



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
30-683 Kraków, ul. Medyczna 9
e-mail: monika.1.dabrowska@uj.edu.pl

Kraków, 3 styczeń 2024

OCENA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

pt. „Efekty działania nanocząstek krzemionki i zredukowanego tlenku grafenu na wybrane komórki nowotworowe w warunkach *in vitro*”
oraz całokształtu działalności naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej
dr n. med. Rafała Krętowskiego
adiunkta w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Oceny dokonano na zlecenie Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Przedmiotem postępowania jest wniosek zainteresowanego z dnia 11 maja 2023r. o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Przebieg zatrudnienia i kariery naukowej

Pan dr n. med. Rafał Krętowski jest absolwentem kierunku Analityka Medyczna Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Dyplom magistra analityki medycznej uzyskał w 2008r. Następnie, w 2014r. uzyskał stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna, nadany uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, na podstawie rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Regulacyjna rola białka opiekuńczego ORP150 w metabolizmie kolagenu w komórkach raka sutka linii MCF-7”, przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marzanny Cechowskiej-Pasko. Bezpośrednio po ukończeniu studiów, dr n. med. Rafał Krętowski rozpoczął pracę w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, w grupie pracowników naukowo-dydaktycznych, początkowo na etacie asystenta (w latach 2008-2016), a następnie adiunkta (od 2016r.), na którym pracuje do chwili obecnej.



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM

Habilitant odbył jedynie dwa krótkoterminowe staże naukowe w krajowych ośrodkach badawczych; 12-sto dniowy w Centrum Innowacji Badań i Nauki w Lublinie (18-29.07.2022r.), w ramach którego brał udział w realizacji projektów prowadzonych w Ogrodzie Roślin i Surowców Kosmetycznych CIBiN, dotyczące poszukiwania roślinnych substancji o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym oraz substancji i surowców zapachowych dla przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego, oraz 5-cio dniowy staż badawczo-naukowy w Katedrze i Zakładzie Chemii i Analizy Leków Wydziału Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (24-28.04.2023r.), gdzie doskonalił umiejętności praktyczne związane z prowadzeniem hodowli komórkowych, zapoznawał się z metodami spektrofotometrycznymi wykorzystywanymi w analizie homeostazy komórkowej oraz metodami bioobrazowania molekularnego komórek nowotworowych przy użyciu technik mikroskopii konfokalnej. Niestety Habilitant nie odbywał staży zagranicznych.

Ocena osiągnięcia naukowego

Głównym osiągnięciem naukowym Habilitanta, stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest monotematyczny cykl 4 oryginalnych artykułów pod wspólnym tytułem „Efekty działania nanocząstek krzemionki i zredukowanego tlenu grafenu na wybrane komórki nowotworowe w warunkach *in vitro*”. Przedłożone opracowanie stanowi spójną całość i jest konsekwencją dotychczasowego kierunku badań Habilitanta. Prace zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (Nanomaterials (H-1) oraz w International Journal of Molecular Sciences (H-2, H-3, H-4) w latach 2017-2023, co wskazuje na niewątpliwą aktualność zaprezentowanych wyników. Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF wynosi 22,128, co odpowiada 455 pkt. MEiN. Na podkreślenie zasługuje fakt, że średnia wartość IF na pracę wynosi 5,532 (3,504 do 6,208). Wszystkie prace wchodzące w skład cyklu są wieloautorskie, we wszystkich Habilitant jest zarówno pierwszym jak i korespondencyjnym autorem, co świadczy o jego wiodącej roli w powstaniu publikacji, polegające na opracowaniu hipotezy i koncepcji badawczej, przeprowadzeniu analiz eksperymentalnych, interpretacji uzyskanych wyników oraz redagowaniu publikacji. Wskazuje również na dobre przygotowanie Habilitanta do przyszłej działalności naukowej jako samodzielnego pracownika akademickiego. Na jednoznacznie pozytywną ocenę zasługuje duża zgodność tematyczna całościowego dorobku naukowego Habilitanta z tematyką osiągnięcia habilitacyjnego. Do dokumentacji dołączone zostały oświadczenia współautorów potwierdzające ich udział w powstaniu prac. Wyodrębniony cykl stanowią prace już opublikowane (recenzowane i zaakceptowane), a rezultaty przedstawionych badań posiadają duże znaczenie poznawcze oraz zastosowanie w praktyce klinicznej; mogą stanowić nowoczesną strategię terapeutyczną w terapii nowotworów, których leczenie ciągle stanowi wyzwanie wynikające z oporności wielolekowej lub aktywacji dróg adaptacyjnych promujących przeżycie oraz proliferację komórek.



UNIwersytet Jagielloński COLLEGIUM MEDICUM

Tematyka przedstawionego cyklu publikacji skoncentrowana jest wokół kwestii wypracowania komplementarnego podejścia do nanoterapii, która otwiera nowe możliwości terapeutyczne w walce z nowotworami wykazującymi oporność na standardowy schemat leczenia, w tym z glejakiem wielopostaciowym mózgu oraz rakiem sutka.

Tytułem wprowadzenia Habilitant przedstawia sytuację epidemiologiczną związaną z zachorowalnością i śmiertelnością populacji ludzkiej na nowotwory, oraz omówienie nowego, kompleksowego podejścia do procesu leczenia, obejmującego wdrożenie wczesnej diagnostyki oraz opracowanie strategii terapeutycznych opartych m.in. na projektowaniu cząsteczek o potencjalnym działaniu terapeutycznym. Wskazuje na kierunki poszukiwania innowacyjnych metod leczenia, w który to trend wpisuje rozwój nauk nanobiomedycznych, dążących do opracowania „inteligentnego leku” na raka. Habilitant podkreśla celowość badań mających na uwadze opracowywanie nowoczesnych chemio-nanoterapeutyków, skierowanych wybiórczo w celu eliminacji komórek nowotworowych, wskazując na możliwości związane z wykorzystaniem nanocząstek (SiNPs i rGO). Omawia właściwości fizykochemiczne oraz mechanizmy cytotoksycznego działania nanocząstek na komórki nowotworowe. Wskazuje, że pomimo postępu w naukach nanobiomedycznych mechanizm interakcji nanocząstek, w tym SiNPs oraz rGO, z żywym organizmem ze względu na swoją złożoność wciąż jest nie w pełni poznany i zrozumiany, uzasadniając tym samym wybór tematyki i celowość pojętych badań. Wybór modeli badawczych uzasadnia zaś częstotliwością występowania określonych typów nowotworów oraz ich oporność na standardowy schemat leczenia, a także potencjałem terapeutycznym wynikającym z zastosowania nanocząstek.

Habilitant postawił sobie do zrealizowania dwa główne cele badawcze: zbadanie profilu nanotoksykologicznego rGO i SiNPs na wybranych liniach komórek nowotworowych w porównaniu do prawidłowej linii fibroblastów oraz efektów biologicznego działania wybranych nanomateriałów w analizowanych liniach komórkowych, determinujących obserwowany efekt cytotoksyczny.

Prezentowane w ramach cyklu publikacje obejmowały kompleksowe badania *in vitro* z wykorzystaniem linii komórek ludzkich, umożliwiające na wczesnym etapie testów ocenę właściwości badanej substancji pozaustrojowo, co pozwala na eliminację badań na zwierzętach.

Celem pierwszej z prac wchodzących w skład cyklu [H-1] była ocena efektów komórkowych i molekularnych działania SiNPs na ludzkie komórki glejaka wielopostaciowego mózgu. Podjętym przez Habilitanta zagadnieniem było wykazanie różnicy w wartości potencjału zeta ζ i rozmiarach SiNPs w zależności od ośrodka dyspersyjnego. Powłoka białkowa może zmienić zachowanie SiNPs, potencjalnie modyfikując stan agregacji i odpowiedź komórkową. W kolejnym etapie, określono stopień cytotoksycznego działania, różnej wielkości SiNPs w komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu linii LBC3, LN-18 oraz prawidłowej linii fibroblastów skóry ludzkiej. Wykazano, że SiNPs, o wielkości 7 nm, 5–15 nm oraz 10–20 nm indukowały, zależną od wzrastającej dawki i czasu inkubacji, cytotoksyczność w komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu, a nieznacznie obniżały żywotność fibroblastów skóry ludzkiej. Wykorzystując metodę cytometrii przepływową potwierdzono indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii LBC3, a w komórkach linii



UNIwersytet Jagielloński COLLEGIUM MEDICUM

LN-18 nekrozę. SiNPs o wielkości 5–15 nm indukują wzrost reaktywnych form tlenu (RFT), obniżają potencjał błony mitochondrialnej oraz powodują pęcznienie i deformację błony mitochondrialnej w komórkach linii LBC3. Stwierdzono zależną od dawki i czasu nasiloną aktywność kaspazy-9 w komórkach linii LBC3. Wykazano wzrost ekspresji genów proapoptotycznych: Bim, Bax, Puma oraz Noxa. Uzyskane wyniki wskazują na wzrost stosunku LC3II/LC3I oraz nasiloną ekspresję genu Atg5 w testowanych komórkach. W oparciu o mikroskopową obserwację struktur autofagolizosomów stwierdzono wzrost liczby komórek z kwaśnymi organellami pęcherzykowatymi. Uzyskane wyniki wskazują, że SiNPs (5–15 nm), skutecznie hamują wzrost komórek glejaka wielopostaciowego mózgu na drodze indukcji apoptozy i autofagii.

W ramach kolejnych badań [H-4] mających na celu ocenę wpływu przeciwnowotworowego i ustalenie mechanizmu działania SiNPs (o wielkości 5–15 nm) w liniach komórkowych raka sutka różnych molekularnych podtypów (MDA-MB-231, estrogeniezależne, ER-; ZR-75-1, estrogenozależne, ER+) wykazano, że indukują one obniżenie żywotności komórek obu linii. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały na związek pomiędzy nasiloną produkcją RFT a obniżeniem poziomu grup tiolowych (-SH). Ponadto SiNPs spowodowały nasilenie peroksydacji lipidów (TBARS) i obniżenie stosunku glutationu zredukowanego do glutationu utlenionego (GSH/GSSG), które również pozytywnie korelowały ze wzrostem syntezy RFT przez komórki MDA-MB-231 oraz ZR-75-1. Stwierdzono również, że wstępne traktowanie komórek 5 mmol/l nacetylocysteiną redukowało stres oksydacyjny i obniżało cytotoksyczność wywołaną przez SiNPs. Z przeprowadzonych badań wynika ponadto, że wzmożona synteza RFT prowadziła do nasilenia stresu oksydacyjnego, który indukował cytotoksyczność oraz apoptozę w badanych komórkach. Wyniki sugerują, że SiNPs indukują apoptozę w komórkach raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1, co oceniono poprzez ekspresję aktywnej formy kaspazy-9 oraz kaspazy-3, potwierdzając ich aktywację.

Celem kolejnych badań była ocena wpływu rGO w warunkach *in vitro* na cytotoksyczność, zmiany morfologii, proliferację, stres oksydacyjny i apoptozę w liniach komórkowych raka sutka T-47D, MCF-7, ZR-75-1, MDA-MB-231 oraz Hs 578T [H-2]. Wykazano, że rGO powodował zależne od czasu i dawki nasilenie uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) do medium hodowlanego oraz wychwyt jodku propidyny (PI) przez komórki linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. Natomiast nie stwierdzono istotnego statystycznie wzrostu uwalniania LDH do medium oraz wychwyty PI przez komórki linii T-47D, MCF-7 oraz Hs 578T. Na podstawie testu proliferacji stwierdzono zależne od czasu i dawki zahamowanie proliferacji komórek MDA-MB-231 i ZR-75-1. Na podstawie uzyskanych danych Habilitant wskazuje, że rGO indukując silny stres oksydacyjny, indukujący wzrost RFT, mógł prowadzić do apoptozy komórek raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. Otrzymane wyniki wskazują, że rGO powodował nasilenie poziomu peroksydacji lipidów (TBARS) i obniżenie stosunku GSH/GSSG, które również pozytywnie korelowały z obniżeniem zawartości grup tiolowych oraz wzrostem wytwarzania RFT w komórkach linii



UNIwersytet Jagielloński COLLEGIUM MEDICUM

MDA-MB-231 oraz ZR-75-1. Podsumowując Autor stwierdza, że rGO wykazuje działanie przeciwnowotworowe, które może być wykorzystane podczas terapii raka sutka.

W dalszym etapie badań poszukiwano molekularnego punktu działania rGO na komórki raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1 [H-3]. Wykazano, że rGO powodował zależną od czasu i dawki redukcję żywotności komórek raka sutka obu linii komórkowych, podczas gdy fibroblasty skóry ludzkiej (CRL1474) wykazywały nieznaczne zmniejszenie żywotności. Z przeprowadzonych badań wynika, że rGO indukował apoptozę oraz obniżał potencjał błony mitochondrialnej w komórkach raka sutka, co wskazuje na indukcję apoptozy przez rGO na drodze mitochondrialnej. Analiza cyklu komórkowego wykazała istotnie podwyższony procent komórek raka sutka wchodzących w fazę S i subG1, świadczący o apoptozie. Stwierdzono zależny od czasu wzrost ekspresji P21 w obydwu liniach komórkowych i dodatkowo nasiloną ekspresję P-P53 w komórkach linii ZR-75-1, co wskazuje na zatrzymanie cyklu komórkowego. Ponadto, w pracy oceniono wpływ rGO na ekspresję białek markerowych autofagii (Atg5, P62 oraz LC3I/II) stwierdzając, że rGO nasilał poziom ekspresji Atg5 i LC3-II oraz obniżał poziom ekspresji białka P62 w komórkach MDA-MB-231 i ZR-75-1. Uzyskane wyniki wskazują na zależność pomiędzy wzrostem ekspresji LC3-II oraz białka Atg5. Podsumowując, Habilitant stwierdza, że rGO wydaje się mieć wielokierunkowe działanie cytostatyczne i cytotoksyczne w komórkach raka piersi, co czyni go obiecującym środkiem wartym dalszych badań.

Przedstawiony do oceny cykl prac, obejmujący prezentację mechanizmu cytotoksycznego działania opartego na indukcji stresu oksydacyjnego oraz aktywacji wewnątrzpochodnej drogi apoptozy i aktywacji autofagii, stanowi cenne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat potencjalnych oddziaływań SiNPs oraz rGO z komórkami nowotworowymi. Badania z zakresu onkologii doświadczalnej koncentrują się na optymalizacji nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na innowacyjne środki lecznicze. Przeprowadzone przez Habilitanta badania są nowatorskie, rzetelne, bardzo obszerne i starannie udokumentowane.

Podsumowując, po zapoznaniu się z osiągnięciem naukowym dr Rafała Krętowskiego stwierdzam, że doskonale wykorzystał on umiejętności naukowe zarówno w odniesieniu do prac eksperymentalnych, jak i analizy otrzymanych wyników. Uważam, że założony przez Habilitanta cel badań został w pełni zrealizowany. Przedstawione do recenzji osiągnięcie naukowe bez wątplenia stanowi znaczny wkład na drodze do poszukiwania nowych i skutecznych rozwiązań terapeutycznych mogących stanowić doskonałą alternatywę dotychczasowych terapii. W związku z powyższym, potwierdzam znaczny wkład Habilitanta w rozwój dyscypliny naukowej nauki farmaceutycznej.

Ocena dorobku naukowego i działalności badawczej

Aktywność naukowa dr Rafała Krętowskiego obejmuje okres od 2011r., w którym ukazała się pierwsza współautorska praca, do chwili obecnej. Na dotychczasowy dorobek naukowy składa się 28 artykułów opublikowanych w czasopiśmie z listy Journal Citation



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM

Reports (JCR), który oceniam jako znaczny. Według znajdującej się w dokumentacji analizy bibliometrycznej (załącznik nr 7, przygotowany przez Bibliotekę Główną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, na dzień 13.02.2023r.) sumaryczny współczynnik oddziaływania IF wszystkich prac wynosi 106,963, odpowiadająca mu punktacja MNiSW/MEiN 1796, liczba cytowań wg Web of Science Core Collection 424 (bez autocytowań 380), a h-index 13, co potwierdza wartość naukową dorobku Habilitanta.

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora dorobek naukowy Habilitanta obejmował 7 pełnotekstowych publikacji o łącznym IF = 11,718 i punktacją MEiN = 135 (opublikowanych m.in. w Molecular and Cellular Biochemistry, Cell Biology International czy Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals) oraz opis bibliograficzny pracy opublikowany w Farmaceutycznym Przeglądzie Naukowym (MEiN = 6). Wyniki badań były prezentowane podczas 17 krajowych zjazdów naukowych. Natomiast po uzyskaniu stopnia doktora dorobek Habilitanta uległ znacznemu powiększeniu i obejmuje 21 prac o łącznym IF = 95,245, co odpowiada 1655 pkt. MEiN. O aktywności Habilitanta świadczy także udział w konferencjach naukowych o zasięgu krajowym (18) i międzynarodowym (6).

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora Habilitant pełnił rolę kierownika badań finansowanych w ramach dotacji statutowych (4) oraz był współwykonawcą 10 projektów badawczych. Po uzyskaniu stopnia doktora Habilitant był współwykonawcą projektu Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM 9 pt.: „Wpływ kwasu tauroursodeoksycholowego (TUDCA) na redukcję stresu śródplazmatycznego w komórkach chondrocytów jako nowy potencjalny kierunek wspomagania funkcjonowania chrząstki stawowej” (Nr 2015/17/N/NZ7/01094). Pan Doktor uzyskał również finansowanie z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 2 na prowadzenie badań naukowych pt. „Zredukowany tlenek grafenu (rGO) jako czynnik indukujący hipoksję oraz modulator apoptozy w komórkach raka sutka inkubowanych w obecności inhibitora proteasomów” (Nr 2018/02/X/NZ3/00030). Otrzymał również finansowanie badań realizowanych w ramach dotacji statutowych (6; jako kierownik), a także brał udział (jako współwykonawca) w realizacji zakończonych (20) oraz bieżących (2) projektów badawczych.

Analizując ścieżkę zawodową dr Rafała Krętowskiego na podkreślenie zasługuje konsekwencja w doborze tematyki badawczej. Rezultaty jednych badań stanowią inspirację do podjęcia nowych wyzwań, natomiast umiejętność łączenia metod eksperymentalnych z teoretycznymi umożliwia Habilitantowi dokonanie adekwatnej oceny danych oraz wyciąganie odpowiednich wniosków. Potencjał publikacyjny Habilitanta wraz z uzyskanymi wynikami badań naukowych jednoznacznie potwierdzają ogromną determinację naukową, pracowitość, wysoką dojrzałość i dociekliwość badawczą, jak i umiejętność stawiania i rozwiązywania problemów natury naukowej.

Pozostała działalność naukowa dr n. med., Rafała Krętowskiego obejmuje m.in. *Ocenę wpływu stresu siateczki śródplazmatycznej na wybrane linie komórkowe*. W ramach badań oceniono syntezę i degradację kolagenu, mechanizm obniżonej apoptozy oraz starzenia w komórkach raka sutka linii MCF-7, podczas stresu siateczki śródplazmatycznej (ER), indukowanego niedoborem glukozy. Wykazano, że prowadził on do upośledzenia biosyntezy



UNIwersytet Jagielloński COLLEGIUM MEDICUM

kolagenu w komórkach raka sutka. Niedobór glukozy indukował syntezę białka opiekuńczego ORP150 w komórkach raka, które chroniło nowo syntetyzowany kolagen przed nadmierną degradacją. Wykazano, że w komórkach linii MCF-7 adaptujących się do stresu ER dochodziło do aktywacji procesów promujących proliferację. Natomiast w przeciwieństwie do komórek MCF-7, fibroblasty skóry ludzkiej ulegały starzeniu w warunkach niedoboru glukozy.

W ramach realizacji kolejnego zadania badawczego badano mechanizm apoptozy indukowanej przez selektywny inhibitor proteasomów, bortezomib, w komórkach raka jelita grubego linii DLD-1. Wykazano, że powodował on śmierć komórek raka jelita na drodze apoptozy i nekrozy, a mechanizm cytotoksycznego działania polegał na osłabieniu głównych dróg transdukcji sygnału związanych z hamowaniem ekspresji białka opiekuńczego GRP170 oraz obniżeniem ekspresji czynnika transkrypcyjnego: HIF-1 α i NF- κ B.

W kolejnych badaniach oceniano wpływ bortezomibu na apoptozę komórek raka sutka linii MDA-MB-231 oraz fibroblastów skóry ludzkiej linii CRL-1474. Stwierdzono silne proapoptotyczne działanie bortezomibu na komórki raka sutka, natomiast fibroblasty skóry ludzkiej nie ulegały apoptozie, ale wykazywały indukowany proces starzenia oraz silną ekspresję białka opiekuńczego ORP150 o działaniu antyapoptotycznym.

Rozregulowanie szlaku sygnałowego PI3K/AKT/mTOR powszechnie występuje w glejaku wielopostaciowym mózgu oraz stanowi cele manipulacji terapeutycznych. W ramach realizowanych prac badawczych nad inhibitorami mTOR stwierdzono, że apitolisib (GDC-0980) indukował zależną od czasu i dawki cytotoksyczność i apoptozę w komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu linii A-172. Otrzymane wyniki wskazują, że GDC-0980, jako chemioterapeutyk, może stać się kandydatem do dalszych badań w walce z glejakiem wielopostaciowym mózgu.

Kolejny nurt badań, *Ocena wpływu stresu oksydacyjnego na fibroblasty skóry ludzkiej*, dotyczył wpływu naturalnych związków tj. anetol, na metabolizm kolagenu oraz apoptozę fibroblastów skóry ludzkiej inkubowanych w obecności czynnika generującego stres oksydacyjny (H₂O₂). Ponadto analizowano starzenie replikacyjne oraz profil aktywności egzoglikozydaz, indukowanych stresem wywołanym przez tert-butyl w fibroblastach skóry ludzkiej. Stwierdzono, że preinkubacja fibroblastów z 0,5 μ M anetolem chroniła je przed zgubnymi skutkami stresu oksydacyjnego, a tym samym nasilała syntezę kolagenu oraz przeciwdziałała apoptozie. Zmiany na poziomie syntezy kolagenu, a także wbudowywanie radioaktywnej proliny do białek kolagenowych pozytywnie korelowały z ekspresją genu dla kolagenu typu I. Wykazano, że H₂O₂ nasilał aktywność MMP-2, który mógł skutkować zmniejszeniem wydzielania kolagenu przez fibroblasty do medium hodowlanego oraz MMP-9. We współpracy z Samodzielną Pracownią Kosmetologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku stwierdzono wzrost aktywności badanych egzoglikozydaz (z wyjątkiem β -glukuronidazy) w hodowli fibroblastów niepoddanych stresowi jak i tych z tert-butylem.

W ramach kolejnego kierunku badań dokonano *Oceny wpływu deacetylaz histonów na komórki glejaka wielopostaciowego mózgu*. Ocenie poddano wpływ deacetylaz histonów, fenylomaslanu (PBA) i belinostatu (Bel) na przeżywalność komórek glejaka wielopostaciowego mózgu. Stwierdzono, że komórki glejaka linii LN-18 były niewrażliwe



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM

na cytotoksyczne działanie PBA, podczas gdy w komórkach LN-229 hamował wzrost, proliferację oraz indukował apoptozę. PBA zwiększał ekspresję białka P21, podczas gdy poziom ekspresji P53 pozostał niezmienny, obniżał ekspresję genów antyapoptotycznych Bcl-2, Bcl-XL, jednak bez większego wpływu na ekspresję proapoptotycznych genów Bax i Bim. Wykazano, że w komórkach LN-229, Bel indukował apoptozę oraz nasilał ekspresję proapoptotycznych genów Puma, Bim, Chop i p21. Równocześnie wykazano, że komórki LN-229 traktowane Bel wykazywały nasiloną ekspresję białek opiekuńczych z rodziny GRP78 i GRP94. W związku z nasiloną ekspresją p21 w obu liniach komórkowych LN-18 i LN-229 (w obecności Bel) wykazano zmniejszenie liczby komórek w fazie S cyklu komórkowego.

W ramach realizowanych projektów naukowych pt. *Ocena wpływu nanocząstek krzemionki na komórki nowotworowe*, zmierzających do wyjaśnienia mechanizmu działania SiNPs, jednego z innowacyjnych kierunków badań w obszarze diagnostyki, obrazowania oraz przyszłościowej terapii przeciwnowotworowej, stwierdzono, że działają one cytotoksycznie na glejaka wielopostaciowego mózgu na drodze indukcji apoptozy i nekrozy. Aktywacja apoptozy w badanych komórkach była związana z generowaniem RFT. Wykazano nasiloną ekspresję genów enzymów antyoksydacyjnych oraz zaburzenie potencjału błony mitochondrialnej i obniżenie produkcji ATP w komórkach linii LN-229, a także nasilenie stresu siateczki śródplazmatycznej oraz odpowiedź prozapalną na SiNPs. Stwierdzono, że SiNPs mogą wyzwalać różne efekty komórkowe/molekularne zależne od warunków ekspozycji, wielkości i dawki, a także typu komórek glejaka wielopostaciowego mózgu.

W ramach badań nad *Związkami naturalnymi o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym* wykazano cytotoksyczne działania związków pochodzenia naturalnego tj. kwercetyna oraz kwas p-kumarowy na komórki glejaka wielopostaciowego mózgu poprzez indukcję stresu oksydacyjnego i apoptozy. Wykazano, że oba związki wpływały na zmiany przepuszczalności oraz ładunku powierzchniowego błony komórkowej glejaka.

Badania dotyczące *Związków syntetycznych o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym* prowadzono z wykorzystaniem metronidazolu. Wykazano, że metronidazol obniżał żywotność komórek raka jelita grubego linii DLD-1 oraz indukował apoptozę w badanych komórkach.

Wymienione obszary badawcze Habilitanta świadczą o jego wszechstronności i dużej fachowości w projektowaniu badań. Jest on doświadczonym praktykiem, który realizuje trudne założenia badawcze na wysokim poziomie.

Realizując swoje cele badawcze, obejmujące zasadniczo ustalenie zmian molekularnych w komórkach nowotworowych wywołanych różnymi nanocząstkami, Habilitant ściśle współpracuje z Zakładem Polimerów i Syntezy Organicznej Uniwersytetu w Białymstoku. Efektem współpracy jest nie tylko praca opublikowana w *Journal of Biomedical Nanotechnology* (2017r.), ale również uzyskanie patentu, którym objęto procedurę otrzymania multifunkcyjnego nanosystemu z rdzeniem z materiału magnetycznego i powłoką z polimeru umożliwiającą terapię celowaną lub detekcję zmienionych nowotworowo komórek (Nr patentu 232982, *Sposób otrzymywania i zastosowania multifunkcyjnego nanosystemu*).



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM

We współpracy z Instytutem Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej Habilitant realizował badania obejmujące otrzymywanie nowych pochodnych 1,3,5-triazyny o potencjalnym przeciwnowotworowym mechanizmie działania (Investigational New Drugs, 2019r.). W ramach szeroko zakrojonych badań prowadzonych we współpracy z Katedrą Chemii, Biologii i Biotechnologii Politechniki Białostockiej, oceniano parametry stresu oksydacyjnego w komórkach glejaka wielopostaciowego oraz raka sutka (H-2 i H-4), wpływ nowych pochodnych kompleksów doksorubicyny z metalami na apoptozę, cykl komórkowy, żywotność, proliferację i cytotoksyczność w komórkach raka sutka (Molecules, 2017r.), doksorubicyny i kwasu cykoriowego na stres oksydacyjny w fibroblastach skóry ludzkiej (Nutrients, 2018r.), kwasu traumatynowego na parametry stresu oksydacyjnego oraz apoptozę w komórkach raka sutka (Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2019r.) oraz kwasu cykoriowego na eliminację stymulującego działania pestycydów na komórki czerniaka (Environmental Toxicology and Pharmacology, 2020r.).

Niestety Habilitant nie wykazał żadnej współpracy międzynarodowej.

O uznaniu osiągnięć Habilitanta świadczą nagrody przyznane za działalność naukową. Pan Doktor został uhonorowany Zespołową Nagrodą Naukową I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w 2012r., Nagrodą Naukową III stopnia (2013 i 2015r.) oraz Nagrodą Naukową I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (2014, 2017, 2018, 2019, 2021r.). Ponadto w 2019r. otrzymał Nagrodę Naukową III stopnia przyznaną przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za uzyskanie finansowania projektu pt. „Zredukowany tlenek grafenu (rGO) jako czynnik indukujący hipoksję oraz modulator apoptozy w komórkach raka sutka inkubowanych w obecności inhibitora proteasomów”.

W roku 2012 otrzymał stypendium w ramach Europejskiego Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki „Studiuje, badam, komercjalizuję - program wsparcia doktorantów UMB”, współfinansowanego przez Unię Europejską, w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (1.10.2012r. do 30.09.2013r.).

Habilitant ciągle podnosi swoje kompetencje uczestnicząc w licznych kursach i szkoleniach naukowych (20) tj.: szkolenie z zakresu innowacyjnych rozwiązań do hodowli komórek ssaczych szkolenie w zakresie nowoczesnych technik laboratoryjnych czy szkolenie w zakresie hodowli guzów nowotworowych – badania na modelu *in vivo*.

Podsumowując całość dorobku naukowego Habilitanta z pełnym przekonaniem można stwierdzić, że został on znacznie powiększony po uzyskaniu stopnia doktora, nie tylko pod względem liczby prac, ale także ich wartości naukowej, a doświadczenie i umiejętności nabyte w ramach pracy w krajowych zespołach stanowią gwarancję dobrego przygotowania do dalszej, samodzielnej pracy naukowej.

Działalność dydaktyczna i organizacyjna

Dr Rafał Krętowski legitymuje się doświadczeniem jako ceniony dydaktyk, a przedstawiony zbiór dokumentów pozwala wysoko ocenić zarówno doświadczenie jak i osiągnięcia dydaktyczne. Habilitant prowadzi ćwiczenia z Biochemii dla studentów III roku kierunku



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM

Farmacja Apteczna, II roku kierunku Analityka Medyczna i Kosmetologia oraz I roku kierunku Dietetyka. Opracował program i prowadzi fakultet „Techniki zakładania i prowadzenia hodowli komórkowych” dla V roku Analityki Medycznej, oraz seminaria pt. „Budowa i organizacja macierzy pozakomórkowej: kolagen” i „Budowa, transport i transdukcja sygnału przez błony biologiczne” dla studentów II roku kierunku Kosmetologia. Ponadto prowadzi zajęcia praktyczne „Cytometria przepływowa – możliwości zastosowania w badaniach biomedycznych i farmaceutycznych” realizowane w ramach Szkoły Doktorskiej UMB dla studentów III roku. Pełnił funkcję promotora 5 prac magisterskich, a także rolę opiekuna naukowego doktorantki II roku Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Habilitant uczestniczył w wydarzeniach popularyzujących naukę na rzecz środowiska naukowego. W 2017 i 2018r. prowadził warsztaty pt. „Metody hodowli i immunofluorescencyjnej analizy komórek nowotworowych” w ramach XV i XVI Podlaskiego Festiwalu Nauki i Sztuki.

W latach 2010–2017 Pan Doktor był członkiem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej. Ponadto, wraz z prof. dr. hab. Marzanną Cechowską-Pasko brał udział w organizacji Pracowni Hodowli Komórkowych i Mikroskopii Fluorescencyjnej.

Wyrazem uznania dla bogatego doświadczenia i wypracowanego warsztatu naukowego dr Rafała Krętowskiego jest obecność w gronie Recenzentów czasopism naukowych. Habilitant pełnił funkcję recenzenta prac (8) nadesłanych do renomowanych czasopism tj. Antioxidants, Biomolecules, Cancers, Cells czy International Journal of Nanomedicine.

Jest także członkiem Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki. Niestety nie jest członkiem żadnej międzynarodowej organizacji ani towarzystwa naukowego.

Wniosek końcowy

Całokształt aktywności dr n. med. Rafała Krętowskiego udokumentowany znaczącym dorobkiem publikacyjnym wraz z innymi osiągnięciami, tj. umiejętność samodzielnego formułowania koncepcji badań, racjonalnego ich planowania i realizowania poprzez kompetentne rozwiązywanie ważnych i aktualnych problemów naukowych oraz zdolność do współpracy i pozyskiwania środków na badania, wskazuje na przygotowanie do pełnienia roli samodzielnego pracownika naukowego.

W mojej opinii dotychczasowa aktywność naukowa dr n. med. Rafała Krętowskiego, zwłaszcza po uzyskaniu stopnia doktora, oraz przedstawione osiągnięcie spełniają wszystkie wymogi formalne określone w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668 późn. zm.). Biorąc pod uwagę przedłożone osiągnięcie naukowe, a także całokształt działalności Habilitanta przedstawiam pozytywną opinię wniosku Pana dr n. med. Rafała Krętowskiego o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.


Katedra Chemii Nieorganicznej
i Analitycznej
Dr hab. n. farm. Monika Dąbrowska
dr hab. Monika Dąbrowska
adiunkt