Łódź, dnia 05.06.2022 r.

WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA
Uniwersytet Łódzki

Dr hab. Anna Krześlak, prof. UŁ

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Danuty Kowalczyk-Pachel
pt. „Wpływ kokainy na metabolizm endogennych związków siarki u szczurów"

Ocena formalna

Pani mgr Danuta Kowalczyk-Pachel swoją rozprawę doktorską przedstawiła w formie zbioru trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Rozprawa doktorska została opatrzona wstępem teoretycznym, opisem celu, materiału i metod badawczych oraz omówieniem wyników poszczególnych prac wchodzących w skład zbioru. Autorka przygotowała także podsumowanie, wykaz cytowanej literatury oraz streszczenia (w języku polskim i języku angielskim). Dołączyła również odręcznie podpisane oświadczenia współautorów prac składających się na ocenianą rozprawę doktorską. Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w latach 2013 – 2021 w czasopismach z listy Journal Citation Reports. W skład rozprawy wchodzą następujące prace:

1. **Kowalczyk-Pachel D**, Chwatko G, Iciek M, Czyżyk J, Filip M, Włodek L, Lorenc-Koci E. The effects of cocaine on different redox forms of cysteine and homocysteine, and on labile, reduced sulfur in the rat plasma following active versus passive drug injections. Neurotox Res. 2013 Oct;24(3):377-92. doi: 10.1007/s12640-013-9403-6.

2. **Kowalczyk-Pachel D**, Iciek M, Wydra K, Nowak E, Górny M, Filip M, Włodek L, Lorenc-Koci E. Cysteine Metabolism and Oxidative Processes in the Rat Liver and Kidney after Acute and Repeated Cocaine Treatment. PLoS One. 2016 Jan 25;11(1):e0147238. doi: 10.1371/journal.pone.0147238.

3. **Kowalczyk-Pachel D**, Iciek M, Bilska-Wilkosz A, Górny M, Jastrzębska J, Kamińska K, Dudzik P, Filip M, Lorenc-Koci E. Evaluation of Cysteine Metabolism in the Rat Liver and Kidney

tel.: 042-635-43-35, fax: 042-635-44-84,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: anna.krzeslak@biol.uni.lodz.pl
www.cytobiochemia.uni.lodz.pl

Following Intravenous Cocaine Administration and Abstinence. Antioxidants (Basel). 2021 Jan 8;10(1):74. doi: 10.3390/antiox10010074.

Jak podaje Doktorantka sumaryczny Impact factor czasopism, w których opublikowane zostały prace wynosi 12,269. Kandydatka podaje również, że łączna liczba punktów MNiSW wynosi 160. Trzeba jednak zaznaczyć, że dwie prace zostały opublikowane w okresie, kiedy obowiązywała inna punktacja niż obecnie. Dlatego po ujednoliceniu ogólna punktacja według mnie wynosi 270 pkt. Liczba cytowań prac na dzień 05.06.2022 wynosi wg bazy Web of Science – 24 (bez autocytowań).

Wszystkie artykuły stanowiące rozprawę doktorską są pracami wieloautorskimi (od 7 do 9 autorów), a Doktorantka w każdej z nich jest pierwszym autorem. Wkład Doktorantki w powstanie omawianych prac wyrażony procentowym udziałem wynosi odpowiednio: 40%, 50% i 40%. Analiza załączonych oświadczeń Doktoranki i współautorów sugeruje, że Pani mgr Kowalczyk-Pachel uczestniczyła w pobieraniu krwi i tkanek zwierzęcych, przygotowaniu próbek osocza do analizy HPLC, wykonaniu oznaczeń biochemicznych, opracowaniu wyników, przygotowaniu rysunków do manuskryptów, pisaniu i poprawianiu manuskryptów. Stwierdzam, że pod względem formalnym praca spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim.

Ocena merytoryczna

Uzależnienie od narkotyków jest przewlekłą chorobą, która wywiera szkodliwy efekt nie tylko na osobę uzależnioną, ale ma również poważne konsekwencje dla całego społeczeństwa. Niestety pomimo szeroko zakrojonych badań oraz postępu w zrozumieniu czynników przyczyniających się do uzależnienia, proponowane terapie leczenia są nadal ograniczone i mało efektywne. Dlatego badanie mechanizmów stojących za uzależnieniem i niekorzystnym wpływem narkotyków na organizm jest bardzo ważne szczególnie z punktu widzenia możliwości wykorzystania tej wiedzy na potrzeby tworzenia nowych form terapii. Kokaina jest substancją, której właściwości sprawiają, że stosunkowo duży odsetek osób ją przyjmujących się uzależnia, a jednocześnie terapia uzależnień od kokainy jest mniej skuteczna w porównaniu z terapiami uzależnienia od wielu innych substancji psychoaktywnych. Działanie kokainy opiera się głównie na blokowaniu wychwytu zwrotnego dopaminy, noradrenaliny i serotoniny poprzez blokowanie odpowiednich transporterów w błonie neuronów presynaptycznych, dlatego badania nad mechanizmem działania kokainy ograniczają się przede wszystkim do badania jej

tel.: 042-635-44-87, fax: 042-635-44-84,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: anna.krzeslak@biol.uni.lodz.pl
www.cytobiochemia.uni.lodz.pl

wpływu na układ nerwowy. W literaturze przedmiotu mało jest doniesień naukowych dotyczących wpływu zażywania kokainy na tkanki obwodowe, a tymczasem narządy takie jak wątroba czy nerki charakteryzują się dużym stężeniem kokainy i odpowiedzialne są za jej metabolizm. Działanie kokainy w tych tkankach głównie kojarzone jest ze stresem oksydacyjnym, w wyniku którego dochodzi do uszkodzenia tkanek. Glutation stanowiący główny niskocząsteczkowy antyoksydant komórkowy jest obok cysteiny najważniejszym niebiałkowym tiolem uczestniczącym także w metabolizmie związków siarki. Metabolizm ten w kontekście działania kokainy i uzależnienia jest słabo poznany, dlatego podjęcie tego tematu przez Doktorantkę uważam za zasadne, a uzyskane wyniki mogą stanowić cenne uzupełnienie pewnej luki w badaniach dotyczących działania kokainy na organizm.

Tworzące cykl publikacje włączone do rozprawy doktorskiej są niewątpliwie ściśle powiązane tematycznie i wszystkie dotyczą wpływu kokainy na metabolizm endogennych związków siarki u szczurów. Zgodnie z oświadczeniami współautorów wkład Doktorantki w powstanie tego cyklu publikacji jest znaczny. Zabrało mi jednak wykazania udziału mgr Danuty Kowalczyk-Pachel w sformułowaniu hipotezy badawczej i koncepcji badań. Zakładam jednak, że Doktorantka była również zaangażowana w proces projektowania doświadczeń, tym bardziej, że stosowne stwierdzenia znajdują się w dwóch z trzech prac w sekcji *Authors contributions*.

Ponieważ tworzące cykl publikacje, włączone do rozprawy doktorskiej, poddane zostały szczegółowemu procesowi recenzji przez członków komitetów redakcyjnych i międzynarodowych ekspertów, przedmiotem dalszej mojej recenzji będzie ocena efektów pracy naukowej Doktorantki i przede wszystkim sposobu ich przedstawienia w dysertacji.

Praca doktorska licząca 108 stron (bez oświadczeń) ma układ typowy dla rozprawy naukowej i zawiera oprócz załączonych publikacji wstęp teoretyczny, cel pracy, materiały i metody, omówienie i dyskusję wyników poszczególnych prac, podsumowanie oraz piśmiennictwo. Krótki wstęp teoretyczny stanowi dobre i syntetyczne wprowadzenie w zagadnienie związane z przedmiotem badań. Doktorantka przedstawiła w nim podstawowe informacje dotyczące działania kokainy i mechanizmu uzależnienia, wpływu kokainy na tkanki obwodowe oraz fizjologicznej roli związków tiolowych. W kolejnych dwóch krótkich rozdziałach Doktorantka opisała model zwierzęcy wykorzystany w badaniach oraz cel pracy.

Celem pracy było zbadanie wpływu niskich dawek kokainy na tlenowy i beztlenowy metabolizm cysteiny oraz aktywność enzymów związanych z syntezą reaktywnych form siarki na stężenie wybranych związków tiolowych oraz aktywność S-transferazy glutationowej i gamma-

tel.: 042-635-44-87, fax: 042-635-44-84,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: anna.krzeslak@biol.uni.lodz.pl
www.cytobiochemia.uni.lodz.pl

glutamylotranspeptydazy oraz poziom stresu oksydacyjnego. W pracach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej zastosowano dwa modele podawania kokainy: model ostrego i chronicznego dootrzewnowego podania kokainy oraz model dożylnego samopodawania z podtrzymaniem nałogu oraz z odstawieniem narkotyku. W przypadku eksperymentów dotyczących samopodawania narkotyku wprowadzono również oprócz grupy kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną, grupę szczurów, które biernie otrzymywały kokainę poprzez iniekcję w takich samych dawkach jak zwierzęta z grupy samopodawania.

Mam dwie drobne uwagi do rozdziału dotyczącego celu pracy. Po pierwsze Doktorantka stwierdziła, że do podjęcia badań nad wpływem kokainy na metabolizm cysteiny skłoniły zespól badawczy prace Kalivasa i współpracowników, Doktorantka jednak nie cytuje pracy tego autora, ale powołuje się na pracę innych autorów. Wydaje mi się, że może warto byłoby odnieść się bezpośrednio do prac Kalivasa, skoro miały one tak duże znaczenie w wyborze tematu doktoratu. W celu pracy Doktorantka zastrzegła, że badano wpływ niskich dawek kokainy, nie sprecyzowała jednak co oznacza niska vs ewentualnie wysoka lub umiarkowana dawka (ang. moderate dose) w kontekście badań nad uzależnieniem od kokainy z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Jaką dawkę kokainy uważa Doktorantka za niską i dlaczego podkreślenie tego w celu pracy jest istotne? Określenie to budzi moje wątpliwość tym bardziej, że dawkę 10 mg/kg w jednej z prac Autorzy określają raz jako umiarkowaną, raz jako niską. Chciałabym również prosić o wyjaśnienie jaka była różnica pomiędzy ilością kokainy przyjmowanej przez zwierzęta w badaniach z zastosowaniem różnych metod podawania narkotyku.

W kolejnych rozdziałach Autorka dysertacji przedstawiła metodykę badań oraz omówiła wyniki zamieszczone w poszczególnych pracach składających się na cykl publikacji. Pierwsza ze wskazanych prac zawiera wyniki dotyczące określenia indukowanych przez kokainę zmian w stężeniu różnych form cysteiny i homocysteiny oraz produktów beztlenowego metabolizmu cysteiny tj. labilnej zredukowanej siarki w osoczu szczurów. Zwierzęta podane zostały procedurze samopodawania z treningiem wygaszania. Ponadto zastosowano model dootrzewnowego podania kokainy jednorazowo lub w postaci wielokrotnego podania narkotyku. Do oznaczenia różnych form redoksowych tioli oraz labilnej siarki sulfanowej w osoczu szczurów wykorzystana została metoda HPLC, a analizy wykonane przez dr hab. Grażynę Chwatko w Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Omówienie i dyskusja wyników tej pracy przedstawione zostały przez Doktorantkę dosyć skrótowo w porównaniu do bardzo obszernej dyskusji zawartej w artykule. Autorka za szczególnie ciekawy wynik uznaje stwierdzenie, że

tel.: 042-635-44-87, fax: 042-635-44-84,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: anna.krzeslak@biol.uni.lodz.pl
www.cytobiochemia.uni.lodz.pl

zmiany w stężeniu cysteiny i homocysteiny są zależne od sposobu podania narkotyku sugerując, że uzależnienie ma wpływ na formy redoksowe cysteiny i homocysteiny. Ja również uważam, że wynik ten jest bardzo interesujący, ale żałuję, że Doktorantka nie podejmuje próby wyjaśnienia jaki jest biologiczny mechanizm stojący za wpływem sposobu podawania narkotyku na metabolizm cysteiny i homocysteiny. Mam nadzieję, że Doktorantka podejmie próbę przedyskutowania tego zagadnienia podczas obrony pracy doktorskiej.

W kolejnej pracy badano metabolizm cysteiny oraz procesy oksydacyjne w wątrobie i nerkach szczurów po jednorazowym podaniu kokainy lub po zastosowaniu procedury kilkukrotnego podania kokainy. W pracy zastosowano szereg metod włączając w to oznaczanie poziomu reaktywnych form tlenu, całkowitego poziomu siarki sulfanowej i jej formy związanej, siarkowodoru, dialdehydu malonowego, całkowitego poziomu tioli, oraz frakcji tioli związanych z białkami i niezwiązanych z białkami, aktywności szeregu enzymów włączonych w tworzenie i transport siarkowodoru oraz metabolizm glutationu tj. cystationazy (CSE), siarkotransferazy 3-merkaptopirogronianowej (MST), rodanazy (TST), transferazy glutationowej (GST) i γ-glutamylotranspeptydazy (γ-GT). W wyniku przeprowadzonych badań, stwierdzono, że kokaina nieco odmiennie wpływa na tlenowy i beztlenowy metabolizm cysteiny, homeostazę tioli i procesy oksydacyjne w wątrobie i nerkach w zależności od sposobu podania narkotyku. W wątrobie ostre podanie kokainy nie powodowało zmian w metabolizmie cysteiny, natomiast w nerkach stwierdzono wzrost poziomu całkowitej puli siarki sulfanowej oraz spadek poziomu siarki sulfanowej związanej. Z kolei powtarzanie podawania kokainy prowadziło do zwiększenia ogólnej puli związków siarki sulfanowej będących źródłem siarkowodoru zarówno w wątrobie, jak i nerkach. Chroniczne podanie kokainy powoduje jednak zmniejszenia poziomu siarkowodoru w obu narządach, co sugeruje, że jest on szybko przekształcany do tiosiarczanów i siarczanów. Zatem na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że kokaina powoduje przesunięcie metabolizmu cysteiny w kierunku powstawania związków siarki sulfanowej będących źródłem siarkowodoru, który razem z produktami jego dalszej przemiany może wpływać na bioenergetykę mitochondriów i sygnalizację komórkową. Doktorantka podkreśla, że jednym z bardziej intrygujących efektów działania kilkukrotnie podawanej kokainy jest zwiększenie w nerkach stężenia produktu peroksydacji lipidów dialdehydu malonowego pomimo braku zmian w poziomie reaktywnych form tlenu. Może to wskazywać na udział w utlenianiu lipidów rodników siarczynowych. Reasumując w omawianej pracy przedstawiono bardzo interesujące i wartościowe wyniki kompleksowych badań mających na

tel.: 042-635-44-87, fax: 042-635-44-84,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: anna.krzeslak@biol.uni.lodz.pl
www.cytobiochemia.uni.lodz.pl

celu określenie wpływu kokainy na metabolizm cysteiny i procesy oksydacyjne w nerkach i wątrobie szczurów po podaniu kokainy. Doktorantka w dyskusji wyników zawartej w dysertacji zwraca uwagę na wszystkie najważniejsze aspekty badań i dobrze je omawia, choć muszę przyznać, że dyskusja pozostawia jednak pewien niedosyt. Zabrakło mi w dyskusji próby omówienia potencjalnych konsekwencji obserwowanych zmian dla funkcjonowania badanych narządów.

W trzeciej pracy podjęto analizę wpływu na metabolizm cysteiny i procesy oksydacyjne w wątrobie i nerkach szczurów, kokainy podawanej dożylnie wykorzystując ponownie model samopodawania (jak w pracy 1), który miał na celu odzwierciedlać warunki przyjmowania kokainy u osób uzależnionych. Uzyskiwane wyniki porównywano z kontrolą, w której zwierzęta otrzymywały kokainę biernie poprzez iniekcję. Zastosowany model miał pozwolić na odróżnienie motywacyjnego i farmakologicznego działania kokainy. Dodatkowo zwierzęta z grupy samopodawania podzielono na dwie podgrupy, wobec jednej zastosowano procedurę odstawienia narkotyku, wobec drugiej podtrzymania nałogu. Podobnie jak w poprzedniej pracy zastosowano szereg metod mających na celu określenie stężenia tioli i reaktywnych form siarki tworzonych podczas beztlenowego metabolizmu cysteiny oraz stężenia siarczanów. Dodatkowo określono aktywność enzymów zaangażowanych w powstawanie reaktywnych form siarki oraz metabolizm glutationu. Zastosowano również metodę Western blotting do oceny ekspresji genów kodujących wyżej wspomniane enzymy na poziomie białka. Model podawania kokainy zastosowany w tej pracy wydał mi się szczególnie interesujący, choć muszę przyznać, że nie do końca zrozumiałam jakie przesłanki skłoniły Doktorantkę i zespół badawczy do poszukiwania różnic w farmakologicznym i motywacyjnym działaniu kokainy na tkanki obwodowe. Pomimo mojego sceptycyzmu przeprowadzone przez Doktorantkę i zespół badania wskazują, że istnieją duże różnice w poziomie powstających podczas tlenowego metabolizmu cysteiny siarczanów w wątrobie, pomiędzy grupami szczurów otrzymującymi takie same dawki kokainy, ale przyjmowanej biernie lub aktywnie. Doktorantka na podstawie tych wyników sugeruje, że mechanizmy motywacyjne podczas zażywania narkotyków wpływają na sposób w jaki jest on metabolizowany w wątrobie. Jest to bardzo interesujące i wydaje mi się, że wyniki te stanowią przesłankę do podjęcia dalszych badań mających na celu wyjaśnienie mechanizmu stojącego za tą zależnością. Ponadto Doktorantka wykazała, że w wyniku działania kokainy dochodzi do

tel.: 042-635-44-87, fax: 042-635-44-84,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: anna.krzeslak@biol.uni.lodz.pl

zmiany ekspresji i aktywności enzymów zaangażowanych w syntezę i transport reaktywnych form siarki w obu narządach. W wątrobie obserwowany jest również wzrost aktywności GST co może w efekcie prowadzić do wzrostu S-glutationylacji białek. Zawarta w rozprawie doktorskiej dyskusja wyników z trzeciej publikacji jest w mojej ocenie najszersza i najlepsza.

Na koniec mam jeszcze dwie uwagi ogólne dotyczące dysertacji. Przede wszystkim chciałabym zwrócić uwagę na brak cytowań. O ile w rozdziałach wstępu teoretycznego i celu pracy Doktorantka podaje cytowania prac innych autorów, to niestety pomija je zupełnie w rozdziałach zawierających streszczenie wyników i dyskusję badań opisanych w poszczególnych pracach. Uważam to za niedopatrzenie. Niezależnie od faktu, że cytowania takie znajdują się w rozdziałach dyskusji poszczególnych artykułów, powinny się one znaleźć również w bibliografii zamieszczonej na końcu dysertacji. Pragnę zaznaczyć, że umieszczane w dysertacjach opisy wyników i dyskusja potrzebne są do tego aby przekonać recenzenta, że Kandydat potrafi przeprowadzić dyskusję wyników swoich badań. Nie zawsze jest to oczywiste zważywszy na to, że publikacje są z reguły wieloautorskie i niejednokrotnie Doktorant nie jest zaangażowany w napisanie dyskusji do publikacji. Muszę przyznać, że pomimo pewnych braków, mgr Danuta Kowalczyk-Pachel dobrze poradziła sobie z dyskusją wyników, chociaż w mojej ocenie lepiej byłoby gdyby Doktorantka przedstawiła jedną ogólną dyskusję wyników ze wszystkich trzech prac. Bardzo krótkie podsumowanie końcowe z oczywistych względów nie jest według mnie wystarczające, aby dokonać syntezy wszystkich informacji. Ponadto, napisanie jednej dyskusji wyeliminowałoby pewne powtórzenia np. dotyczące zastosowanego modelu czy funkcji enzymów. Uważam również, że dobrze byłoby zamieścić na końcu pracy wnioski. Przyznaję jednak, że ostatni akapit podsumowania stanowi ich substytut.

Podsumowując, pomimo pewnych uwag krytycznych przedstawionych z obowiązku recenzenta, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską pani mgr Danuty Kowalczyk-Pachel. Uważam, że na jej dużą wartość merytoryczną składają się kompleksowe, dobrze zaplanowane i przeprowadzone badania, których wyniki opublikowane zostały w dobrych czasopismach. Doktorantka w swojej rozprawie przedstawiła wyniki niewątpliwie oryginalnych badań, które są nowatorskie i mają dużą wartość poznawczą.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Danuty Kowalczyk-Pachel zatytułowana „Wpływ kokainy na metabolizm związków siarki u szczurów" spełnia warunki określone w art.13 Ustawy

tel.: 042-635-44-87, fax: 042-635-44-84,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: anna.krzeslak@biol.uni.lodz.pl
www.cytobiochemia.uni.lodz.pl

z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DzU nr 65, poz 595 z poźn.zm.). Biorąc powyższe pod uwagę mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego, wniosek o dopuszczenie mgr Danuty Kowalczyk-Pachel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną i oryginalność pracy przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki farmaceutyczne UJ również wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Danuty Kowalczyk-Pachel.

Łódź, 5 czerwca 2022 roku

Anna Krześlak

tel.: 042-635-44-87, fax: 042-635-44-84,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: anna.krzeslak@biol.uni.lodz.pl