



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Nowak

pt. „Ocena regulacji funkcji neutrofilów przez metyloparaben”

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. n.med. Wioletty Ratajczak-Wrony w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Substancje konserwujące, tak zwane konserwanty, to związki chemiczne działające przeciwutleniająco i hamujące rozwój mikroorganizmów. Towarzyszą nam one na każdym kroku życia codziennego, są bowiem popularnym dodatkiem do produktów żywnościowych, leków, kosmetyków i środków higieny osobistej, znacznie wydłużając ich termin przydatności do spożycia lub użycia.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Nowak dotyczy istotnego problemu: wpływu metyloparabenu – jednego z najczęściej stosowanych konserwantów o symbolu E218, na funkcje neutrofilów krwi obwodowej. Podjęcie takiej tematyki badawczej było jak najbardziej uzasadnione, gdyż pomimo precyzyjnych regulacji prawnych, bezpieczeństwo stosowania konserwantów, zwłaszcza w produktach spożywczych jest przedmiotem ciągłej dyskusji. Ich obecność wykazano bowiem już w płynach ustrojowych, wydzielinach i tkankach człowieka, a sam metyloparaben zakwalifikowano do grupy związków zdolnych do zaburzania aktywności układu wydzielania wewnętrznego (ang. endocrine disrupting chemicals; EDC). W tym kontekście, wpływ konserwantów, a szczególnie metyloparabenu na komórki układu odpornościowego, w tym neutrofile jest słabo poznany.

Strona formalna rozprawy.

Doktorantka skorzystała z możliwości jakie daje Art.187 pkt.3 ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dn. 20 lipca 2018 r. i przedstawiła swoją rozprawę jako „(...) zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych (...)”. Na rozprawę składa się łącznie 7 artykułów, w tym 2 oryginalne, spełniających ustawowy wymóg spójności tematycznej, opublikowanych w latach 2018-2021 w czasopiśmie międzynarodowych, o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF=36,506 i punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki

Instytut Pediatrii

Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii | Zakład Immunologii Klinicznej

ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków, tel. +48 12 658 24 86, faks +48 12 658 17 56

www.cm-uj.krakow.pl

Wpłynęło do Dziekanatu
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej UMB

4.02.2022

podpis

wynoszącej 685 punktów. We wszystkich pracach Doktorantka jest zarówno pierwszym, jak i korespondencyjnym autorem. Tak obszerny zestaw publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest ewenementem i świadczy o swobodnym poruszaniu się Doktorantki w tematyce swoich badań, umożliwiającym Jej publikację dobrych artykułów przeglądowych. Z drugiej strony, zgodnie z obowiązującą dla przewodów doktorskich otwartych przed 30.04.2019 r., Uchwałą Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (z dnia 27 marca 2014 r. w sprawie zmiany Uchwały 13/12 w sprawie kryteriów oceny dorobku naukowego uprawniającego do wszczęcia i przeprowadzenia postępowań o nadanie stopni i tytułu naukowego), cykl prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej „może stanowić jedna lub więcej prac oryginalnych (...) oraz spójna tematycznie praca przeglądowa opublikowana w czasopiśmie znajdującym się na liście MNiSzW (...)”. W tym kontekście, przedłożenie przez mgr Nowak w cyklu prac aż 5 artykułów przeglądowych, pomimo ich niekwestionowanej wartości naukowej, porządkującej opisywane aspekty, nie znajduje jednak formalnego uzasadnienia.

Rozprawę poprzedza informacja o źródłach finansowania przedmiotowych badań, w tym o projekcie Preludium, którego Doktorantka była kierownikiem. Dalej następuje wykaz stosowanych w pracy skrótów oraz omówienie problematyki badań i wyników załączonych publikacji. Całość zamyka suplement, na który składają się: zgody Komisji Bioetycznej na prowadzenie przedmiotowych badań, oświadczenia Doktorantki i wszystkich współautorów publikacji o Jej procentowym udziale w ich powstawaniu. Ostatni element suplementu to szczegółowe CV Doktorantki, uwzględniające również Jej aktywność na rzecz rozwoju społeczności doktorantów UMB oraz działalność popularyzatorską. Wszystkie te szczegóły życiorysu naukowego Doktorantki, z Jej dorobkiem naukowym na czele, są niewątpliwie godne uznania, jednakże z formalnego punktu widzenia nie mogą być brane pod uwagę przy ocenie rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna rozprawy.

W sytuacji, gdy dysertację doktorską stanowi cykl opublikowanych artykułów recenzent ma teoretycznie ułatwione zadanie, gdyż publikacje zostały już poddane wnikliwej ocenie przez recenzentów wyznaczonych przez redakcje czasopism. W praktyce, niełatwo jest jednak ocenić indywidualny wkład doktoranta, zwłaszcza w przypadku publikacji wieloautorskich, a istotne jest określenie, które wyniki przedstawione w publikacjach oryginalnych, kluczowych w postępowaniu na stopień doktora, są jego zasługą. W tym konkretnym przypadku, z załączonych do rozprawy oświadczeń współautorów prac oryginalnych jasno wynika, iż mgr Karolina Nowak miała wiodący udział w ich powstaniu -

65 i 70% (publikacje 6 i 7, odpowiednio). Dodatkowo, Doktorantka w obu pracach była autorem korespondencyjnym, dokumentując w ten sposób swą kluczową rolę nie tylko na etapie realizacji badań, ale również w trakcie powstawania ich koncepcji. Również w artykułach przeglądowych włączonych do cyklu, Doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem.

Omówienie cyklu publikacji posiada układ typowy dla opracowań naukowych. We „Wstępie” Autorka wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań, poczynając od charakterystyki metyloparabenu. Kolejno omawia jego strukturę chemiczną, aktywność biologiczną względem mikroorganizmów, warunkującą jego wykorzystanie jako środka konserwującego oraz opisuje dotychczas poznany wpływ na organizm człowieka. Dalej płynnie przechodzi do opisu neutrofilów, ich powstawania, funkcji pełnionych w układzie odpornościowym i zróżnicowania pod względem fenotypowym i funkcjonalnym.

Cele badań oraz ich realizacja zostały jasno i logicznie sformułowane w kontekście załączonych prac przeglądowych, powstałych w oparciu o światowe piśmiennictwo z tego tematu.

Metodologia badań została opisana w pracach doświadczalnych wchodzących w skład rozprawy i dodatkowo „sumarycznie” zestawiona na czytelnym schemacie. W tym kontekście, dziwi mnie, iż do niektórych badań, np. oceny wpływu metyloparabenu na zdolność neutrofilów do fagocytozy i oceny aktywności oksydazy NADPH, Doktorantka wykorzystywała próbki pełnej krwi, do innych, np. oceny chemotaksji - izolowanych granulocytów, a do jeszcze innych, np. uwalniania anionorodnika nadadtlenkowego – oczyszczonych neutrofilów. Jest to istotny aspekt tych badań, gdyż efekt działania metyloparabenu na neutrofile będzie inny w pełnej krwi, w obecności innych elementów morfotycznych, a inny w przypadku użycia wyizolowanej czystej populacji tych komórek. Optymalnym rozwiązaniem byłoby użycie do wszystkich testów funkcjonalnych oczyszczonych neutrofilów, co pozwoliłoby na zobiektywizowanie uzyskanych wyników, zwłaszcza że np. na wyniki oceny aktywności oksydazy NADPH w pełnej krwi testem redukcji NBT miały zapewne wpływ monocyty, które również wykorzystują ten enzym w procesie „wybuchu tlenowego”. Alternatywnie do oceny fagocytozy, aktywacji oksydazy NADPH i „wybuchu tlenowego” Doktorantka mogła użyć bardziej czułych i swoistych testów, opartych o analizę w cytometrze przepływowym, wykorzystując do tego celu znakowane fluorescencyjnie bakterie i fluorogenne sondy, służące do identyfikacji produkcji reaktywnych

form tlenu. Takie podejście metodyczne umożliwiłoby użycie do wszystkich tych analiz pełnej krwi, bez konieczności izolacji neutrofilów.

W opisanych badaniach funkcjonalnych zabrakło mi oceny wpływu metyloparabenu na powstawanie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs), tym bardziej iż aspekt ten Doktorantka podnosi w podsumowaniu swoich wyników. Jest to o tyle dziwne, iż tworzenie NETs w różnych stanach chorobowych i regulacja tego procesu są bowiem od kilku lat jednym z wiodących tematów badawczych Zespołu Zakładu Immunologii UMB. Badania te zaowocowały wieloma bardzo dobrymi publikacjami Zespołu, również z udziałem Promotora Doktorantki.

Zebrane z powyższych analiz wyniki Doktorantka przedstawiła w artykule pt. „Identification of a novel target for the action of endocrine disrupting chemicals: inhibitory effect of methylparaben on human neutrophil functions”, opublikowanym w czasopiśmie Environmental Science and Pollution Research o współczynniku oddziaływania IF=4,223. Po lekturze streszczenia tego artykułu oraz metodyki badań, czytelnik odnosi wrażenie, że do ich realizacji wykorzystano wyłącznie izolowane neutrofile. Dopiero zamieszczony dalej w tekście schemat doświadczeń wyjaśnia tę kwestię.

Przedstawione w tym artykule wyniki dokumentują brak wyraźnego wpływu metyloparabenu na żywotność badanych komórek i uwalnianie tlenku azotu (NO), ale jego użycie w najwyższych testowanych stężeniach, tj. 10 i 20 μM , wyraźnie upośledzało szereg funkcji neutrofilów, w tym, ich zdolność do chemotaksji, fagocytozy cząstek lateksu, aktywacji oksydazy NADPH i związanej z tym produkcji anionu nadtlenkowego. Te dwa ostatnie parametry były również obniżone przy użyciu metyloparabenu w stężeniu 0,8 μM , które jak podaje sama Autorka jest najwyższym stężeniem parabenów, dotychczas stwierdzonym w krwi człowieka. W tym kontekście, istotna byłaby informacja na jakiej podstawie Doktorantka wybrała do badań dwa bardzo wysokie stężenia 10 i 20 μM , które nie znajdują odzwierciedlenia w sytuacji in vivo.

Bardziej kompleksowa analiza zamieszczonych w publikacji wyników ujawnia jednak pewne braki w ich spójności. Najbardziej rzuca się w oczy dysonans pomiędzy odsetkiem neutrofilów fagocytujących cząstki lateksu (bliski 100% - Ryc.5B), a poziomem komórek wykazujących aktywność oksydazy NADPH (aktywowanej fagocytozą), który w grupie kontrolnej, a więc bez użycia metyloparabenu, wynosił niespełna 40% (Ryc.6A). Z diagnostycznego punktu widzenia wynik taki świadczyłby o głębokim upośledzeniu funkcji

neutrofilów i byłby podstawą do rozpoznania niedoboru odporności. Natomiast u zdrowych dawców krwi, tak niska odpowiedź komórek na stymulację cząstkami lateksu, bez dodatku czynników interferujących, świadczyć może o nie do końca właściwie dobranych warunkach tych doświadczeń, nieoptymalnych dla oceny aktywności oksydazy NADPH. Wyniki podające odsetek komórek z aktywną oksydazą NADPH i tak do pewnego stopnia zostały już „zawyżone” poprzez monocyty krwi, które również wykazują aktywność tego enzymu po fagocytozie cząstek lateksu. Doktorantka podczas obrony powinna ustosunkować się do tych wyników i przedyskutować potencjalne przyczyny takiego stanu rzeczy. Również odsetek neutrofilów wykazujących zdolność do chemotaksji indukowanej fMLP na poziomie 10% w grupie kontrolnej osób zdrowych jest mało przekonujący, zwłaszcza iż przedstawione różnice, choć istotne statystycznie, mogą się mieścić w zakresie błędu metody.

Drugi artykuł oryginalny załączony do cyklu prac pt. „Methylparaben-induced regulation of estrogen signaling in human neutrophils”, został opublikowany w czasopiśmie *Molecular and Cellular Endocrinology*, IF=4,102, i zasługuje na uznanie. Doktorantka przedstawia w nim mechanizm działania metyloparabenu na neutrofile poprzez wykorzystanie receptorów estrogenowych, potwierdzając w ten sposób jego przynależność do grupy ksenoestrogenów. Sama koncepcja tych badań poparta została dogłębną analizą literatury, co dodatkowo zaowocowało trzema publikacjami przeglądowymi Doktorantki. Metodyka tych badań - szczegółowo opisana i przedstawiona na czytelnym schemacie, tym razem oparta została na wykorzystaniu oczyszczonych populacji neutrofilów i użyciu średniej wartości stężenia parabenu oznaczanego w krwi ($0,06 \mu\text{M}$). Stosując technikę Western-blot Doktorantka wykazała zwiększoną ekspresję receptorów estrogenowych typu alfa we frakcji jądrowej neutrofilów po kontakcie z metyloparabenem, wskazując na ich wyłączny udział w wiązaniu tego związku (z wykluczeniem receptorów typu beta). Dalej udokumentowała jego hamujący wpływ na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co wynikało ze zwiększeniem ekspresji podjednostki p65 we frakcji cytoplazmatycznej neutrofilów. W użytym stężeniu metyloparaben obniżał również cytoplazmatyczną ekspresję indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS), prowadząc do spadku produkcji NO. Obserwacja ta pozornie stoi w sprzeczności z wynikami zaprezentowanymi w pierwszej pracy oryginalnej, gdzie po krótkim czasie inkubacji z metyloparabenem (30 min), neutrofile nie wykazywały zmian w produkcji tego mediatora. Tym razem, po 20 godz. inkubacji zaobserwowano istotny spadek jego uwalniania. Rozbieżności te Doktorantka tłumaczy w podsumowaniu swoich wyników. Z kolei, brak

wyraźnego wpływu metyloparabenu na uwalnianie przez neutrofile IL-8, został właściwie zinterpretowany w kontekście literatury światowej.

Wyniki z obu publikacji rekapitulują zwięzłe i logiczne wnioski, a całość omówienia rozprawy zamyka bogata literatura oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Podsumowanie.

Przedłożona do oceny rozprawa mgr Karoliny Nowak jest istotnym opracowaniem na temat wpływu metyloparabenu - związku E218, jednego z najczęściej stosowanych konserwantów żywności, leków i kosmetyków, na funkcje neutrofilów krwi obwodowej człowieka. Problematyka badań przedstawionych w publikacjach oryginalnych oparta została na dogłębnej znajomości przedmiotu, popartej artykułami przeglądowymi, opublikowanymi w uznanych czasopismach, których Doktorantka również była wiodącym autorem. Przedstawione wyniki z jednej strony potwierdzają wcześniejsze dane dotyczące wpływu stosowania konserwantów, zwłaszcza z grupy parabenów na funkcje komórek odporności wrodzonej, a z drugiej, dostarczają nowych, wartościowych danych na temat działania metyloparabenu na neutrofile. Wymienione w recenzji uwagi i komentarze dotyczące jednego z artykułów cyklu, bynajmniej nie przekreślają jego znaczenia, zwłaszcza, iż w części dotyczącej izolowanych neutrofilów, dane te bardzo dobrze komponują się z wynikami przedstawionymi w drugiej publikacji oryginalnej.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Nowak spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 z dnia 3 lipca 2019 r. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn.zm.)”. W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie mgr Karoliny Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Katedra Immunologii Klinicznej
i Transplantologii UJ CM

dr hab. n. med. Jarosław Baran, prof. UJ

Kraków, 28.01.2022