

Prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz
Council member - Society for Free Radical Research - Europe,
Chairwoman of Rzeszow Branch of the Polish Biochemical Society
Kierownik Pracowni Biochemii Analitycznej
Instytut Technologii Żywności i Żywienia, Wydział Technologiczno-Przyrodniczy
Uniwersytet Rzeszowski
ul. Zelwerowicza 4, 35-604 Rzeszów
Email: isadowska@ur.edu.pl

Rzeszów, dnia 23 kwietnia 2025 r.

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ LEK. KLAUDII KATARZYNY KITALA-TAŃSKIEJ
pt. „Wpływ zwiększonej podaży miedzi w różnych grupach wiekowych”.**

Uwagi ogólne na temat problematyki badawczej podjętej w ocenianej rozprawie doktorskiej

Pani Lek. Klaudia Katarzyna Kitala-Tańska ukończyła w 2022 roku studia na kierunku lekarskim na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim (UWM) w Olsztynie. W celu ubiegania się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne Pani Lek. Klaudia Kitala-Tańska przedłożyła do recenzji rozprawę doktorską przygotowaną pod kierunkiem dr hab. n. med. Michała Stanisława Majewskiego, prof. UWM, w skład której wchodziły dwie prace oryginalne opublikowane w 2024 roku w czasopiśmie „Nutrients” (Wydawca: MDPI, ang. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*).

Obecność miedzi w diecie jest niezbędna do normalnego przebiegu szeregu podstawowych procesów biochemicznych i fizjologicznych w ludzkim organizmie. Optymalny poziom miedzi w organizmie zapobiega arytmii serca i nadciśnieniu tętniczemu. Miedź jest również zaangażowana w aktywację genów, które są kluczowe dla różnych funkcji biologicznych, w tym reakcji na stres oksydacyjny (OS; *oxidative stress*). Stres oksydacyjny, stan braku równowagi pomiędzy wytwarzaniem a neutralizacją reaktywnych form tlenu, jak i nitracyjny (NS; *nitrative stress*) nieodłącznie towarzyszą wielu chorobom, jeśli nie większości z nich. Redukcja stężenia miedzi może zwiększać OS, poprzez mniejszą produkcję hormonów tarczycy i spadek ich stężenia we krwi. Co więcej, miedź odpowiada za prawidłowy poziom cholesterolu zapobiegając rozwojowi miażdżycy naczyń krwionośnych, która prowadzi do chorób wieńcowych, choroby niedokrwiennej, czy innych schorzeń układu krążenia. Spożywanie większych niż zalecane ilości miedzi każdego dnia przez dłuższy czas, np. miedzi zawartej w wodzie pitnej lub suplementach diety z miedzią prowadzi do uszkodzenia nerek i wątroby. Źródłem toksycznego poziomu miedzi może być także spożycie żywności zawierającej pestycydy. Nadmiar miedzi może pojawić się u chorych z chorobą Wilsona, zwaną inaczej zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowatym, które jest wrodzonym zaburzeniem metabolizmu miedzi, prowadzącym do akumulacji tego pierwiastka w organizmie. Wskutek mutacji w obrębie genu

ATP7B (ang. *ATPase Copper Transporting Beta*) kodującego ATP-azę typu P transportującą miedź ujawnia się dysfunkcja w szlaku sekrecyjnym hepatocytu. Wraz z rozwojem choroby dochodzi do nadmiernego odkładania się związków miedzi w narządach, głównie w wątrobie i/lub mózgu. Innym, genetycznie uwarunkowanym zaburzeniem metabolizmu miedzi jest choroba Menkesa (ang. *Menkes disease, Menkes syndrome, kinky hair disease, steely hair syndrome*) tj. genetycznie uwarunkowana choroba neurodegeneracyjna, polegająca na braku możliwości metabolizowania miedzi dostarczanej w pożywieniu. Przyczyną choroby Menkesa jest mutacja w genie *ATP7A* (ang. *ATPase Copper Transporting Alpha*) w locus Xq12-q13.

Opublikowane badania sugerują, że zarówno nadmiar, jak i niedobór miedzi w diecie może prowadzić do implikacji klinicznych, dlatego też niezmiernie ważna jest dokładna kontrola homeostazy tego pierwiastka. W tym bardzo aktualnym i cennym nurcie badań ulokowała swe zainteresowania i wysiłek badawczy Lek. Klaudia Kitala-Tańska.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są przyczynkiem do otwarcia nowego i ważnego obszaru działań dla potencjalnych interwencji terapeutycznych opartych na suplementacji lub ewentualnym usuwaniu miedzi z diety u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi.

Pani Lek. Klaudia Kitala-Tańska podjęła się próby ustalenia wpływu zwiększonej dawki miedzi w diecie (8-tygodni suplementacji 12.9 mg miedzi/kg pożywienia) organizmów modelowych (samców szczurów rasy Wistar) w dwóch grupach wiekowych (dieta z nadmiarem miedzi rozpoczęta od 3/4-tego tygodnia życia szczura oraz dieta z nadmiarem miedzi rozpoczęta u szczurów po stosowaniu diety z 6.45 mg miedzi/kg pożywienia przez 7 miesięcy od 3/4-tego tygodnia życia).

Hipoteza badawcza dysertacji jest jasno sprecyzowana. Zakłada, że nadmiar miedzi w diecie spowoduje zmiany stężeń mikro- i makroelementów w organizmie, co może wpływać na parametry OS i funkcjonalność układu sercowo-naczyniowego. W celu zweryfikowania tej hipotezy zaplanowano i przeprowadzono następujące analizy: oznaczanie wybranych mikro- i makroelementów w surowicy krwi, nerce oraz wątrobie szczurów (1); oznaczenia poziomów markerów OS w surowicy krwi zwierząt modelowych (2); badania funkcjonalne kurczliwości izolowanej aorty (3) oraz badania funkcjonalne izolowanego serca (4).

Tytuł rozprawy doktorskiej wymaga doprecyzowania. Brakuje istotnej informacji, że badania prowadzono w dwóch grupach wiekowych szczurów rasy Wistar.

Dzięki uzyskanym wynikom poszerzono dotychczasową wiedzę dotyczącą suplementacji miedzią dwóch grup wiekowych wybranych organizmów modelowych:

- w grupie młodych szczurów, wchodzących w wiek dorosły, zwiększona dawka miedzi w diecie nie zmieniła siły skurczu izolowanych pierścieni aorty piersiowej w wyniku działania noradrenaliny, w przeciwieństwie do szczurów w wieku średnim. Natomiast w obu grupach wiekowych zaobserwowano zwiększoną relaksację aorty w wyniku działania acetylocholino (i);

- w grupie młodych szczurów zwiększona dawka miedzi nie zmieniła istotnie parametrów OS we krwi i sercu, w przeciwieństwie do szczurów w wieku średnim. Natomiast w obu grupach wiekowych zaobserwowano zwiększoną produkcję nadtlenu wodoru, tlenku azotu i anionorodnika ponadtlenkowego w aorcie piersiowej szczura (ii);
- w grupie młodych szczurów zaobserwowano istotne zmiany stężenia potasu, żelaza, wapnia i chromu w nerkach oraz magnezu w wątrobie (iii);
- w obu grupach wiekowych zaobserwowano zwiększony poziom miedzi we krwi i wątrobie, co może być istotne w kontekście opisanych regulacji funkcji naczyniowych (iv).

Merytoryczna i edytorska ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska Lek. Klaudii Kitale-Tańskiej pt. „*Wpływ zwiększonej podaży miedzi w różnych grupach wiekowych*” opiera się na dwóch oryginalnych artykułach:

- „*The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle-Aged Rats*”. Kitale-Tańska K, Socha K, Juśkiewicz J, Krajewska-Włodarczyk M, Majewski M. *Nutrients*. 2024;16(8):1172 (1);
- „*Prolonged Copper Supplementation Modified Minerals in the Kidney, Liver and Blood, and Potentiated Oxidative Stress and Vasodilation of Isolated Aortic Rings in Young Wistar Rats*”. Kitale-Tańska K, Hanć A, Juśkiewicz J, Majewski M. *Nutrients*. 2024;16(19):3230 (2), które ukazały się w 2024 roku w czasopiśmie o znacznym zasięgu międzynarodowym z zakresu nauk o żywności i żywieniu „*Nutrients*”. Czasopismo to znajduje się w bazie JCR [wartość współczynnika wpływu [*Impact Factor (IF)*] = 4.8; punktacja MNiSW: 140 pkt].

Wszystkie badania przeprowadzono na szczurach rasy Wistar (Han IGS Ral [Crl:WI](Han))). Do badań wykorzystano szczury w wieku 3/4 tygodni o zbliżonej masie ciała, przydzielone losowo do grup doświadczalnych, którym podawano dietę zawierającą miedź w standardowym lub 2 razy większym stężeniu. Wykonanie tych badań zostało poprzedzone uzyskaniem pozytywnych opinii i zgód Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (zgoda 90/2019 z dnia 26 listopada 2019 r.). Dokumentacja związana z badaniami (protokoły opieki nad zwierzętami i eksperymentów) była zgodna z przepisami regulującymi doświadczenia na zwierzętach obowiązującymi w Rzeczypospolitej Polskiej oraz z Europejską Konwencją o ochronie zwierząt kręgowych wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych, Dyrektywą UE 2010/63/UE ds. doświadczeń na zwierzętach oraz z zasadą 3R i aktualnymi wytycznymi (ARRIVE, NIH nr 86-26). Publikacje zostały przygotowane zgodnie z wymogami edycyjnymi redakcji. Układ prac jest typowy dla tego rodzaju publikacji, we wstępie Autorka wprowadza nas w tematykę i określa cel podjęcia badań. Najważniejszą częścią każdej publikacji naukowej jest dyskusja, którą Lek. Klaudia Kitale-Tańska poprowadziła wnikliwie konfrontując uzyskane przez siebie wyniki z doniesieniami innych autorów.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania przedstawione w publikacjach były bardzo pracochłonne, wymagały bogatego warsztatu i ogromnej wiedzy, którą Doktorantka zaprezentowała w bardzo przystępny sposób.

Dwie publikacje doświadczalne, będące podstawą rozprawy doktorskiej, to opracowania wieloautorskie (czterech/trzech współautorów). W obu publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a pracy pt. „*The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle-Aged Rats*” autorem korespondującym, co jest przeze mnie przyjęte pozytywnie. Do przedłożonej do oceny dokumentacji zostały dołączone odpowiednie oświadczenia współautorów.

Oświadczenia współautorów wskazują na decydujący wkład Doktorantki w powstanie Jej rozprawy doktorskiej, jednak wymagają doprecyzowania. Troje współautorów publikacji 1 i troje współautorów publikacji 2 wymienia jako swój wkład: „*wykonywanie części eksperymentalnej*”, z czego trudno wywnioskować, czy praca doświadczalna była wykonywana zespołowo, czy też różne osoby wykonywały różne oznaczenia. Czasopismo nie wymaga tak szczegółowych deklaracji, jednak w rozprawie doktorskiej można by udział współautorów określić bardziej precyzyjnie.

Pewien niedosyt może budzić to, że obie prace mają charakter fenomenologiczny i podają zestaw obserwacji, nie zawierają doświadczeń zmierzających do wyjaśnienia zmian spowodowanych zwiększoną podażą miedzi.

Wysoko oceniam prezentację materiałów i metod, opis wyników i dyskusję, które są zwięzłe, lecz w większości należycie precyzyjne. Doktorantka nie ustrzegła się jednak drobnych uchybień, o których muszę wspomnieć z obowiązku recenzenta. Wbrew stwierdzeniu na str. 15 [„*Dostępne komercyjne zestawy ELISA (Biorbyt) zostały użyte do ilościowego określenia aktywności COX-1, COX-2, HO-1, NOS3, GAPDH, ICAM1*”] i str. 17 [„*Tymczasem aktywności COX-1 (0,7-krotnie) (...)*”] technika ELISA umożliwia oznaczenie ilości białek, a nie ich aktywności. Istotnie, wyniki przedstawione na Ryc. 8 i Tab. 2 w pierwszej publikacji podają stężenia enzymów, a nie ich aktywności. Na str. 15 Autorka stwierdza, że „*Absorbancję mierzono ilościowo (...)*”. Trudno jest mierzyć absorbancję w sposób nieilościowy, gdyż jest to wielkość jednoznacznie zdefiniowana przez funkcję logarytmiczną stosunku natężeń światła padającego i przechodzącego przez próbkę. Podziwiam optymizm Doktorantki twierdzącej, że reakcja z dihydroetydyną pozwala oznaczyć stężenie rodnika ponadtlenkowego. Wiele prac wykazało, że reakcja ta nie jest wystarczająco specyficzna wobec anionorodnika ponadtlenkowego, a wiarygodne oznaczenie wymaga rozdzielenia produktów reakcji (np. „*HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes--the ultimate approach for intra- and extracellular superoxide detection*”. Kalyanaraman B, Dranka BP, Hardy M, Michalski R, Zielonka J. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(2):739-44).

Podobnie, dyskusyjną jest sprawą, czy diocetan dichlorodihydrofluoresceiny (DCF-DA) mierzy poziom nadtlenu wodoru; wiadomo powszechnie, że ta sonda fluorogeniczna reaguje także z innymi

reaktywnymi formami tlenu, np. nadtlenoazotynem, a w stosunku do nadtlenu wodoru nie jest zbyt reaktywna w nieobecności katalizatorów.

Doktorantka odsyła w publikacji 1 do odnośnika [18] („*Spirulina extract improves age-induced vascular dysfunction*”. Majewski M et al. Pharm Biol. 2022;60(1):627-637) co do szczegółów oznaczeń przy użyciu sond DAF, DHE i DCF-DA. Jednak w tej publikacji (Majewski et al., 2022) podane są szczegóły dotyczące jedynie wykorzystania DHE, więc szczegóły dotyczące pozostałych sond (np. parametry pomiaru fluorescencji) pozostają owiane nimbem tajemnicy. Nawiasem mówiąc, „*diacetat*” (str. 15) nie jest terminem polskimi można byłoby go zastąpić polską nazwą estru.

Wyniki analiz winny być podawane wraz z jednostkami miary, tymczasem Tabela 2 w publikacji 1 oraz publikacja 2 nie precyzują, w jakich jednostkach podane są wyniki „*O₂^{•-} detection*” i „*H₂O₂ detection*”.

Trzy ostatnie wnioski sformułowane na str. 22 nie są wnioskami z przeprowadzonych badań i można byłoby je sformułować równie dobrze przed rozpoczęciem badań.

Nie jest jasne dlaczego podstawowe parametry charakteryzujące zwierzęta (np. masa ciała i przyrost masy) zostały podane tylko dla szczurów w wieku średnim, a nie dla szczurów młodych (nawet jeśli nie było znaczących różnic pomiędzy grupą kontrolną a doświadczalną).

Nagłówki tabel S2 w obu publikacjach są nieco dziwne: w publikacji 1: „*Significant differences not detected*”, w publikacji 2: „*Results detected*”.

W wielu przypadkach język opisu jest nieprecyzyjny. Dla przykładu - str. 11 „*Conclusion*”, publikacja 2: „*copper, potassium, iron... were modified*”. Modyfikacji mogą ulec poziomy miedzi czy żelaza, ale nie same metale. Podobnie „*Increased nitric oxide*”; rosnać może poziom tlenku azotu, sama cząsteczka zdecydowanie nie. Z kolei w publikacji 1 (str. 1, „*Abstract*”) Doktorantka pisze „*nitric oxide {...}, superoxide anion (...) and hydrogen peroxide (...) increased*”. Zwiększeniu mogły ulec poziomy tych związków, ale nie związki jako takie. Analogicznie nieprecyzyjne zwroty znajdują się w tekście omawiającym publikację: „*wzrost miedzi (..) a także ilorazu miedzi/cynku (..)*. Może wzrastać stężenie miedzi, ale nie miedź; iloraz miedzi i cynku nie ma sensu fizycznego (w przeciwieństwie do ilorazu stężeń) (str. 17). Na str. 20 Doktorantka pisze o „*poziomie zmodyfikowanego TAS*”, co jest niezupełnie zrozumiałe. Nie jest też jasny termin „*lipidy hydroperoksydowe*” (str. 20). Zidentyfikowane „*złożone połączenia między żelazem, miedzią i cynkiem*” (str. 21) sugerują powstawanie kompleksów czy stopów tych metali, podczas gdy Doktorantka ma na myśli relacje pomiędzy zawartościami tych metali. Jakkolwiek prawdą jest, że „*transportery zaangażowane w metabolizm żelaza, miedzi i cynku mogą (...) ułatwiać wchłanianie innych krytycznych pierwiastków śladowych*”, to trudno jednak do tych ostatnich zaliczyć potas i magnez (str. 21).

Teza o „*braku odpowiednich możliwości neutralizacji wolnych rodników przez młody organizm*” (str. 20) jest nieco kontrowersyjna, implikuje bowiem, że młodość jest stanem patologicznym, z czym trudno byłoby mi się zgodzić.

Nie jest jasne (str. 7) dlaczego „*tkanka mięśnia sercowego potrzebuje dużo więcej miedzi niż inne tkanki do skurczu (...)*”; takie nie w pełni oczywiste stwierdzenia dobrze byłoby poprzeć cytowaniami piśmiennictwa.

Drugie zdanie drugiego akapitu na str. 10 jest sformułowane niegramatycznie. Stwierdzenie na str. 13 budzi niedowierzanie: „*Zmierzone stężenie rozpuszczalnika wynosiło poniżej 0,01%*”. Domyślam się (bo nie jest to do końca jasne, że chodziło o DMSO i metanol. Jak mierzono stężenie tych związków w używanych roztworach?

Te zauważone drobne nieścisłości nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy i nie rzutują na jej pozytywną ocenę.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska stanowi istotne osiągnięcie naukowe Doktorantki i Jej Promotora.

Konkluzja

Rozprawa doktorska Lek. Klaudii Kitale-Tańskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami). Wnoszę więc do Wysockiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Lek. Klaudii Kitale-Tańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rzeszów, dnia 23 kwietnia 2025

Prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

Uniwersytet Rzeszowski
Wydział Technologiczno-Przyrodniczy
Kierownik Pracowni Biochemii Analitycznej
Izabela Sadowska-Bartosz
prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz