

Warszawa, 04.11.2025

Rada Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawski Uniwersytet Medyczny

**Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza Krzysztofa Hadriana
pt. „Charakterystyka biochemiczna mysiego modelu choroby Wilsona”**

1. Informacje ogólne

Rozprawa doktorska lekarza Krzysztofa Hadriana, napisana pod kierunkiem prof. dr. hab. Adama Przybyłkowskiego, została wykonana w Klinice Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach projektu badawczego „Ocena neurodegeneracji ośrodkowego układu nerwowego toxic milk mouse – modelu zwierzęcego choroby Wilsona” (nr 1WZ/1/M/MB/N/20).

Tematyka rozprawy wpisuje się w obszar badań o szczególnym znaczeniu klinicznym i naukowym, obejmujących zaburzenia metabolizmu metali ciężkich, mechanizmy neurotoksyczności oraz molekularne podstawy chorób rzadkich. Choroba Wilsona jest klasycznym przykładem wrodzonej choroby metabolicznej, w której defekt genu ATP7B prowadzi do patologicznej akumulacji miedzi w wątrobie i ośrodkowym układzie nerwowym. Pomimo wieloletnich badań, wiele aspektów jej patogenezы pozostaje nie w pełni wyjaśnionych – zwłaszcza dotyczących wczesnych etapów uszkodzeń biochemicznych i neurodegeneracyjnych.

W tym kontekście wybór tematu rozprawy należy uznać za bardzo trafny i aktualny. Badania oparte na modelach zwierzęcych, takich jak myszy *Jackson toxic milk*, umożliwiają identyfikację mechanizmów molekularnych niemożliwych do bezpośredniego zbadania u pacjentów. Dlatego też doceniam wybrany przez Doktoranta obszar badań oraz eksperymentalny model pozwalający na zrozumienie i pogłębienie wiedzy w zakresie patogenezы choroby Wilsona.

2. Ocena struktury rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma klasyczny, przejrzysty układ typowy dla monografii — od przeglądu literatury, opisu materiału, metod badawczych, przedstawienia wyników po dyskusję i wnioski. Doktorant konsekwentnie prowadzi narrację badawczą, wykazując logiczne przejście od problemu klinicznego do eksperymentu i interpretacji wyników.

Część teoretyczna (s. 16–42) została opracowana bardzo starannie, z szerokim przeglądem literatury klinicznej oraz zwierzęcych modeli choroby Wilsona. Doktorant szczegółowo opisuje zmiany obserwowane w poszczególnych organach, głównie w wątrobie i mózgu, omawia rolę miedzi w metabolizmie komórkowym oraz patofizjologiczne skutki jej akumulacji.

Cele badawcze zostały sformułowane jasno i obejmują analizę zmian biochemicznych i pierwiastkowych w wybranych narządach myszy *Jackson toxic milk* oraz ocenę wpływu płci i wieku na te zmiany. Ze względu na strukturę pracy wydaje się zasadne, aby Doktorant oprócz celów badawczych przedstawił również hipotezę badawczą, której brakuje w rozprawie doktorskiej.

Rozdział metodologiczny (s. 44–51) świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu warsztatowym Doktoranta. Szczegółowo zostały opisane warunki hodowli myszy txJ oraz zwierząt kontrolnych (użyto myszy C3HeB/FeJ). W Tabeli 2 przedstawiono dokładną liczbę zwierząt w zależności od wieku i płci w badanych grupach. Zastosowane techniki — metoda całkowitego odbicia promieniowania rentgenowskiego (Total Reflection X-ray Fluorescence) i Fournierowska spektroskopia w podczerwieni (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) — są nowoczesne i adekwatne do celów pracy. Dodatkowo Doktorant zastosował mapowanie przekrojów czołowych mózgu, co pozwoliło mu na porównanie map rozkładu pierwiastków z mapami składu chemicznego oraz badania biochemiczne krwi obejmujące aktywność ceruloplazminy, aktywność enzymów wątrobowych, stężenie bilirubiny, albuminy i neurofilamentów lekkich. Rozdział metodologiczny kończy opis przeprowadzonej analizy statystycznej. W tej części pracy zabrakowało mi informacji o liczbie powtórzeń pomiarowych i analizie mocy statystycznej.

Chciałabym podkreślić, że z metodologicznego punktu widzenia moje zastrzeżenia tej części rozprawy dotyczą niewielkich braków formalnych, które nie podważają wiarygodności uzyskanych wyników, lecz powinny być uzupełnione przed ewentualną publikacją monograficzną.

3. Analiza i interpretacja wyników

Uzyskane wyniki zostały starannie opracowane i zaprezentowane w sposób przejrzysty, logiczny oraz spójny z celami pracy. Zastosowane techniki badawcze pozwoliły na dokładne określenie zawartości miedzi, cynku, żelaza, wapnia, chromu, niklu, manganu

w ocenianych organach. Doktorant wykazał istotny wzrost stężenia miedzi w wątrobie (u 2. miesięcznych myszy *tx* stężenie miedzi było 40-krotnie wyższe niż w grupie kontrolnej), z jednoczesnym wzrostem akumulacji innych pierwiastków, takich jak wapń, chrom, żelazo i cynk ze zmiennym trendem zależnym od wieku. W mózgu obserwowano mniejszą, lecz statystycznie istotną akumulację miedzi i innych pierwiastków w różnych okresach życia myszy, co potwierdza zaburzenia homeostazy metali. W sercu, nerkach, dwunastnicy i oku zmiany były mniej nasilone, jednak wykazywały podobny kierunek.

Analiza widm FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) dostarczyła interesujących danych o zmianach w strukturze białek i lipidów. W próbkach wątrobowych i mózgowych stwierdzono obniżenie intensywności pasm charakterystycznych dla struktury α -helikalnej przy równoczesnym wzroście pasm β , co wskazuje na postępującą denaturację białek. W widmach lipidowych obserwowano przesunięcia, sugerujące zwiększone stężenie nasyconych kwasów tłuszczowych i nasilenie degradacji tłuszczów, zwłaszcza w wątrobie.

Na uwagę zasługuje analiza różnic płciowych. Doktorant wykazał, że samce myszy *tx* cechowały się wyższym stężeniem metali w wątrobie, a także bardziej nasilonymi zmianami w strukturze białek i tłuszczów i wyższym stężeniem bilirubiny, wyższą aktywnością alkalicznej fosfatazy i ALT, wskazując na łagodniejszy przebieg zaburzeń u samic, co może mieć związek z ochronnym działaniem estrogenów. Zróżnicowanie to jest zgodne z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi seks-dymorfizmu w przebiegu choroby Wilsona.

Cennym i oryginalnym elementem pracy było oznaczenie neurofilamentów lekkich (Nf-L) w surowicy krwi. W grupie *tx* ich poziom był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do kontroli, co może wskazywać na postępujące uszkodzenie neuronów.

Doktorant przedstawił wyniki w postaci licznych wykresów i tabel. Dane są zinterpretowane poprawnie i w oparciu o literaturę. Wskazane byłoby pod każdą tabelą i wykresem podać zastosowaną technikę badawczą. Uważam również, że wyniki koncentracji pierwiastków przedstawione w tabelach powinny znaleźć się w aneksie, gdyż znaczna ich część przedstawiona jest również w postaci wykresów, ewentualnie można byłoby zrezygnować z wykresów (choć wizerunkowo wykresy bardziej przemawiają do czytelnika).

Podsumowując, uzyskane wyniki w sposób przekonujący dokumentują złożone konsekwencje zaburzeń metabolizmu miedzi w organizmie i potwierdzają, że model *Jackson toxic milk* jest wiarygodnym odzwierciedleniem patofizjologii choroby Wilsona.

4. Dyskusja i wnioski

Dyskusja w rozprawie doktorskiej lekarza Krzysztofa Hadriana stanowi mocny punkt pracy i świadczy o bardzo dobrej orientacji Autora w tematyce choroby Wilsona oraz

szerzej – w problematyce zaburzeń metabolizmu metali i ich następstw w układzie nerwowym. Doktorant umiejętnie powiązał uzyskane wyniki z doniesieniami literaturowymi, zachowując logiczną strukturę i naukowy umiar w interpretacji.

W pierwszej części dyskusji Doktorant odnosi się do obserwowanego u zwierząt eksperymentalnych wzrostu zawartości miedzi w wątrobie i mózgu, podkreślając, że zjawisko to jest zgodne z klasycznym obrazem patofizjologicznym choroby Wilsona. Wskazuje przy tym na rolę dysfunkcji białka ATP7B i konsekwencje upośledzonego transportu jonów Cu w sieci endoplazmatycznej hepatocytów. Cenne jest również zwrócenie uwagi na wtórne zaburzenia metabolizmu cynku i żelaza, co rzadko bywa eksponowane w publikacjach o tej tematyce.

Na uwagę zasługuje wnikliwa interpretacja wyników dotyczących różnic płciowych. Doktorant pokazuje, że samce myszy *txJ* wykazują większą podatność na zaburzenia metaboliczne i oksydacyjne niż samice, co tłumaczy potencjalnym działaniem ochronnym estrogenów.

Konstrukcja dyskusji jest poprawna, logiczna i prowadzi czytelnika przez kolejne wnioski wynikające z danych. Uważam, że w niektórych fragmentach można byłoby rozbudować porównanie wyników z modelu *txJ* do innych modeli zwierzęcych choroby Wilsona (np. *Atp7b*^{-/-} czy *LEC rat*), co pomogłoby lepiej umiejscowić uzyskane dane w szerszym kontekście badań przedklinicznych.

Warto również zauważyć, że Doktorant utrzymuje dyskusję w duchu obiektywnej naukowej argumentacji — unika nadmiernych spekulacji i ostrożnie formułuje uogólnienia. Sposób, w jaki interpretuje własne obserwacje w odniesieniu do stresu oksydacyjnego, zaburzeń mitochondrialnych i neurotoksyczności miedzi, świadczy o dojrzałości badawczej i dobrej znajomości mechanizmów komórkowych.

Z punktu widzenia kompozycji rozprawy, zasadnym byłoby rozważenie dodania krótkiego podsumowania wyników przed częścią „Wnioski”, które syntetyzowałoby najważniejsze dane i ułatwiałoby przejście od konkretów eksperymentalnych do bardziej ogólnych konkluzji, które w obecnej formie uważam za zbyt szczegółowe (szczególnie wniosek 2, w którym zawarto również opis wyników).

Korzystając z przywileju recenzenta chciałabym zapytać Doktorantka:

- Czy zmiany obserwowane w strukturze białek mogą mieć charakter odwracalny po zastosowaniu terapii chelatującej, czy są raczej markerem trwałych uszkodzeń komórkowych?
- Czy wyniki uzyskane w modelu *txJ* mogą stanowić punkt wyjścia do badań klinicznych nad biomarkerami w chorobie Wilsona? Jakie dalsze kierunki badań Doktorant uważa za najbardziej obiecujące?

5. Uwagi redakcyjne

Rozprawa napisana jest poprawnym językiem naukowym. Zwraca jednak uwagę brak ujednoliconego stylu cytacji (mieszane formaty, podanie tylko pierwszego autora). Cytacja nr 140 opisana jest jako „invalid citation”. Przy publikacji należałoby zwrócić uwagę na redakcję piśmiennictwa. Te drobne uchybienia nie wpływają na wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej.

6. Podsumowanie

Rozprawa doktorska lekarza Krzysztofa Hadriana wnosi istotny i wielowymiarowy wkład poznawczy w zrozumienie patomechanizmu choroby Wilsona. Doktorant w sposób konsekwentny i oryginalny wykorzystał mysz model *Jackson toxic milk* do badania zmian w akumulacji miedzi i innych pierwiastków w kluczowych narządach – wątrobie, mózgu, sercu, dwunastnicy i oku. Zastosowanie metod TXRF i FTIR należy uznać za nowatorskie i wzorcowe – połączenie obu technik pozwoliło na jednoczesną ocenę składu pierwiastkowego i zmian strukturalnych białek i lipidów, co znacząco poszerza perspektywę dotychczasowych analiz i wnosi cenny wkład w zrozumienie patogenezы choroby Wilsona oraz w rozwój nowych strategii badawczych i terapeutycznych.

Podsumowując, rozprawa doktorska lekarza Krzysztofa Hadriana pt. „*Charakterystyka biochemiczna mysiego modelu choroby Wilsona*” stanowi oryginalne, interdyscyplinarne i wartościowe opracowanie naukowe i w pełni spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668). Przedkładam zatem Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lekarza Krzysztofa Hadriana do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową rozprawy doktorskiej, znaczący wkład poznawczy w badania nad patogenezą choroby Wilsona, interdyscyplinarny charakter badań oraz potwierdzenie wysokiej jakości uzyskanych wyników poprzez ich opublikowanie w postaci dwóch oryginalnych artykułów w renomowanych czasopismach naukowych o łącznym współczynniku Impact Factor 12.9, z Doktorantem jako pierwszym autorem (Hadrian i wsp., Effect of primary copper metabolism disturbance on biochemical and molecular processes in the brain of toxic milk mice, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023 – IF 7.6; Hadrian i wsp., 2024, Toxic milk mouse – a valid model of Wilson’s disease for studying sex differences and neurodegenerative processes, *Toxicology Reports* – IF 5.3) wnoszę o przyznanie wyróżnienia rozprawie doktorskiej.