



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej

Dr hab. inż. Marta Kepinska, prof. UMW

Wrocław, 10.01.2024 r.

OCENA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

pt. „Efekty działania nanocząstek krzemionki i zredukowanego tlenku grafenu na
wybrane komórki nowotworowe w warunkach *in vitro*”

na podstawie jednotematycznego cyklu publikacji oraz aktywności naukowej
i dorobku dydaktycznego oraz organizacyjnego

w postępowaniu habilitacyjnym dra n. med. Rafała Krętowskiego
z Zakładu Biochemii Farmaceutycznej

Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Dr Rafał Krętowski jest absolwentem Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, gdzie w 2008 roku ukończył studia magisterskie na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, uzyskując tytuł zawodowy magistra analityki medycznej. W latach 2008 – 2016 zatrudniony był na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. W 2014 roku na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Regulacyjna rola białka opiekuńczego ORP150 w metabolizmie kolagenu w komórkach raka sutka linii MCF-7”, przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marzanny Cechowskiej-Pasko, uzyskał stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna. Od lipca 2016 r. do chwili obecnej zatrudniony jest w tej samej jednostce na stanowisku adiunkta naukowo-dydaktycznego.

Głównym obszarem zainteresowań naukowych Habilitanta jest biologia nowotworów. Dr Rafał Krętowski skupia się na badaniach nad mechanizmami, które sprzyjają eliminacji komórek nowotworowych w warunkach stresu oksydacyjnego i stresu siateczki śródplazmatycznej. Jego prace przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat

adaptacyjnych zdolności komórek nowotworowych w odpowiedzi na niekorzystne warunki mikrośrodowiskowe. Dodatkowo, przeprowadzone eksperymenty w zakresie wykorzystania nanocząstek, takich jak nanocząstki krzemu (SiNPs) i zredukowany tlenek grafenu (rGO), otwierają nowe perspektywy terapeutyczne w leczeniu nowotworów.

Ocena osiągnięcia naukowego w postaci jednotematycznego cyklu publikacji

Osiągnięcie naukowe przedstawione do oceny w procesie o nadanie doktorowi Rafałowi Krętowskiemu stopnia doktora habilitowanego stanowi cykl powiązanych tematycznie 4 publikacji eksperymentalnych [H-1–H-4], opublikowanych w latach 2017–2023, których syntetyczne przedstawienie uzupełniono wstępem z nakreśleniem potrzeby realizacji badań. Osiągnięcie naukowe zatytułowane „*Efekty działania nanocząstek krzemionki i zredukowanego tlenku grafenu na wybrane komórki nowotworowe w warunkach in vitro*” stanowi spójną koncepcję badań dotyczących analizy cytotoksyczności SiNPs i rGO na wybranych liniach komórek nowotworowych w porównaniu do prawidłowej linii fibroblastów oraz wyjaśnienia efektów działania tych nanocząstek (NPs) w analizowanych liniach komórkowych, determinujących obserwowany efekt cytotoksyczny.

Prace podlegające ocenie powstały przy wiodącym udziale Habilitanta w zakresie powstania koncepcji, metodyki, części eksperymentalnej oraz przygotowania manuskryptu, co zgodnie potwierdzają w oświadczeniach pozostali współautorzy. Istotne jest, że we wszystkich 4 pracach dr Rafał Krętowski jest pierwszym autorem, pełniącym także funkcję autora korespondencyjnego. Przedstawione w cyklu prace zostały opublikowane w renomowanych, recenzowanych czasopismach, znajdujących się na liście *Journal Citation Reports* (JCR) o znacznym współczynniku wpływu - indywidualnym (IF 3,504 – 6,208) oraz sumarycznym (IF 22,128).

Cykl rozpoczyna praca H1 (*Nanomaterials*: 2017: 7, 8, E230, 22), w której przedstawione zostały wyniki prac eksperymentalnych Habilitanta. Wykazano w niej, że SiNPs o średnicy 7 nm, 5–15 nm i 10–20 nm indukują cytotoksyczność zależną od czasu i dawki w liniach komórkowych glejaka LBC3 i LN-18. W komórkach fibroblastów skóry traktowanych nanocząstkami krzemu w przeciwieństwie do komórek glejaka, zaobserwowano jedynie słabe zmniejszenie żywotności. Ponadto w komórkach LBC3 potraktowanych SiNPs 5–15 nm zauważono indukcję apoptozy i nekrozy, podczas gdy w komórkach LN-18 tylko nekrozę. Stwierdzono również, że SiNPs o średnicy 5–15 nm powodują stres oksydacyjny, utratę potencjału błony mitochondrialnej i zmiany w

ultrastrukturze mitochondriów w komórkach LBC3. Ilościowe wyniki PCR w czasie rzeczywistym wykazały, że w komórkach LBC3 poziomy mRNA genów proapoptotycznych *Bim*, *Bax*, *Puma* i *Noxa* były znacznie podwyższone. Zaobserwowano również wzrost aktywności kaspazy-9 w tych komórkach. Ponadto indukcja autofagii przez SiNPs została wykazana w komórkach LBC3, co wykazano wzrostem stosunku LC3-II/LC3-I, oraz wzrostem ekspresji genu *Atg5*. Wykazano również wzrost liczby komórek z kwaśnymi organellami pęcherzykowatymi (AVO-dodatnich).

Badania nad działaniem SiNPs kontynuowano w następnej pracy cyklu habilitacyjnego oznaczonej jako H4 (*International Journal of Molecular Sciences*: 2023: 24, 3, 14 pp). Podjęte badania dotyczyły oceny efektu przeciwnowotworowego i mechanizmu działania SiNPs wielkości 5–15 nm tym razem w liniach komórkowych raka piersi, który jest nowotworem najczęściej diagnozowanym u kobiet. Badania wykonano na liniach MDA-MB-231 i ZR-75-1 przy użyciu testu MTT oraz cytometrii przepływowej. Wykazano, że SiNPs o średnicy 5–15 nm indukowały zależną od dawki cytotoksyczność. Proces apoptozy związany był ze spadkiem potencjału błony mitochondrialnej i wzrostem aktywności kaspazy-3 i 9. Na podstawie uzyskanych wyników wskazano, że SiNPs 5–15 nm są zdolne do indukowania mitochondrialnego szlaku apoptozy. Analizowane NPs powodują również wzrost stresu oksydacyjnego (spadek stosunku GSH/GSSG oraz wzrost stężenia TBARS) w obu analizowanych liniach komórkowych raka piersi. Przedstawione badania wyjaśniają możliwe mechanizmy działania tych NPs w komórkach raka piersi, co zostało dodatkowo przedstawione w pracy na schemacie podsumowującym.

W pracach H2 i H3 Habilitant zawarł wyniki badań dotyczących rGO jako potencjalnego leku ze względu na możliwość użycia go w terapii celowanej oraz jego łatwą funkcjonalizację. rGO jest szeroko stosowany w wielu dziedzinach, w tym w biomedycynie, ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne. W artykule H2 (*International Journal of Molecular Sciences*: 2021: 22, 22, 17 pp) opisano wyniki badań nad rGO prowadzonych na modelach komórkowych raka piersi. Wskazano, że rGO indukował cytotoksyczność zależnie od czasu i dawki w komórkach MDA-MB-231 i ZR-75-1, ale nie w liniach komórkowych T-47D, MCF-7, Hs 578T. W liniach MDA-MB-231 i ZR-75-1 traktowanych rGO, zaobserwowano zwiększoną indukcję apoptozy i nekrozy. Ponadto stwierdzono, że rGO powoduje stres oksydacyjny (wzrost stężenia TBARS oraz spadek stosunku GSH/GSSG), zmniejszoną proliferację i indukuje zmiany strukturalne w komórkach. Badania te dostarczają nowego wglądu w procesy stresu oksydacyjnego i

apoptozy w komórkach raka piersi.

Rozwinięcie zagadnienia podjętego w pracy H2 przedstawiono w artykule H3 cyklu, również opublikowanym w *International Journal of Molecular Sciences* (2022: 23, 16, 20 pp), którego celem było zbadanie molekularnego punktu działania rGO na komórki raka piersi. Badania wykonano na liniach komórkowych MDA-MB-231 i ZR-75-1 testem MTT, cytometrią przepływową i metodą Western blot. Inkubacja komórek z rGO spowodowała wiele efektów, w tym stymulację autofagii, zatrzymanie cyklu komórkowego jak również apoptozę komórek nowotworowych. rGO miał natomiast minimalny wpływ na ludzkie fibroblasty. Wzrost ilości białka proapoptotycznego BAX; spadek ilości białek antyapoptotycznych BCL-2, BCL-xL i P65 wyraźnie wskazały, że rGO indukowało apoptozę w liniach komórkowych MDA-MB-231 i ZR-75-1. Apoptozie w komórkach nowotworowych towarzyszył zmniejszony potencjał błony mitochondrialnej, rozregulowane stężenie białek mitochondrialnych oraz aktywacja kaspazy 9 i kaspazy 3, co sugeruje, że rGO indukowało apoptozę głównie poprzez szlak wewnętrzny. Analiza stężenia białka LC3 wykazała, że rGO powoduje także autofagię w komórkach raka piersi. Ponadto zastosowanie rGO powodowało zatrzymanie cyklu komórkowego, któremu towarzyszyła deregulacja stężenia p21. Ponadto wykazano, że N-acetylocysteina będąca inhibitorem ROS zmniejsza cytotoksyczne działanie rGO w komórkach MDA-MB-231 i ZR-75-1.

Dopełniając opisy z przedłożonych wyników, we wszystkich pracach włączonych do cyklu, Habilitant zaproponował schematy podsumowujące obserwowane procesy dotyczące „Wpływu SiNPs na procesy apoptozy, autofagii i ich sugerowany mechanizm w komórki glejaka LBC3 oraz wpływ SiNPs wielkości 5–15 nm na cytotoksyczność, apoptozę i stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych piersi MDA-MB-231 i ZR-75-1. Zaproponował również dwa schematy podsumowujące działanie rGO, czyli wpływ rGO na cytotoksyczność, stres oksydacyjny, apoptozę autofagię, i cykl komórkowy komórek raka piersi.

W badaniach wykorzystano techniki analizy nanocząstek, prowadzenia hodowli komórkowej, cytometrii przepływowej, metody mikroskopii fluorescencyjnej i elektronowej, oraz techniki molekularne dopełniające warsztat badawczy.

Podjęte badania świadczą o dojrzałości naukowej Habilitanta, który nakreślił możliwości praktycznego zastosowania swoich osiągnięć w terapii. Zaprezentowany cykl badań stanowi rozszerzenie obecnej wiedzy dotyczącej interakcji SiNPs oraz rGO z komórkami nowotworowymi. Badania te rzucają światło na potencjalny mechanizm

cytotoksycznego działania tych nanocząstek, poprzez indukcję stresu oksydacyjnego, aktywację wewnątrzpochodnej drogi apoptozy i stymulację autofagii. Wyniki uzyskane podczas tych badań nie tylko poszerzają nasze zrozumienie, ale także wprowadzają nowatorski element. Innowacyjność tych badań obejmuje poszukiwanie i zidentyfikowanie molekularnych punktów uchwytu oraz mechanizmów działania SiNPs i rGO na komórki nowotworowe, obserwacje modyfikacji molekularnych w komórkach nowotworowych pod wpływem oddziaływania badanych nanostruktur, co pozytywnie koreluje z hamowaniem ich proliferacji, wykazanie, że SiNPs oraz rGO mogą stanowić obiecującą alternatywę jako potencjalne nanochemioterapeutyki, selektywnie eliminujące komórki nowotworowe, które dotychczas wykazywały oporność na leki, przedstawienie, że SiNPs oraz rGO mogą efektywnie indukować apoptozę i autofagię w komórkach nowotworowych różnych molekularnych podtypów.

W podsumowaniu, można stwierdzić, że wskazane osiągnięcie stanowi znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych, szczególnie poprzez rozszerzenie wiedzy w obszarze mechanizmu działania SiNPs oraz rGO prowadzącego do śmierci komórek nowotworowych dostarczając nowych związków o potencjalnym działaniu terapeutycznym w walce z komórkami raka.

Ocena dorobku i aktywności naukowej

Całokształt dorobku naukowego Habilitanta od początku pracy naukowej obejmuje 28 prac oryginalnych z czego 27 prac opublikowanych zostało w czasopiśmie z IF o sumarycznym IF= 106,963 (z czego IF=11,718 przez uzyskaniem stopnia doktora, IF=95,245 po uzyskaniu stopnia doktora) i łącznej wartości punktów ministerialnych 1796. W 12 pracach (43%) Habilitant jest pierwszym lub ostatnim autorem potwierdzając aktywną rolę w ich tworzeniu, co wskazuje także na jego intensywny udział w zakresie posiadanych kompetencji uzupełniających badania realizowane przez innych naukowców (w ramach współpracy). Liczba cytowań dla zgromadzonego dorobku na dzień 13 luty 2023 r. wynosiła 424 (380 bez autocytowań), index Hirscha wg WoS Core Collection h-index = 13. Dr Rafał Krętowski jest współautorem 41 streszczeń konferencyjnych oraz jednego przyznanego patentu krajowego, co wskazuje na znaczenie użytkowe prowadzonych badań. Wśród doniesień konferencyjnych, Habilitant wymienił jedno wystąpienie ustne, jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora. Wskazane byłoby rozwinięcie tej części działalności naukowej i prezentowanie wyników w formie krótkich wystąpień ustnych lub wykładów. Osiągnięcia naukowe jako ważne i twórcze były

wielokrotnie nagradzane przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku nagrodami indywidualnymi i zespołowymi w okresie 2012 – 2021. Habilitant jest również stypendystą Europejskiego Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki: „Studiuję, badam, komercjalizuję - program wsparcia doktorantów UMB”.

Habilitant od początku swojej pracy naukowej zajmuje się biologią nowotworów, w tym wpływem stresu siateczki śródplazmatycznej na linie raka gruczołu sutkowego – MCF-7, MDA-MB-231, komórki raka jelita grubego DLD-1 czy fibroblasty skóry ludzkiej (CRL-1474) oraz zmianami zachodzącymi w komórkach nowotworowych pod wpływem działania nanocząstek. Dr Rafał Krętowski zajmował się również analizą wpływu stresu oksydacyjnego na fibroblasty skóry ludzkiej, a także badał potencjał przeciwnowotworowy związków naturalnych - kwercytiny, pochodnej kwasu cynamonowego oraz kwasu p-kumarowego.

Badania realizowane były w oparciu o warsztat wypracowany z Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, stworzonej tam Pracowni Hodowli Komórkowych i Mikroskopii Fluorescencyjnej, ale również o współpracę z zewnętrznymi jednostkami w kraju, w tym z Uniwersytetem w Białymstoku, Politechniką Białostocką czy Politechniką Łódzką.

Habilitant brał udział w realizacji dwóch projektów finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki: w projekcie Preludium 9 jako wykonawca oraz w projekcie Miniatura 2 jako kierownik. Był również wykonawcą i kierownikiem projektów finansowanych w ramach dotacji statutowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

W trakcie swojej kariery dr Rafał Krętowski odbył 2 wyjazdy szkoleniowe związane z tematyką realizowanych badań, jeden w Katedrze i Zakładzie Chemii i Analizy Leków Wydziału Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego jednostek (5 dni w 2023 roku) oraz w Centrum Innowacji Badań i Nauki w Lublinie (12 dni w 2022 roku). Habilitant nie odbył długoterminowych staży (minimum 3 miesiące) oraz nie wykazał się aktywnością szkoleniową w jednostkach zagranicznych.

Pomimo braku długoterminowych staży, dr Krętowski konsekwentnie rozwijał swój warsztat badawczy biorąc udział w licznych szkoleniach, zdobywając konieczne umiejętności praktyczne z zakresu hodowli komórek, wykorzystania cytometrii przepływowej w badaniach komórkowych, z zakresu technik mikroskopowych i mikrofotografii w mikroskopach świetlnych, mikroskopii fluorescencyjnej i hybrydyzacji in situ, skaningowego mikroskopu elektronowego, Western Blotting, techniki Real-Time PCR w oznaczeniach jakościowych i ilościowych oraz narzędzi analizy biostatystycznej.

Podjęta tematyka badań jest bardzo pożądana z uwagi na problem zdrowotny dotyczący rosnącej grupy społeczeństwa. Każdego roku szacuje się około 10 mln nowych przypadków zachorowań na nowotwory, które aktualnie stanowią drugą przyczynę zgonów u ludzi. Analiza dorobku naukowego Habilitanta wskazuje na jego stały i konsekwentny rozwój naukowy przez wzbogacanie warsztatu eksperymentalnego, nawiązywanie licznych współprac, samodzielne podejmowanie tematyki i realizacji zadań badawczych w zakresie własnych kompetencji i we współpracy z innymi grupami naukowymi. Efekty prowadzonych badań znajdują odzwierciedlenie w publikacjach w recenzowanych czasopismach z listy JCR, gdzie w wielu z nich udział Habilitanta jest wiodący w zakresie koncepcyjnym, wykonawczym i edytorskim.

Ocena dorobku dydaktycznego i organizacyjnego

Habilitant uczestniczył w pracy dydaktycznej prowadząc od 2008 roku szereg zajęć, w tym ćwiczenia z Biochemii dla studentów III roku kierunku Farmacja Apteczna, II roku kierunku Analityka Medyczna, II roku kierunku Kosmetologia oraz I roku kierunku Dietetyka dla studentów Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Dr Rafał Krętowski opracował program zajęć fakultatywnych dla studentów V roku Analityki Medycznej pt.: „Techniki zakładania i prowadzenia hodowli komórkowych” oraz seminariów dla studentów II roku kierunku Kosmetologia pt.: „Budowa i organizacja macierzy pozakomórkowej: kolagen”, jak i „Budowa, transport i transdukcja sygnału przez błony biologiczne”. Prowadzi również zajęcia dla studentów III roku Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pt.: „Cytometria przepływowa - możliwości zastosowania w badaniach biomedycznych i farmaceutycznych”.

W trakcie swojej kariery akademickiej był promotorem 5 prac magisterskich doświadczalnych. Sprawuje opiekę jako promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim mgr Wiktorii Piskorz (III rok Szkoły Doktorskiej Uniwersytet Medyczny w Białymstoku). W latach 2017 i 2018 uczestniczył w prowadzeniu warsztatów w ramach XV i XVI Podlaskiego Festiwalu Nauki i Sztuki, pt. „Metody hodowli i immunofluorescencyjnej analizy komórek nowotworowych” Przygotował także recenzje dla czasopism o zasięgu międzynarodowym dla 8 czasopism.

Habilitant angażował się w działalnością organizacyjną. W latach 2010-2017, brał udział w pracach Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Uczestniczył również w organizacji pracowni Hodowli Komórkowych i Mikroskopii Fluorescencyjnej co było istotne dla przygotowania warsztatu badawczego

wykorzystywanego w większości badań prowadzonych przez dr Krętkowskiego.

W załączniku nr 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego (str 4, 7, 8, 10-13, 15, 18) pojawia się sformułowanie „...a uzyskaniem stopnia doktora habilitowanego” powinno być zastąpione „złożeniem wniosku o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego” ponieważ złożenie wniosku nie jest równoznaczne z uzyskaniem stopnia.

Część załącznika nr 4 dotycząca „Współpracy z otoczeniem społecznym i gospodarczym” budzi pewne wątpliwości. „Wykaz dorobku technologicznego” powinien zawierać opracowane przez wnioskodawcę techniki, a nie nabyte umiejętności. Natomiast w części „Współpraca z sektorem gospodarczym” należałoby wskazać rezultaty wykonanych prac badawczo-rozwojowych.

Podsumowanie

Podsumowując ocenę prac dra Rafała Krętkowskiego, będących podstawą recenzowanego osiągnięcia naukowego warto podkreślić, iż mimo drobnych niedociągnięć wniosku oraz sugerowanych obszarów aktywności Habilitanta wartych rozwinięcia, uzyskane przez niego wyniki stanowią solidny grunt do dalszych badań. Otrzymane rezultaty dostarczają nowej wiedzy w obszarze leczenia nowotworów i mogą znaleźć zastosowanie praktyczne do opracowania innowacyjnych produktów terapeutycznych.

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl interesujących i ważnych prac z zakresu mechanizmu działania nanocząstek na komórki nowotworowe, celów terapeutycznych i farmaceutyków do zastosowania w terapii celowanej oraz stanowi znaczny wkład Habilitanta w rozwój dyscypliny nauki farmaceutyczne. Zauważalny jest rozwój naukowy Habilitanta poprzez doskonalenie własnego warsztatu badawczego, nawiązywanie współprac, wzbogacanie metod, redagowanie prac, co zdecydowanie przyczynia się do uzyskania samodzielności naukowej.

Wnioski końcowe

Oceniając pracę pod względem formalnym stawiam niniejszym wniosek końcowy, że dr Rafał Krętkowski pełni wiodącą, rolę w wykonaniu opublikowanych prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego. Na podstawie całokształtu działalności naukowej Habilitanta, realizowanej w więcej niż jednej instytucji naukowej, prezentującej

duże zaangażowanie w proces naukowy oraz dydaktyczny stwierdzam, że przedstawione do oceny osiągnięcie i dorobek naukowy Habilitanta spełniają wymagania według ustalonych kryteriów ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.). Niniejszym przedstawiam Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o nadanie Panu doktorowi Rafałowi Krętowskiemu stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

dr hab. Marta Kepinska prof. UMW

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII FARMACEUTYCZNEJ
kierownik
kepinska
dr hab. inż. Marta Kepinska, profesor uczelni
(1)