

Kraków, 08 września 2024

Prof. dr hab. med. Rafal Chrzan
Kierownik Kliniki Urologii Dziecięcej
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Uniwersytecki Szpital Dziecięcy
ul. Wielicka 265
30-663 Kraków
tel. +48123339045
rafal.chrzan@uj.edu.pl

Recenzja w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne
doktorowi nauk medycznych Tomaszowi Kloskowskiemu

Oceny dokonano na podstawie następujących dokumentów:

- dyplomu uzyskania doktora nauk medycznych,
- autoreferatu,
- wykazu osiągnięć naukowych wraz z oświadczeniami, oraz dydaktycznych i organizacyjnych,
- informacji o stażach naukowych,
- analizy bibliometrycznej.
- kopii publikacji

Zgodnie z obowiązującymi przepisami (art. 219 ust 1. pkt 2) stopień doktora habilitowanego nadaje się osobie, która 1) posiada stopień doktora oraz 2) osiągnięcia naukowe (lub artystyczne), stanowiące znaczny wkład autora w rozwój określonej dyscypliny naukowej (lub artystycznej) oraz 3) wykazuje się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej. Osiągnięciem jest monografia naukowa lub cykl publikacji naukowych powiązanych tematycznie. Zgodnie z wytycznymi RDN podawanie danych naukometrycznych jest wskazane i zalecane, jednak nie mogą one stanowić kryterium oceny dorobku naukowego Kandydata. Składany wniosek powinien uwzględniać jednak ewentualne wymagania określone przez podmiot habilitujący.

Osiągnięcie naukowe

Do oceny zostało przedłożone osiągnięcie naukowe „**Eksperymentalne badania mające na celu wspomaganie leczenia nowotworów układu moczowego i płciowego**” będące cyklem 4 publikacji dotyczących różnych aspektów terapii nowotworów układu moczowo-płciowego. Rak pęcherza moczowego jest 10-tym co do częstości występowania nowotworem na świecie i 5-tym w Europie, a rak prostaty 2-gim nowotworem u mężczyzn. Nowotwory dróg moczowych mogą długo pozostawać skąpoobjawowe, stąd leczenie przypadków zaawansowanych może stanowić duże wyzwanie i wymagać terapii wspomagającej. Poszukiwanie nowych rozwiązań w zakresie chemioterapii i immunoterapii ma olbrzymie znaczenie dla chorych, u których zdiagnozowano nowotwór złośliwy, zarówno w aspekcie uzyskania dobrych wyników, jak i poprawy jakości życia. Nowe koncepcje, w tym wykorzystanie repozycjonowania leków oraz wykorzystywania substancji naturalnych, wymagają prowadzenia dobrze zaplanowanych badań eksperymentalnych. Stąd wybór tematu cyklu jest w mojej opinii jak najbardziej uzasadniony.

Wszystkie publikacje zostały przygotowane z należytą starannością i po pozytywnej ocenie ekspertów-recenzentów ukazały się w indeksowanych czasopismach o wysokim współczynniku Impact Factor (Frontiers in Oncology, International Journal of Molecular Sciences oraz Scientific Reports).

Pierwsza publikacja cyklu to praca pogładowa, w której dokonano analizy możliwego stężenia chinolonów w moczu oraz gruczole prostaty oraz badań eksperymentalnych dotyczących wykorzystania chinolonów prowadzonych na liniach nowotworowych. Spośród 17 analizowanych chinolonów aktywność przeciwnowotworową oceniono dla 15 z nich. Większość chinolonów osiąga wysokie stężenia w moczu. Ciprofloksacyna, ofloksacyna, fleroksacyna, enoksacyna, norfloksacyna i lewofloksacyna to jedyne chinolony, które do tej pory zostały przebadane na komórkach raka pęcherza moczowego, głównie w badaniach *in vitro*. Z przedstawionych danych, wynika, że ciprofloksacyna ma najbardziej obiecujące właściwości na tym polu ze względu na najniższe obliczone wartości stężeń obniżające żywotność komórek o 50%. Tylko 5 chinolonów (ciprofloksacyna, lewofloksacyna, enoksacyna, norfloksacyna i gatifloksacyna) analizowano do tej pory na komórkach nowotworowych prostaty *in vitro*. Podobnie jak w przypadku komórek raka pęcherza moczowego, również ciprofloksacyna była najskuteczniejsza wobec komórek raka prostaty. Jednakże obliczone stężenia powodujące obniżenie żywotności komórek o 50% były dużo wyżej od stężeń, które są osiągalne w tkance prostaty. Analizując mechanizm działania chinolonów na poziomie molekularnym, wykazano, że dochodzi do zahamowania szlaków

przyżyciowych poprzez obniżenie ekspresji genów takich jak IL-1 β , I κ B, NF- κ B, IL-8, TNF- α . Obniżenie aktywności topoisomerazy, ekspresji białka p53 oraz wzrost ekspresji TGF- β 1 prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie S lub G2/M, co w konsekwencji również prowadzi do śmierci komórki na drodze apoptozy. Przeprowadzone badania wskazują, że połączone działanie chinolonów ze standardowymi chemioterapeutykami, lub wykorzystanie zmodyfikowanych chinolonów (kompleksy z metalami) pozwala na uzyskanie lepszych właściwości cytotoksycznych. Podsumowując, chinolony posiadają obiecujące właściwości do wykorzystania w terapii wspomagającej leczenie raka pęcherza moczowego, głównie ze względu na ich skuteczność wobec komórek tego nowotworu oraz wysokie stężenia jakie osiągają w moczu. W przypadku raka prostaty wykorzystanie chinolonów jest ograniczone ze względu na niewystarczające stężenia tych leków osiągalne w tkance prostaty. Coraz więcej danych wskazuje, że infekcje bakteryjne mogą przyczynić się do rozwoju przewlekłego stanu zapalnego prostaty, a to z kolei w przyszłości może doprowadzić do rozwoju raka. Wykorzystanie chinolonów w profilaktyce przeciwbakteryjnej spowoduje hamowanie procesu zapalnego, jednocześnie ze względu na właściwości przeciwnowotworowe może indukować ich śmierć na wczesnym etapie nowotworzenia (tak zwana hipoteza „dwóch uderzeń”).

Celem pracy nr 2 była ocena skuteczności ciprofloksacyny i lewofloksacyny wobec komórek raka pęcherza moczowego i raka prostaty. Analizę przeprowadzono na 4 liniach komórkowych, dwóch nowotworowych: rak pęcherza moczowego (T24), rak prostaty (DU-11 145) oraz dwóch prawidłowych: nabłonek urotelialny (SV-HUC-1) oraz nabłonek prostaty (RWPE-1). Leki badano w zakresie stężeń 25 – 800 μ g/ml, komórki inkubowano z fluorochinolonami przez 24 i 48 godzin. Ciprofloksacyna i lewofloksacyna obniżały żywotność badanych komórek w sposób zależny od dawki leku oraz czasu inkubacji. Oba fluorochinolony miały nieznaczny wpływ na rozkład populacji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Analiza procesu śmierci komórkowej za pomocą cytometrii przepływowej wykazała wzrost liczby komórek dodatnich pod względem aneksyny V (AnV+) i jodku propidyny (PI+) dla obu leków w stężeniu LC90 oraz dodatkowo samego jodku propidyny dla ciprofloksacyny w komórkach raka pęcherza moczowego. Ciprofloksacyna nie wykazywała efektu cytotoksycznego wobec komórek prawidłowych nabłonka urotelialnego, natomiast w przypadku lewofloksacyny efekt ten był mniejszy w porównaniu do komórek nowotworowych. Podsumowując, wykazano, że zarówno ciprofloksacyna jak i lewofloksacyna mogłyby być stosowane w terapii wspomagającej leczenie raka pęcherza moczowego. Porównując bezpośrednio oba badane leki, ciprofloksacyna charakteryzowała się lepszą skutecznością od lewofloksacyny. W przypadku raka prostaty wykazano mniejszy potencjał obu fluorochinolonów w leczeniu tego nowotworu,

ze względu na: brak różnic w skuteczności badanych leków pomiędzy komórkami prawidłowymi i nowotworowymi; obliczone wartości LC przekraczają stężenia tych leków możliwe do osiągnięcia w tkance prostaty.

W pracy 3, oceniono skuteczność 4 fluorochinolonów: norfloksacyny, ofloksacyny, moksifloksacyny oraz enrofloksacyny, wobec komórek raka pęcherza moczowego (T24) oraz prawidłowego nabłonka urotelialnego (SV-HUC-1). Leki badano w zakresie stężeń 25 – 800 µg/ml, komórki inkubowano z fluorochinolonami przez 24 i 48 godziny. Badane leki obniżały żywotność komórek w sposób zależny od dawki leku oraz czasu inkubacji. Na podstawie uzyskanych danych obliczono stężenia obniżające żywotność o 10, 50 i 90% (LC10, LC50, LC90). Stwierdzono, iż wszystkie 4 fluorochinolony obniżały żywotność badanych komórek. Biorąc pod uwagę bezpośrednią skuteczność, najbardziej obiecujące właściwości posiadają norfloksacyna oraz enrofloksacyna gdyż wykazywały najsilniejszy efekt cytotoksyczny wobec obu badanych linii komórkowych. W przypadku norfloksacyny prawie wszystkie obliczone wartości LC są osiągalne w moczu. Zastosowanie wyższych stężeń leku, lub wydłużone jego działanie może przyczynić się do otrzymania efektywnych, wobec komórek nowotworowych, stężeń w moczu. Analizując cytotoksyczny wpływ norfloksacyny obserwowano, podobnie jak w przypadku ciprofloksacyny, tworzenie się kryształów w pożywce hodowlanej. Tworzące się kryształy mogą prowadzić do zmian w nerkach, np. do śródmiąższowego zapalenia nerek, jednakże w przypadku norfloksacyny do uszkodzenia nerek dochodzi bardzo rzadko. Enrofloksacyna posiad również obiecujące właściwości cytotoksyczne, dodatkowo lek ten jest metabolizowany do ciprofloksacyny, która wykazała silne działanie cytotoksyczne wobec komórek raka pęcherza moczowego. Jednakże ze względu na to, iż jest to lek weterynaryjny konieczne jest przeprowadzenie badań klinicznych w celu oceny farmakokinetycznej oraz stopnia konwersji do ciprofloksacyny, co pozwoli na ocenę jego potencjału do zastosowania w leczeniu raka pęcherza moczowego. Wykorzystanie ofloksacyny oraz moksifloksacyny jest ograniczone ze względu na niskie stężenia jakie te leki są w stanie osiągnąć w moczu oraz ze względu na efekt cytotoksyczny względem komórek prawidłowych, który wykazano w badaniu z wykorzystaniem hodowli 3D, a co nie było widoczne w przypadku norfloksacyny i enrofloksacyny. Zaletą ofloksacyny i moksifloksacyny jest brak tworzenia kryształów w pożywce hodowlanej.

W pracy 4, oceniono skuteczność Mumio wobec dwóch linii komórkowych raka pęcherza moczowego (T24 i 5637) oraz linii prawidłowego nabłonka urotelialnego (SV-HUC-1). Mumio badano w zakresie stężeń 200 – 1000 µg/ml, komórki inkubowano przez 24, 48 i 72 godziny. Mumio obniżało żywotność komórek w sposób zależny od dawki leku oraz czasu inkubacji.

Najbardziej skuteczny efekt obserwowano wobec komórek linii T24, w przypadku pozostałych dwóch linii komórkowych efekt był porównywalny. Mumio nie wpływało na dystrybucję komórek prawidłowego nabłonka urotelialnego w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. W przypadku komórek nowotworowych obserwowano wzrost liczby komórek w fazie G0/G1 (linia T24) lub S (linia 5637), co może wskazywać na zatrzymanie cyklu komórkowego w tych fazach. Analiza procesu śmierci komórkowej za pomocą cytometrii przepływowej wykazała wzrost liczby komórek dodatnich pod względem aneksyny V (AnV+) i jodku propidyny (PI+) we wszystkich badanych liniach w stężeniu LC90 oraz w stężeniu LC50 w przypadku linii T24. Obserwacje te wskazują prawdopodobnie na zaawansowany proces apoptozy. Stwierdzono, iż Mumio wykazało silniejszy efekt cytotoksyczny względem komórek raka pęcherza moczowego linii T24. Obliczony wskaźnik SI wskazał na selektywne działania Mumio wobec tej linii komórkowej. W przypadku linii 5637 wskaźnik SI wyniósł poniżej 2, co świadczy o ogólnej toksyczności wobec tych komórek, jednakże wraz ze wzrostem czasu inkubacji z Mumio obserwowano wzrost wskaźnika SI oraz większą skuteczność wobec komórek nowotworowych (niższe wartości LC w porównaniu do komórek prawidłowych). Uzyskano obiecujące wyniki, które tworzą podstawę do dalszego badania Mumio jako potencjalnej substancji w leczeniu raka pęcherza moczowego.

Podsumowując, cykl 4 publikacji jest w powiązany tematycznie, a kolejne prace poruszają wielorakie aspekty badań eksperymentalnych wspomagających leczenie nowotworów układu moczowo-płciowego. Oryginalne i innowacyjne podejście do zagadnienia przejawia się przede wszystkim w następujących w następujących obszarach:

1. analiza aktywności lewofloksacyny wobec komórek raka prostaty, jednocześnie porównując wpływ ciprofloksacyny oraz lewofloksacyny na komórki raka pęcherza moczowego i raka prostaty *in vitro*,
2. analiza aktywności enrofloksacyny oraz moksifloksacyny wobec komórek raka pęcherza moczowego oraz porównano bezpośrednio wpływ norfloksacyny, ofloksacyny, moksifloksacyny oraz enrofloksacyny na komórki prawidłowe oraz nowotworowe nabłonka urotelialnego *in vitro*,
3. ocena wpływu ciprofloksacyny, lewofloksacyny, norfloksacyny, ofloksacyny, moksifloksacyny oraz enrofloksacyny na komórki raka pęcherza moczowego w hodowli 3D,
4. analiza właściwości Mumio na komórkach raka pęcherza moczowego.

Godnym podkreślenia jest fakt, iż Dr Kloskowski jest pierwszym we wszystkich publikacjach wchodzących w skład cyklu i pełnił On wiodącą rolę w ich przygotowaniu.

Wszystkie prace pokazują gruntowne przygotowanie Habilitanta do samodzielnej działalności naukowej. Sumaryczna punktacja cyklu stanowiącego osiągnięcie naukowe to Impact Factor (IF): 20,605 oraz 480 punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW).

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na drobne niedociągnięcia stylistyczne pojawiające się w tekście autoreferatu, m. in. w tabeli na stronie 30 tytuł 2 kolumny to „ilość”, a powinno być „liczba” gdyż odnosi się rzeczowników policzalnych („liczba publikacji”). Na stronie 12, akapit nr 1: „*Podsumowując, praca 2 wykazała...*” – praca czy też publikacja nie może wykazać, „wykazują” autorzy tejsze pracy. Powyższe uwagi, nie umniejszają w żaden sposób wartości naukowej osiągnięcia.

Aktywność naukowa

Dr Tomasz Kloskowski uzyskał w 2014 roku stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej na Wydziale Lekarskim, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika (UMK) w Toruniu i trakcie całej kariery wykazuje się znaczącą aktywnością naukową. Poza publikacjami stanowiącymi osiągnięcie i będącymi podstawą wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego nauk medycznych do obszarów szczególnych zainteresowań Kandydata należą:

- ocena wpływu leków oraz nowych związków chemicznych na proliferację, cykl komórkowy oraz apoptozę komórek prawidłowych i nowotworowych,
- zastosowanie technik inżynierii tkankowej w urologii,
- zastosowanie technik inżynierii tkankowej w regeneracji narządów i tkanek.

Badania z zakresu nauk podstawowych były realizowane w ramach grantów, w których Habilitant był kierownikiem i/lub wykonawcą. Należy zaznaczyć, iż dr Kloskowski nawiązywał w tym celu współpracę z innymi badaczami i był członkiem wielu projektów wielośrodkowych, w tym międzynarodowych. Wyniki Jego zaangażowania w działalność naukową jest imponujący. Dr Kloskowski jest autorem i współautorem ponad 60 publikacji, a zdecydowana część dorobku powstała po uzyskaniu stopnia doktora (39 prac). Analiza naukometryczna wykazała sumaryczny IF - 162.228 oraz 2871 punktów MNiSW. Prace autorstwa Habilitanta były cytowane 911 razy wg bazy Web of Science (714 bez autocytowań), a współczynnik Hirscha wynosi 16. W swoich publikacjach dr Kloskowski w sposób krytyczny podchodzi do analizy prowadzonych badań i nie waha się przedstawiać własnych, oryginalnych hipotez, co świadczy o Jego samodzielności i przenikliwości jako naukowca.

Habilitant jest współautorem rozdziałów w monografiach z zakresu biotechnologii oraz wspomagającego leczenia nowotworów czyli obszarów Jego głównych zainteresowań. Dr Kloskowski uczestniczył jako autor, współautor oraz prelegent w kilkudziesięciu konferencjach i zjazdach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Zwieńczeniem Jego aktywności jest przedstawiony do oceny jako osiągnięcie naukowe cykl publikacji, w którym dr Kloskowski znakomicie łączy swoje wielorakie pasje naukowe.

Za osiągnięcia w pracy naukowej dr Kloskowski otrzymał liczne nagrody i wyróżnienia, m. in. stypendium dla najlepszych doktorantów i stypendium jakościowe oraz Zespołową Nagrodę Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu I stopnia za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej. Został również laureatem X edycji Stypendium dla Wybitnych Młodych Naukowców realizowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (okres finansowanie 36 miesięcy w latach 2015-2018) oraz Laureatem Stypendium Prezydenta Miasta Bydgoszczy dla wybitnych młodych naukowców (2021 – 2022)

Celem doskonalenia warsztatu naukowego Dr Kloskowski odbył staże w renomowanych ośrodkach w Polsce (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie) oraz Niemiec i Holandii.

Działalność naukowa Habilitanta znajduje również odzwierciedlenie w praktyce. Dr Kloskowski jest współautorem 1 patentu oraz 3 zgłoszeń patentowych.

Aktywność dydaktyczna i organizacyjna

Dr Kloskowski prowadzi od 2009 roku prowadzenie zajęcia dydaktyczne z zakresu biologii medycznej, genetyki, inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej w Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, a od 2022 również z zakresu inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej dla kierunku inżynieria biomedyczna w Politechnice Bydgoskiej im Jana i Jędrzeja Śniadeckich. Ponadto, dr Kloskowski był opiekunem grantów studenckich realizowanych w ramach Studenckiego Towarzystwa Naukowego przy Collegium Medicum w Bydgoszczy. Habilitant był promotorem pomocniczym przewodu doktorskiego i promotorem 16 prac dyplomowych oraz recenzentem 8 prac licencjackich i 9 magisterskich.

Bardzo istotnym jest zaangażowanie Habilitanta w działalność popularyzującą naukę. Od 2012 roku dr Kloskowski brał czynny udział w organizacji oraz prowadzeniu warsztatów w ramach Bydgoskiego Festiwalu Nauki oraz konferencji o zasięgu krajowym i międzynarodowym, m. in. Pomorskie Sympozjum Inżynierii Tkankowej i Medycyny

Regeneracyjnej, Ogólnopolska Konferencja Doktorantów i Młodych Naukowców "Per Scientiam ad Salutem Aegroti" oraz Central European Conference on Regenerative Medicine.

Habilitant pełnił odpowiedzialne funkcje doradcze w Collegium Medicum UMK, m. in. jako członek zespołu do opracowania regulaminu zwierzętarni Collegium Medicum UMK, członek Komisji Wyborczej Uniwersytetu na kadencję i członek zespołu doradczego ds. dobrostanu zwierząt utrzymywanych i wykorzystywanych do celów naukowych lub dydaktycznych w Collegium Medicum UMK. Dr Kloskowski aktywnie działał w Stowarzyszeniu na rzecz Rozwoju Medycyny Regeneracyjnej „Aksolotl”. Od wielu lat jest Członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych i “Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society”.

Habilitant pełni rolę recenzenta publikacji naukowych dla renomowanych krajowych i zagranicznych czasopism z zakresu inżynierii tkankowej oraz rolę redaktora w Frontiers in Cell and Developmental Biology sekcja Cell Adhesion and Migration (IF=5.5). Dr Kloskowski był również recenzentem grantów projektów badawczych i grantów studenckich.

Podsumowując stwierdzam, iż dorobek doktora Tomasza Kloskowskiego spełnia kryteria określone przepisami i z pełnym przekonaniem popieram wnioski o nadanie doktorowi Tomaszowi Kloskowskiemu stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. Niniejszym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Wydział Lekarski, Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Habilitanta do dalszych etapów postępowania.

Rafał Chrzan

