

Prof. zw. dr hab. Andrzej K. Siwicki
Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Ul. Oczapowskiego 13, 10-917 Olsztyn-Kortowo

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Nowak
pt. „Ocena regulacji funkcji ludzkich neutrofilów przez metyloparaben”
zrealizowanej w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
pod kierunkiem naukowym dr hab. n.med. Wioletty Ratajczak-Wrony

Podstawa formalna recenzji

Uchwała Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 24.11.2021 r.

Na podstawie udostępnionych dokumentów, przekazanych przez prof. dr hab. Wojciecha Miltę, Dziekana Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, przygotowano ocenę rozprawy doktorskiej zgodnie z kryteriami określonymi w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz.1852).

Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przewód doktorski prowadzony jest w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest oparta o cykl publikacji naukowych, ma formę manuskryptu i odpowiada standardom rozpraw doktorskich. Została przedstawiona na 42 stronach w skład których wchodzi 2 rysunki. Dysertacja obejmuje: wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, źródła finansowania badań, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody, omówienie wyników 7 prac wchodzących w skład dysertacji, dyskusja i podsumowanie, wnioski,

piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim, fotokopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W suplemencie dysertacji zamieszczono zgodę Komisji Bioetycznej, oświadczenia współautorów publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej oraz dorobek naukowy doktorantki.

W skąd jednotematycznego cyklu wchodzi 2 prace oryginalne oraz 5 prac przeglądowych opublikowane w czasopismach indeksowanych (JCR) o zasięgu międzynarodowym. Na szczególną uwagę zasługują dwie prace oryginalne:

1. Nowak K., Jabłońska E., Radziwon P., Ratajczak-Wrona W. Identification of a novel target for the action of endocrine disrupting chemicals: inhibitory effect of methylparaben on human neutrophil functions. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2020, 27: 6540-6548 (IF= 4,223, punkty MNiSW = 70),
2. Nowak K., Jabłońska E., Garley M. Radziwon P., Ratajczak-Wrona W. Methylparaben-induced regulation of estrogenic signaling in human neutrophils. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2021, 538: 111470 (IF = 4,102, punkty MNiSW = 100)

które stanowiły podstawę merytoryczną do przedstawienia wyników badań oraz wyciągnięcia odpowiednich wniosków prezentowanych w dysertacji doktorskiej. Pozostałe 5 prac wchodzące w skład rozprawy to prace przeglądowe, które stanowiły teoretyczne podstawy do podjęcia badań eksperymentalnych i uzasadniły zakres badań zrealizowanych w dysertacji doktorskiej. Dwie prace oryginalne uzyskały łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor (IF) = 8,325 i punktację MNiSW równą 170. Natomiast na szczególną uwagę zasługuje pięć prac przeglądowych, które uzyskały łączny współczynnik oddziaływania IF = 28,181 oraz punktację MNiSW = 515. Sumaryczny współczynnik wpływu wszystkich 7 prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wyniósł IF = 36,506, a liczba punktów wg MNiSW = 685. Jak wynika z analizy oświadczeń współautorów udział Doktorantki w przedstawionych pracach jest znaczący i pierwszoplanowy z 65 % do 75 % udziałem we wszystkich pracach. Równocześnie wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na włączenie tych publikacji do zbioru składającego się na dysertację doktorską mgr Karoliny Nowak. We wszystkich przedstawionych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem oraz osobą odpowiedzialną za całokształt publikacji.

Realizacja badań zaprezentowanych w niniejszej dysertacji doktorskiej była możliwa dzięki uzyskanemu dofinansowaniu ze środków NCN (projekt badawczy nr: 2018/31/N/NZ&/01074, subwencji Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (projekt

badawczy nr SUB/1/DN.19/006/2206), dotacji finansowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku na rozwój młodych naukowców (projekt badawczy nr N/ST/MN/17/002/2206 oraz N/ST/MN/18/003/2206 oraz dotacji podmiotowych i celowych UM w Białymstoku (N/ST/ZB/17/004/2206).

Problem naukowy, jego sformułowanie i aktualność podjętego zagadnienia naukowego

Konserwacja żywności, leków, kosmetyków czy produktów do higieny osobistej oparta jest na parabenach, a najczęściej identyfikowanym parabenem jest metyloparaben (MeP) – metylowy ester kwasu 4-hydroksybenzoesowego (PHBA). Z spośród kilkunastu związków MeP jest pierwszym środkiem w szeregu homologicznym parabenów, który charakteryzuje się najniższą aktywnością przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą. Pomimo niższej aktywności MeP zapewnia wydajną ochronę konserwowanego produktu przeciw rozwojowi bakterii G+ i G-, pleśni i drożdży, a aktywność oparta jest na hamowaniu syntezy DNA i RNA, inaktywowaniu enzymów bakteryjnych czy bezpośrednim wpływie na właściwości warstw lipidowych co w konsekwencji prowadzi do utraty integralności błon komórkowych drobnoustrojów. MeP uważany jest za konserwant względnie bezpieczny i dopuszczony do stosowania w żywności, kosmetykach, lekach i produktach higieny osobistej oraz podlega ścisłej kontroli i regulacji m. in. przez Agencję Żywności i Leków (FDA), Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Kosmetyków (SCCS) oraz Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Tak duża popularność MeP jako substancji konserwującej jest głównie związana z niskimi kosztami produkcji na skalę przemysłową, wysoką aktywnością przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą w szerokim zakresie pH i temperatury oraz brakiem wpływu na właściwości konserwowanego produktu, gdyż nie posiada zapachu, smaku i jest bezbarwny. Liczne badania wykazały, że niemal 100 % populacji ludzkiej jest narażona na parabeny, w tym w 94-99 % próbkach moczu u dorosłych kobiet i mężczyzn. Stwierdza się jego obecność w kurzu domowym, glebie i naturalnych zbiornikach wodnych, a liczne badania sugerują, że MeP ma negatywny wpływ na zwierzęta hodowlane i wolnożyjące. Narażenie na MeP wiąże się ściśle z jego absorpcją poprzez stosunkowo szybkie wchłanianie przez skórę, przewód pokarmowy lub inhalacje oraz szybkim przenikaniem do krwioobiegu, co sprzyja szybkiej dystrybucji MeP w całym organizmie. Obecność MeP zanotowano w kale,

płynie owodniowym, krwi pępowinowej, spermie, kobiecym mleku, tkance tłuszczowej, włosach oraz paznokciach, co jednoznacznie potwierdza wyjątkowo wysoki stopień narażenia ludzi na jego działania. Punktem zwrotnym w historii stosowania MeP było opublikowanie wyników badań, w których wykazano zależność pomiędzy stosowaniem antyperspirantów konserwowanych parabenami, a występowaniem nowotworów piersi u kobiet. Późniejsze intensywne badania wykazały, że parabeny cechują się wysokim stopniem powinowactwa do elementów układu endokrynnego. Natomiast badania oceniające wpływ MeP na komórki immunologiczne są nieliczne, a brak intensywnych badań w tym zakresie nie pozwala na ocenę wpływu tej grupy preparatów na kształtowanie się nieswoistych mechanizmów obronnych i odporności przeciwwzakaźnej. Pomimo podobieństwa w sposobie działania MeP i endogennych estrogenów oraz wykazanego wpływu na komórki immunokompetentne, badania dotyczące określenia MeP na kluczowe dla odpowiedzi immunologicznej funkcji neutrofilów, komórek należących do PMN i zwanych „mikrofagami”, nie zostały jeszcze przebadane. W związku z powyższym, podjęte przez Doktorantkę badania są nowatorskie oraz mają istotne znaczenie dla immunologii porównawczej i klinicznej.

Problematyka naukowa podjęta przez Doktorantkę posiada znaczący aspekt poznawczy i praktyczny. W przedstawionej do recenzji pracy podjęła się Doktorantka nowego, mało poznanego zagadnienia jakim jest ocena wrażliwości ludzkich neutrofilów na MeP, szczególnie w stężeniach stwierdzanych w krwioobiegu osób stosujących lub narażonych na produkty nim konserwowane oraz czy badany preparat ma bezpośredni wpływ na aktywność i funkcje neutrofilów. Równocześnie Doktorantka podejmuje badania, które mają odpowiedzieć na pytanie, czy mechanizm działania MeP ma wpływ na ekspresję receptorów estrogennych ER α i ER β oraz regulację klasycznej ścieżki szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B w neutrofilach. Cele pracy są sformułowane jasno oraz są spójne z przedstawionymi do rozwiązania problemami naukowymi. Autorka podjęła się trudnego zadania, o dużej wartości poznawczej i praktycznej.

Poprawność i oryginalność metodyczna, ocena wyników badań oraz ich interpretacji

Materiał i metody badawcze są prawidłowo dobrane i adekwatne do celu i zakresu badań. Układ doświadczeń oraz schemat prowadzonych badań jest

przedstawiony jasno i zwięźle, co pozwala na łatwą obserwację i pełną ocenę postępowania diagnostycznego. Metody badawcze użyte do rozwiązania zamierzonych celów są prawidłowo dobrane i spełniają wymogi stawiane nowoczesnym technikom badawczym stosowanym w diagnostyce immunologicznej. Zastosowane w badaniach doświadczalnych stężenia MeP oraz zróżnicowane czasy inkubacji są w pełni uzasadnione. Na uwagę zasługuje bardzo przejrzyste przedstawiony schemat metodologii zastosowanej w badaniach realizowanych w ramach dysertacji doktorskiej.

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób zwięzły i jasny. Autorka w sposób przemyślany przeanalizowała uzyskane wyniki badań, które wg mojej opinii posiadają dużą wartość poznawczą i praktyczną, wnosząc nowe dane do immunologii klinicznej i immunotoksykologii. Poczynione obserwacje zamieszczone w dyskusji i podsumowaniu są bardzo cennym elementem wprowadzającym czytającego do oceny sformułowanych wniosków. Wnioski są skomponowane prawidłowo i nie budzą zastrzeżeń merytorycznych.

Ocena znajomości literatury dotyczącej problematyki badań

Cytowane piśmiennictwo zamyka się liczbą 194 pozycji literaturowych. Dobór bogatego, najnowszego piśmiennictwa wskazuje na dużą dojrzałość naukową doktorantki, która w bardzo umiejętny sposób wyselekcjonowała z bogatej literatury źródłowej najcenniejsze pozycje potwierdzające celowość podjętych badań. Na uwagę zasługuje fakt, że 5 prac przeglądowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej w pełni uzasadniły potrzebę podjęcia badań w tak szerokim zakresie.

Przydatność uzyskanych wyników w praktyce

Przeprowadzone przez mgr Karolinę Nowak badania w ramach dysertacji doktorskiej są pionierskie pod względem zastosowanych metod badawczych i uzyskanych wyników oraz przyczyniły się do poszerzenia bardzo skromnej wiedzy na temat wpływu MeP na aktywność i funkcje neutrofilów. Uzyskane wyniki badań *in vitro* realizowane w ramach pracy doktorskiej dostarczyły istotnych danych naukowych, które jednoznacznie wskazują na niekorzystny wpływ MeP na ludzkie neutrofile, przez co jednoznacznie rzucają nowe światło na stosowane parabenów do konserwacji żywności, kosmetyków, leków czy produktów higieny osobistej. Najważniejszym odkryciem będącym wynikiem realizacji badań było wykazanie, że

MeP nie wywiera działania cytotoksycznego na ludzkie neutrofile, ale w stężeniach stwierdzanych w krwioobiegach osób stosujących produkty konserwowane parabenami, może hamować jeden z kluczowych elementów zabijania patogennych mikroorganizmów przez ludzkie neutrofile. Wykazany supresyjny wpływ MeP na zależną od oksydazy NADPH generację O_2^- może skutkować upośledzeniem wewnątrzkomórkowego tlenowego zabijania patogenów oraz zahamowaniem formowania bardzo istotnego mechanizmu obrony jakim jest zjawisko NETs uprawiane przez neutrofile.

Uwagi polemiczne i dyskusyjne

Po pełnej analizie pracy nasuwa się jeszcze kilka drobnych uwag, dotyczących szczególnie niezręcznych sformułowań, czy braku w niektórych miejscach właściwej interpunkcji. Nie zostały one wymienione w recenzji, a jedynie zaznaczone w tekście rozprawy, gdyż według mojej opinii nie rzutują one na bardzo wysoka wartość merytoryczną rozprawy. Praca jest napisana bardzo przejrzysto, z prawidłowym użyciem nazewnictwa charakterystycznego dla danej dyscypliny naukowej. Nie stwierdzam nadmiernego używania zamienników anglojęzycznych, które tak powszechnie wnikają w treść wielu rozpraw na stopień naukowy.

Doktorantka w pełni wywiązała się z bardzo trudnego zadania, a zamierzone cele badawcze oraz uzyskane wyniki przedstawiła w siedmiu bardzo cennych opracowaniach, które zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu światowym.

Wniosek końcowy

Na podstawie przedstawionej oceny stwierdzam, że mgr Karolina Nowak opanowała w pełni zasób wiedzy, pozwalających na realizację badań w zakresie wymaganym od pracownika ze stopniem naukowym doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu, a oceniana praca doktorska posiada bardzo dużą wartość poznawczą i praktyczną.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Nowak w pełni odpowiada warunkom stawianym tego typu opracowaniom na stopień naukowy doktora oraz spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz.1852). W związku z pozytywną oceną dysertacji doktorskiej przedkładam Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w

Białymstoku wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Karoliny Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie powołując się na stosowne przepisy wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą ze względu na dużą wartość poznawczą i praktyczną badań.

Olsztyn, dnia 10 stycznia 2022 r.

Prof. zw. dr hab. Andrzej K. Siwicki