

Bydgoszcz, 28.06.2022

Dot. Oceny pracy doktorskiej Pana mgr Piotra Wójcika

Ocenę przygotowano w związku z pismem Prof. Wojciecha Miltka, Dziekana Kolegium Nauk Farmaceutycznych, po wcześniejszej decyzji Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (161/2022).

Informacje ogólne

Podstawą ubiegania się Pana mgr Piotra Wójcika o stopień naukowy doktora jest rozprawa na temat: "Redox balance and changes in lipid and protein metabolism in patients with psoriasis" przygotowana w języku angielskim. Promotorami pracy są: Prof. Elżbieta Skrzydlewska z Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku i Prof. Neven Žarković z Laboratory of Oxidative Stress, Rudjer Boskovic Institute w Zagrzebiu, a promotorem pomocniczym jest dr Agnieszka Gęgotek również z Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Rozprawa doktorska oparta jest na serii sześciu artykułów. Zawiera kilka stron wstępu, po którym następuje określenie celu prezentowanych badań. Kolejne rozdziały zawierają artykuły zawarte w dorobku przedłożonym jako rozprawa doktorska; wszystkie publikowane są w latach 2019-2021 w czasopiśmie z listy JCR. Cztery z nich to oryginalne prace naukowe, a dwie to prace przeglądowe. Łączny Impact Factor prezentowanych artykułów wynosi 26,518, a łączna punktacja MNiSW (MEiN) to 760. We wszystkich publikacjach kandydat jest pierwszym autorem, a jego wiodący wkład jest określony w odrębnych dokumentach potwierdzonych przez Promotora. Przedstawiono również oświadczenia o wkładzie wszystkich współautorów i są one zgodne z oświadczeniami pierwszego autora. Po publikacjach praca zawiera rozdziały z krótką dyskusją, wnioski, spis piśmiennictwa, streszczenie pracy w języku angielskim w języku polskim, kopię zgody wyznaczonej komisji bioetycznej wraz z wnioskiem o zatwierdzenie planowanych eksperymentów. Na końcu rozprawy Autor ponownie zamieścił wykaz publikacji będących podstawą pracy oraz inne prace współautorskie (dwie o łącznej liczbie IF 8.548 i MNiSW 240) oraz spis streszczeń

konferencyjnych. Ostatni rozdział to Curriculum vitae Kandydata. Rozprawa jest napisana przejrzyście i logicznie, z dobrą znajomością języka angielskiego.

Ocena pracy doktorskiej

Problem biologiczny podjęty przez Pana mgr Wójcika i współautorów jego pracy dotyczy mechanizmów związanych z zaburzeniami równowagi w reakcjach redoks oraz modyfikacjami metabolizmu lipidów i białek u pacjentów z łuszczycą. Choć choroba została dobrze zbadana, nadal istnieją luki w wiedzy, w jaki sposób poszczególne szlaki biochemiczne są aktywowane w różnych postaciach klinicznych choroby i jakie czynniki odgrywają główną rolę w tych modulacjach. We Wstępie Kandydat przedstawia aktualną wiedzę na temat choroby i mechanizmów molekularnych patofizjologii łuszczycy, podkreślając rolę reaktywnych form tlenu i azotu (odpowiednio RFT i RNS) oraz wyjaśniając implikacje ich nadprodukcji. Pan mgr Wójcik jasno wyjaśnia konsekwencje interakcji między ROS/RNS a lipidami i białkami, szczególnie w limfocytach i granulocytach, które są bezpośrednio zaangażowane w rozwój łuszczycy. W kolejnym rozdziale opisuje związek pomiędzy wspomnianymi procesami a nieprawidłowościami zachodzącymi w keratynocytach, co prowadzi do obserwowalnych objawów choroby. Autor wyjaśnia rolę poszczególnych cytokin, ich pochodzenie oraz sposób modulowania procesów biochemicznych w łuszczycy. Na końcu części wprowadzającej znajduje się krótki opis kannabidiolu, fitokannabinoidu, który wydaje się mieć znaczący potencjał w leczeniu łuszczycy i który stał się jednym z celów badawczych w prezentowanej pracy. Cel studiów jest dobrze zdefiniowany; głównym celem było poznanie dokładnych mechanizmów działania ROS w limfocytach pacjentów z łuszczycą. Następnie określono wpływ ROS na rozwój i manifestację różnych postaci łuszczycy. Na koniec autorzy zbadali, w jaki sposób kannabidiol wpływa na ścieżki regulacyjne w łuszczycy i ocenili, czy może być przydatny w terapii skojarzonej z promieniowaniem UVB.

Pierwszy artykuł został opublikowany w 2020 roku w Journal of Biochemistry (IF 2.476 i MNiSW 100). Praca dotyczyła zbadania zaburzeń równowagi redoks i jej wpływu na modyfikację białek w limfocytach u pacjentów z łuszczycą. Według Scopus artykuł miał 9 cytacji w dniu sporządzania niniejszej oceny. Autorzy wykonali szeroki zakres oznaczeń analitycznych, w tym między innymi: luminescencję, elektronowy rezonans spinowy,

Western Blot, elektroforezę kapilarną, chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas. Wszechstronny wgląd w zmiany biochemiczne limfocytów pozwolił im rozpoznać nasilenie stanów prooksydacyjnych w łuszczycowym zapaleniu stawów (PsA) w porównaniu z łuszczycą zwykłą (PsV). Monitorowanie aktywatorów czynnika transkrypcyjnego Nrf2 wykazało ich wyższy poziom w PsV. Dodatkowo zauważyli zwiększoną ekspresję kaspaz proapoptotycznych, która wynikała z modyfikacji białek przez produkty peroksydacji lipidów identyfikowane jako 4-oksononenal i dialdehyd malonowy. Co ciekawe, autorzy stwierdzili istotne różnice między obiema badanymi grupami pod względem ekspresji kaspazy 3 – była ona podwyższona w PsV i obniżona w PsV. Podkreślili jednak, że ostateczna apoptoza jest wynikiem współistnienia kilku szlaków z udziałem Bcl2, cytochromu c lub p53. Określono i porównano poziom ekspresji wyżej wymienionych białek oraz poziomy NFκB i TNFα dla PsV i PsV. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że silniejsza aktywacja szlaku Nrf2 może być wynikiem mniejszego stresu oksydacyjnego występującego w limfocytach pacjentów z PsV. Jednocześnie profile białek modyfikowanych przez produkty peroksydacji lipidów sugerują, że czynnik ten odgrywa kluczową rolę w aktywacji szlaków prozapalnych i proapoptotycznych w PsV. Wyniki te mogą stać się podstawą do dalszych badań mających na celu poszukiwanie terapii celowanych w łuszczycę.

Druga praca z tej serii dotyczy badania różnic między PsV i PsA w odniesieniu do zmian lipidowych w jednojądrzastych komórkach krwi. Artykuł został opublikowany w 2019 roku w International Journal of Molecular Sciences (IF 4.556, MNIŚW 140) i uzyskał już 26 cytacji, co jest liczbą imponującą, szczególnie jak na oryginalną pracę naukową. Zwykle Impact Factor czasopism jest miernikiem, który bierzemy pod uwagę przy ocenie dorobku doktorantów, ponieważ ramy czasowe poszczególnych artykułów są zbyt wąskie, aby ocenić wartość artykułów, ale w tym przypadku liczba cytacji bezpośrednio odzwierciedla wartość pracy. Podobnie jak w poprzedniej pracy, autorzy wykorzystali wielowymiarową metodologię do zbadania różnych aspektów tematu. Większość analiz przeprowadzono na spektrometrze mas typu potrójny kwadrupol sprzężonym z ultrawysokosprawną chromatografią cieczową. Wśród związków oznaczonych za pomocą UHPLC-MS/MS były niestabilne związki, takie jak endokannabinoidy czy mediatory lipidowe. Ponieważ publikacja koncentrowała się na badaniach biologicznych, autorzy nie przedstawili wyników walidacji metody, ale odnieśli się do oryginalnych protokołów. Ze względu na moje osobiste doświadczenia z oksylipinami i endokannabinoidami chciałbym zapytać Kandydata o jego doświadczenia w tym zakresie i

wyniki stabilności raportowanych metabolitów – jaka była stabilność badanych metabolitów i w jaki sposób była ona monitorowana w czasie przygotowania próbki i analizy instrumentalnej. Autorzy uzyskali bardzo interesujące wyniki wskazujące na silny wpływ stresu oksydacyjnego na zmianę fosfolipidów, endokannabinoidów i eikozanoidów w komórkach jednojądrzastych, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju łuszczycy. Jednak najciekawszymi i najważniejszymi odkryciami były różnice w profilach fosfolipidów, poziomach metabolitów lipidów i endokannabinoidów oraz aktywności COX-1 (ale nie COX-2) między PsV i PsV. Badanie to potwierdza, że badanie gatunków lipidów i szlaków metabolicznych, w które są zaangażowane, może być kluczem do zrozumienia różnych patologii powiązanych chorób, a tym samym do znalezienia skutecznej terapii.

Kolejny artykuł to artykuł przeglądowy podsumowujący, w jaki sposób stres oksydacyjny i mediatory lipidowe modulują funkcje komórek odpornościowych w chorobach autoimmunologicznych. Praca została również opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* (IF 5.924 i MNiSW 140) w 2021 r. i uzyskała 9 cytacji na dzień przygotowania niniejszej oceny. Druga praca przeglądowa zawarta w rozprawie została opublikowana w 2020 r. w *Biomolecules* (IF 4.082, MNiSW 100) i dotyczyła udziału mediatorów metabolicznych lipidów w regulacji apoptozy. Praca ta była cytowana 13 razy. Choć prace przeglądowe często nie są traktowane na równi z artykułami oryginalnymi w ocenie dorobku naukowego, to moim zdaniem są one niezwykle ważnym czynnikiem w procesie przygotowania do pracy naukowej w danej dziedzinie, zwłaszcza dla badacza na wczesnym etapie kariery. Dobrze przygotowany przegląd literatury światowej pozwala poszerzyć horyzonty i spojrzeć na badania prowadzone przez autora przez pryzmat badań prowadzonych w innych instytutach. Dynamika i interdyscyplinarność badań z zakresu nauk biomedycznych, w tym różnorodność metodologiczna, zwłaszcza na poziomie molekularnym, wymusza na naukowcach aktualizację posiadanej wiedzy. Z drugiej strony, umiejętność krytycznego spojrzenia na wyniki badań, wyselekcjonowania najważniejszych raportów i podsumowania ich wpływu na rozwój danej dziedziny w sposób wartościowy dla czytelnika, jest bardzo cenionym atrybutem dobrego naukowca. Moim zdaniem jakość dyskusji przedstawionej w pracach oryginalnych Kandydata przynajmniej częściowo wynika z pogłębionego przeglądu literatury przedmiotu podczas przygotowywania prac przeglądowych. Warto również zauważyć, że zamieszczone w tych pracach ryciny i schematy

ilustrujące różne mechanizmy opisane w tekście wydają się być przygotowane przez autorów, gdyż nie mają odniesienia do żadnych materiałów źródłowych.

Dwie ostatnie publikacje prezentowane w ramach pracy doktorskiej to prace oryginalne, obie opublikowane w International Journal of Molecular Sciences w 2020 (IF 5.556, MNiSW 140) i 2021 (IF 5.924, MNiSW 140). Pierwsza praca, która dotyczy udziału kannabidiolu w tworzeniu zewnątrzkomórkowej pułapki neutrofilowej (NET) w neutrofilach pacjentów z łuszczycą, ma już 6 cytacji, natomiast druga, która koncentruje się na badaniu korelacji między kannabidiolem (CBD) a działaniem antyapoptotycznym w keratynocytach podczas fototerapii UV była cytowana dotychczas jeden raz. Kannabinoidy, a w szczególności kannabidiol, są ostatnio szeroko badane w różnych chorobach, w tym chorobach autoimmunologicznych i chorobach idiopatycznych. Pan mgr Wójcik i jego współpracownicy podjęli próbę oceny wpływu CBD na neutrofile izolowane z krwi pacjentów z PsV poprzez monitorowanie odsetka neutrofilek poddawanych NETozie oraz poziomu kilku markerów NETozy. Aby móc wiarygodnie wskazać, jakie zmiany są związane z jakimi związkami dodanymi do badanego układu, autorzy zaprojektowali „kontrolę wewnętrzną” tj. neutrofile+LPS (neutrofile z aktywowane NETozą) i neutrofile+CBD, które porównano z neutrofilami+LPS+CBD. Początkowo autorzy zaobserwowali, że odsetek neutrofilek objętych NETozą bez wprowadzania dodatkowych aktywatorów jest istotnie wyższy w grupie PsV w porównaniu z grupą kontrolną. Następnie, dla aktywowanych neutrofilek, byli w stanie udowodnić, że kannabidiol zmniejsza markery NETozy, sugerując w ten sposób jego potencjał w leczeniu łuszczycy i prawdopodobnie innych chorób autoimmunologicznych. Należy podkreślić, że metodologia wymagana w tym badaniu była inna niż w poprzednich pracach. Świadczy to o wysokich umiejętnościach badaczy, zwłaszcza Pana mgr Wójcika, który był głównym analitykiem, jak podano w części dotyczącej wkładu w pracę. Kolejne badanie kannabidiolu dotyczy interesującego aspektu wykorzystania tego związku jako środka potencjalnie redukującego apoptozę zdrowych keratynocytów po ekspozycji na promieniowanie UVB. Zabieg zastosowania UVB jest często stosowaną terapią u pacjentów z łuszczycą, ale nie jest selektywny wobec chorych komórek i aktywuje także szlaki proapoptotyczne w zdrowych keratynocytach, co z kolei wiąże się z występowaniem działań niepożądanych i wymusza wprowadzenie leczenia przeciwzapalnego. Jak poprzednio, część eksperymentalna badania została starannie zaplanowana tj. wzięto pod uwagę wszystkie niezbędne „zewnętrzne” (zdrowe komórki) i „wewnętrzne” kontrole (komórki hodowane z

indywidualnymi „bodźcami”). Kompleksową analizę białek i prostaglandyn przeprowadzono za pomocą technik Western Blot, ELISA i LC-MS/MS. Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę o hamującym wpływie kannabidiolu na szlaki apoptotyczne w keratynocytach z silniejszym działaniem obserwowanym w zdrowych komórkach. Doniesiono jednak o interesujących odkryciach dotyczących rozbieżności w działaniu promieniowania UVB na komórki zdrowe i łuszczykowe, wskazując dodatkowo zwiększoną ekspresję kaspazy 2, zmniejszoną ekspresję p-AKT wraz z podwyższonym poziomem 15-d-PGJ2 i ekspresją p-53 w chorych keratynocytach. Wspomniany wzrost kaspazy 2 definiuje napromienianie UVB jako stresora retikulum endoplazmatycznego i wydaje się, że działanie to zanika w obecności kannabidiolu. Dlatego potencjalna terapia adjuwantowa UVB-kannabidiol wymaga dalszych badań i starannego zaplanowania, aby nie osłabiać efektów leczenia UVB, ale wykorzystać ochronne działanie kannabidiolu na zdrowe komórki skóry.

Wnioski

W mojej ocenie, osiągnięcie przedstawione przez Pana mgr Piotra Wójcika jako Jego rozprawa doktorska stanowi dobrze zaplanowaną, spójną całość o wysokiej wartości naukowej. Z przedstawionych prac wynika, że Kandydat był dobrze przygotowany do prowadzonych badań, zarówno pod względem merytorycznym, jak i doświadczenia. Praca pozbawiona jest błędów merytorycznych, ortograficznych i stylistycznych. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na błędy i niedociągnięcia redakcyjne, np. błędy w numeracji publikacji w Rozdziale 1 i numeracji przyporządkowanej poszczególnym rozdziałom w Rozdziale 3 (Cel badań). Pomocna byłaby również lista skrótów umieszczona na początku rozprawy. Jednak te małe zaniedbania nie wpływają na ogólną ocenę pracy. Jako recenzent pozwalam sobie na rozszerzenie oceny prezentowanej rozprawy o ogólny dorobek Kandydata, gdyż niewątpliwie jego całokształt działalności wpłynął na jakość artykułów stanowiących jego rozprawę doktorską. Warto wspomnieć, że aktualny indeks Hirscha Pana Piotra Wójcika wynosi 6, a łączna liczba cytacji artykułów, których jest współautorem to 127. Kandydat aktywnie uczestniczył również w konferencjach; Jego prace i prace Jego współautorstwa były prezentowane ośmiokrotnie na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Odbył również sześć staży trwających od 1 tygodnia do 2 miesięcy, cztery w Polsce i dwa w Chorwacji w laboratorium swojego promotora prof. Żarkowicia. Kandydat zgłosił również jeden projekt

badawczy, ale nie podano szczegółowych informacji, czy był jego kierownikiem, czy wykonawcą.

Podsumowując, na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że znacząco przyczynia się ona do rozwoju Dyscypliny Nauk Medycznych oraz w pełni spełnia wymogi merytoryczne i formalne stawiane pracy doktorskiej. Zwracam się do Wysokiej Rady Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pana mgr Piotra Wójcika do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień doktora. Jednocześnie ze względu na wysoki poziom pracy, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Kierownik
Katedry Farmakodynamiki
i Farmakologii Molekularnej

dr hab. Barbara Bojko, prof. UMK