknięć i sformułowań wartych w mojej ocenie drobnej korekty w przyszłych publikacjach.

Autor w kilku miejscach, na stronach 10 i 12, wspomina o pomiarach wykonanych „na” różnych aparatach. Otóż, jak twierdzą chemicy-puryści językowi, „na aparacie” można postawić jakiś inny przedmiot, ale pomiary wykonuje się „za pomocą aparatu” albo „wykorzystując aparat” do konkretnego pomiaru.

Warto również zauważyć, iż metodą zymografii żelatynowej można wyznaczyć aktywność metaloproteinaz, ale nie ekspresję tych enzymów, jak zasygnalizowano na str. 11.

Opisując podejście statystyczne w pracy P3, Doktorant i współpracownicy stwierdzili: „The data were subjected to Principal Components Analysis (PCA) in order to **reduce the variables** (...)”. W przypadku metody PCA nie chodzi wszakże o redukcję zmiennych (bo sens takiej frazy byłby niejasny), ale o **redukcję liczby zmiennych**.

Inna kwestia związana z tą metodą statystyczną. Ważnymi, wręcz kryterialnymi parametrami, obok względnej wielkości wariancji oryginalnych zmiennych, tłumaczonej przez kolejne składowe główne modelu PCA, są wartości własne tychże kolejnych składowych głównych. W pracy **P3** wartości te nie zostały jednak podane. Byłoby także ciekawe porównać strukturę korelacji pomiędzy zmiennymi, jaką można ujawnić stosując metodę PCA, z korelacjami wyznaczonymi w pracy **P3** przy pomocy prostszych metod.

Wymienione wyżej uwagi i sugestie nie obniżają bardzo pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej autorstwa mgr. Patryka Nowakowskiego. Uważam, że oceniana rozprawa jest niezwykle wartościowa i **zasługuje na wyróżnienie**. Należy dodać, że Doktorant ma pokaźny dorobek naukowy. Poza pracami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej jest współautorem dwudziestu innych publikacji o łącznym IF ponad 68 punktów. Wszystkie te walory wskazują na znakomite przygotowanie Doktoranta do pracy naukowej.

Podsumowanie

Podsumowując, stwierdzam, że znajomość zagadnień teoretycznych, zakres przeprowadzonych badań oraz całokształt działalności naukowej i organizacyjnej mgr. Patryka Nowakowskiego wskazują na wysoki poziom jego kompetencji zawodowych jako naukowca. Przedstawiona do oceny dysertacja w pełni odpowiada warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim. Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr. Patryka Nowakowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Zakład Bromatologii UJ CM

dr hab. Paweł Zięgocki, prof. UJ
kierownik