

Prof. dr hab. n. med.
Aleksander L. Sieroń, Prof. zw. SUM
Wydział Nauk Medycznych w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ul. Medyków 18
40-752 Katowice
Tel.: 32-2088394
e-mail: alsieron@sum.edu.pl

Katowice, Lipiec 16, 2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

magister Natalii Anny Matwiejczuk

na temat:

”Wpływ kwasu rozmarynowego na zmiany indukowane metylo- i propyloparabenem w metabolizmie kolagenu fibroblastów skóry ludzkiej”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy problemu ważnego dla zdrowia człowieka, jakim jest narażenie naszego organizmu na konserwanty stosowane w produktach, zarówno spożywczych, farmaceutykach, jak i kosmetykach. Czynniki konserwujących dodawanych do produktów, z jakimi się stykamy jest ogromna liczba. Dla większości z nich określono normy zawartości w określonym produkcie. Normy te najczęściej starają się godzić ochronne działanie konserwantu na produkt z potencjalnym zagrożeniem naszego zdrowia. Mimo przyjętych dla konserwantów norm ilościowych, okazuje się że część z nich może się akumulować w tkankach naszego organizmu, co prowadzi do wzrostu ich zawartości i może stanowić potencjalne zagrożenie dla naszego zdrowia. Jedną z grup szeroko stosowanych konserwantów są estry kwasu p-hydroksybenzoesowego (PHBA). W tej grupie znajdują się związki stosowane w produktach kosmetycznych. Ponieważ zewnętrznie stosowane kosmetyki działają przezskórną, dlatego kandydatka, jako problem badawczy podjęła ocenę wpływu wybranych parabenów na fibroblasty skóry człowieka w hodowli *in vitro*. Badania, podjęte przez doktorantkę, pod kierunkiem, światowej renomy, badaczki biologii macierzy pozakomórkowej, pani prof. Anny Galickiej, obejmowały dwa główne wątki. Jeden dotyczył samego mechanizmu działania parabenów na komórki skóry, a drugi skupił się na poszukiwaniu sposobu ograniczenia ich negatywnego wpływu na fibroblasty przy wykorzystaniu kwasu rozmarynowego. Kwas rozmarynowy posiada silne właściwości antyoksydacyjne i przeciwdrobnoustrojowe, przez co jest naturalnym konserwantem stosowanym przez przemysł spożywczy. W naturze kwas ten występuje w wielu roślinach, z

których wyciągi były stosowane już w medycynie tradycyjnej. Dawno temu zwrócono uwagę, że jego spożywanie korzystnie wpływało na różne aspekty zdrowia, w tym opóźniało starzenie się skóry. Pani magister Natalia Anna Matwiejczuk racjonalnie połączyła obserwacje zmian skórnych powodowanych przez parabeny oraz protekcyjne działanie kwasu rozmarynowego na utrzymanie dobrego zdrowia skóry.

Do swoich badań jako mechanizm zmian w skórze w obecności parabenów wytypowała apoptozę, co w konsekwencji skierowało uwagę doktorantki na działający antyapoptotycznie kwas rozmarynowy. Wprawdzie w dysertacji nie wyartykułowano bezpośrednio hipotezy badawczej ale w kilku zdaniach pod koniec rozdziału Cel pracy opisano cele projektu. Mianowicie założono, że parabeny wpływają niekorzystnie na proliferację i w związku z tym na produkowany przez nie kolagen. Drugim założeniem było, że skutki tego działania można osłabić podając kwas rozmarynowy, jako silny antyutleniacz.

Wyniki badań pani magister Natalia Anna Matwiejczuk, wraz ze współpracownikami opublikowała w dwóch pełno-tekstowych doniesieniach, w których jest pierwszą autorką. Trzecią pracą wchodzącą w skład serii spójnych tematycznie publikacji jest artykuł przeglądowy, którego pierwszą autorką jest również Kandydatka.

Oceniana rozprawa doktorska opiera się więc na wynikach opublikowanych w dwóch pracach oryginalnej oraz wiedzy z dziedziny powiązanej z tematyką doktoratu, przedstawionej w obszernej pracy przeglądowej opublikowanej w czasopiśmie, które posiada dobry wskaźnik IF = 3,065. Prace te opublikowano w latach 2017 do 2020, a do dysertacji dołączono je w postaci barwnych odbitek. Pracom oryginalnym towarzyszą również opublikowane materiały uzupełniające. Pani magister uzyskała zgody wszystkich współautorów na wykorzystanie opublikowanych prac do rozprawy doktorskiej i w związku z tym dołączyła ich oryginalne oświadczenia oraz oświadczenie o swojej roli w opublikowanych badaniach, wskazując na 60% udział własny w każdej z prac. W tym miejscu warto zauważyć, że prace stanowiące podstawę przewodu doktorskiego opublikowano w czasopismach, których łączny współczynnik oddziaływania IF = 10,145, co daje 340 punktów według wykazu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW).

Oceniana dysertacja jest więc kompendium w formie zwanego wydruku komputerowego na 28 stronach oraz odbitek prac wraz danymi uzupełniającymi i oświadczeniami Kandydatki i współautorów wykorzystanych publikacji. Ta forma spełnia warunki ustawowe stawiane rozprawom doktorskim w oparciu o zbiór prac spójnych tematycznie. Pani magister Natalia Anna Matwiejczuk opatrzyła całość związkowym

komentarzem, w którym wyodrębniła wstęp, cele pracy, wyniki, dyskusję, wykaz piśmiennictwa oraz streszczenia w językach polskim i angielskim. Całość jest poprzedzona wykazem 3 wykorzystanych publikacji oraz objaśnieniami używanych w dysertacji skrótów.

W zaplanowanych badaniach Kandydatka wyznaczyła sobie 4 główne cele badawcze:

1. Ocena wpływu MP (metyloparaben) na biosyntezę kolagenu i ekspresję poszczególnych typów kolagenu skóry (I, III i VI) oraz aktywność MMP-2 i proliferację komórek w modelu doświadczalnym hodowli fibroblastów skóry ludzkiej.
2. Zbadanie wpływu MP w połączeniu z PP (propyloparaben) na metabolizm kolagenu i proliferację komórek skóry ludzkiej oraz wyjaśnienie potencjalnych mechanizmów ich działania.
3. Wykazanie protekcyjnego działania kwasu rozmarynowego przed niekorzystnym działaniem parabenów na kolagen i fibroblasty skóry ludzkiej.
4. Wyjaśnienie potencjalnych mechanizmów protekcyjnego działania kwasu rozmarynowego (RA) na kolagen i fibroblasty oraz określenie rodzaju jego interakcji z parabenami.

Jako model badawczy mgr Natalia Anna Matwiejczuk wybrała komercyjnie dostępną linię fibroblastów ludzkiej skóry. Przeprowadzone doświadczenia pani magister Natalia Anna Matwiejczuk zaprezentowała w formie rozbudowanego schematu. W skrócie, w 24 godzinnej hodowli fibroblastów doktorantka badała przy różnych stężeniach w kombinacjach MP, MP+PP i RA: przeżywalność i dynamikę podziałów fibroblastów, a także biosyntezę kolagenu, aktywność prolidazy i stężenie całkowitego wydzielanego kolagenu. Przedmiotem testów była również ocena ekspresji wybranych genów metodą QRT PCR, jakościowa ocena wybranych białek metodą western blot, ocena aktywności wybranych proteaz metodą zymografii oraz wykrywanie i lokalizacja kaspazy 3 w komórkach. Dobór metod badawczych był adekwatny do postawionych zadań i został w sposób wystarczający zaprezentowany w opublikowanych pracach oryginalnych.

Wyniki badań i różnice między nimi badano testami statystycznymi, których dobór wskazuje na dobrą znajomość tej części warsztatu naukowego.

Uzyskane wyniki zostały krótko zreferowane w formie opisowej i zaprezentowane w postaci schematu, na którym symbolami zaznaczono wynik hamowania, obniżenia lub wzrost badanych parametrów w odniesieniu do badanych parabenów i kwasu rozmarynowego.

Wybór i sposób prezentowanych wyników w oryginalnych raportach jest bezdyskusyjny, jako że został już oceniony przez recenzentów czasopism naukowych, w których ukazały się publikacje. Oba czasopisma posiadają dobre notowania w postaci IF (1 – 2,909; 2 – 4,171). Pewien niedosyt pozostaje w odniesieniu do danych zamieszczonych w materiałach uzupełniających. Szkoda, że pani magister Natalia Anna Matwiejczuk nie poświęciła więcej uwagi tej części wyników swoim komentarzu.

Dyskusja i podsumowanie są bardzo skrócone. Szkoda, że Kandydatka nie skorzystała z okazji aby szerzej przedstawić problematykę zagrożenia jakim są dla naszego zdrowia konserwanty, a szczególnie ich różnorodność i często duża liczba różnych związków chemicznych. Takie koktajle konserwujące, mogą stanowić mieszaniny związków które w naszym organizmie i jego komórkach mogą wchodzić w trudne do przewidzenia interakcje o charakterze zaburzającym funkcjonowanie, komórek, tkanek, narządów i w efekcie ujemnie wpływać na nasz dobrostan zdrowotny.

W dyskusji, podobnie zresztą jak we wstępie, Kandydatka nie pokusiła się o wykazanie, że istotnie jest bardzo dobrze zorientowana w tematyce toksyczności konserwantów. Dobrze byłoby dlatego pokazać czytelnikom rozprawy, jak ważne są badania nad mechanizmami toksyczności konserwantów na poziomie komórkowy. Oczywiście, praca przeglądowa zawiera wiele informacji za omawianego obszaru badawczego, ale trzeba pamiętać, że badania naukowe są finansowane ze środków publicznych, a rozprawy doktorskie są dostępne dla publiczności dlatego warto pokazać społeczeństwu jak nauka wykorzystuje podatki płacone przez Obywatela i jakie są z tego dlań korzyści.

Wyniki badań zostały podsumowane przez Kandydatkę w 9 wnioskach. Odnosząc liczbę wniosków do liczby 4 celów postawionych na wstępie, jest to raczej bardzo rzadko spotykane. Zwykle wnioski odnoszą się do konkretnych celów. W tym przypadku, cztery pierwsze wnioski odnoszą się do celu 1. Wniosek 5 odpowiada częściowo na założenia celu 2. Pozostałe wnioski bardzo luźno nawiązują do celów 3 i 4. Wniosek przedostatni jest sformułowany jako, raczej hipoteza i nie rozstrzyga o mechanizmie ochronnego działania RA. Oceniając poprawność wnioskowania, uważam że należało z pierwszych 4 wniosków sformułować jednoznaczny jeden wniosek. Podobnie dwa kolejne wnioski można było zapisać jako jeden wskazujący, że słabsze: przeżywalność i proliferacja, obserwowane w obecności parabenów, mają u swych podstaw apoptozę. Na trzeci cel o protekcyjnym działaniu RA powinny odpowiedzieć połączone w jeden, 3 kolejne wnioski. Ostatni cel

pozostaje w zasadzie bez wniosku, albowiem ostatni wniosek jest ogólnym podsumowaniem całości wyników badań.

Według oceniającego brakuje również oceny mocnych i słabych stron tych badań. Coraz częściej wydawnictwa oczekują krytycznego spojrzenia badaczy na zrealizowane projekty. Jeżeli czasopisma w których opublikowano obie oryginalne prace nie miały takich wymogów, to warto było przedstawić je w ich omówieniu.

Wykaz piśmiennictwa w opracowaniu obejmuje 91 pozycji, w tym 41 z ostatnich 10 lat. W publikacji 1 jest ich 40, a w 2, 48 plus 9 w suplemencie. W pracy przeglądowej zacytowano 230 pozycji piśmiennictwa. Na podstawie przeglądu tak dużej liczby prac można wnioskować o dobrej znajomości, przez panią magister Natalię Annę Matwiejczuk, przedmiotu rozprawy doktorskiej.

Dysertacja jest opatrzona streszczeniami, po polsku i angielsku, które dobrze oddają istotę rozprawy.

Podsumowując dysertację magister Natalii Anny Matwiejczuk, pod względem edytorskim, została ona przygotowana starannie i przejrzyście, a Autorka popełniła jedynie nieliczne pomyłki redakcyjne. Mimo kilku krytycznych uwag sformułowanych z obowiązku oceniającego, uważam że praca jest napisana dobrze, co powoduje, że jest dostępna nawet dla czytelnika nie będącego fachowcem w dziedzinie biologii i kosmetologii.

Przedstawione w recenzji uwagi krytyczne nie pomniejszają mojej wysoce pozytywnej oceny pracy pani magister Natalii Anny Matwiejczuk. Przedstawione mi do oceny opracowanie spełnia wymagania ustawy o tytule i stopniach naukowych, stawiane rozprawom doktorskim przygotowanym na podstawie zbioru prac spójnych tematycznie. Mam więc zaszczyt wnioskować do wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie pani magister Natalii Anny Matwiejczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, pragnę podkreślić różnorodność dobrze zaplanowanych i wykonanych badań naukowych, a także wysoce nowatorski ich charakter. Świadczy o tym opublikowanie wyników w dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (IF 7,08 i punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) równa 240). Praca przeglądowa, sama w sobie, posiada bardzo dużą wartość naukową (IF = 3,065; MNiSW 100 punktów). Jest ona bardzo szczegółowa i szeroko traktuje o toksykologii i znanych działaniach niepożądanych badanych substancji. Stanowi więc sama w sobie cenną pozycję dla

specjalistów zajmujących się zagadnieniami realnego narażenia na kosmetyki i potencjału estrogenowego parabenów, w porównaniu do stężeń endogennych parabenów. Przedstawiono w niej ważne informacje o wynikach badań na skórze *in vitro*, w hodowlach komórkowych, dane z wywiadów z osobami różnej płci i wieku, ich związku między ilością parabenów wykrytych w wielu tkankach, płynach, a także u kobiet w ciąży, w mleku karmiących, w płynie owodniowym itp., z stosowaniem kosmetyków przez różne grupy kobiet, mężczyzn i dzieci. Autorzy tej pracy zebrali w tabelach dane i własne obliczenia dotyczące szacowania potencjału estrogenowego na podstawie stężeń parabenów w kosmetykach (materiały uzupełniające – supplementary). W pracy tej autorzy odnieśli się także do faktu, że stężenia parabenów w kosmetykach niejednokrotnie przekraczają zalecane przez SCCS stężenia w zakresie najnowszych wytycznych odnośnie wchłaniania. Także są w tej pracy najaktualniejsze wyliczenia SED na podstawie realnych stężeń parabenów dodawanych do kosmetyków i próba oceny potencjału estrogenowego parabenów występujących w kosmetykach i wiązanych z nowotworami piersi. Ma to szczególne znaczenie dla kosmetyków, które często są używane w kombinacjach po kilkanaście różnych preparatów w tym samym czasie. Praca przeglądowa, w której przedstawiono poglądy na znaczenie parabenów dla naszego zdrowia, zasługuje moim zdaniem bardziej na miano pogładowej, co świadczy o dużych zdolnościach analitycznych Kandydatki.

Podsumowując mam zaszczyt, z pełnym przekonaniem, wnioskować do Wysokiego Senatu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani magister Natalii Anny Matwiejczuk.

Z wyrazami szacunku

