

Dr hab. n. med. Aleksandra Mielczarek-Palacz
Kierownik
Katedry i Zakładu Immunologii i Serologii
Wydziału Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Weroniki Kuźmickiej

pt. „Wpływ żelaza i cynku na tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs)” wykonanej pod kierunkiem Promotora – Pani dr hab. n. med. Olgi Ciepeli oraz Promotora pomocniczego – Pani dr n. med. Małgorzaty Wachowskiej w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

W odpowiedzi immunologicznej realizowanej poprzez nieswoiste (wrodzone) mechanizmy immunologiczne istotne funkcje efektorowe przypisuje się wysoko wyspecjalizowanym komórkom linii neutrofilopoetycznej – neutrofilom, zwanym granulocytami obojętnochłonnymi, które jak powszechnie wiadomo mogą eliminować drobnoustroje dzięki zdolności do fagocytozy, degranulacji, generowania reaktywnych form tlenu (ROS), czy też z udziałem całkiem niedawno odkrytych i opisanych przez zespół profesora Arturo Zychliński'ego zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs). Pomimo dotychczas prowadzonych licznych badań, NETs stanowią nadal nieznaną mechanizm niszczenia patogenów przez neutrofile, w związku z tym obecnie duże nadzieje wiąże się zwłaszcza z poznaniem czynników wpływających na ich wyrzut. Początkowo liczne obserwacje wskazywały na niewątpliwie pozytywne strony tego procesu, jednak jak się okazało ich powstawanie może towarzyszyć także wielu chorobom, w których wykazano nadmierne lub przewlekłe tworzenie NETs, bądź też nieprawidłowe ich usuwanie.

Z uwagi na obecność w NETs wielu jonów, w tym niezbędnych we wszystkich procesach życiowych mikroelementów – cynku i żelaza, poznanie zagadnień dotyczących molekularnych podstaw interakcji pomiędzy tymi pierwiastkami, a wyrzutem NETs pozwoli na ocenę ich roli w regulacji układu odpornościowego oraz może także znaleźć zastosowanie kliniczne. Co więcej, dotychczas przeprowadzone badania nie w pełni wyjaśniają przyczyny zaburzeń odpowiedzi immunologicznej w przypadku ich niedoboru lub nadmiaru.

Z tego względu cel badań podjęty przez Autorkę uważam za interesujący i w pełni uzasadniony. Został on zrealizowany na podstawie oryginalnych wyników badań własnych opublikowanych w cyklu następujących publikacji:

1. Kuźmicka W, Manda-Handzlik A, Cieloch A, Mroczek A, Demkow U, Wachowska M, Ciepela O. Zinc Supplementation Modulates NETs Release and Neutrophils' Degranulation. *Nutrients* 2021;13(1):51. <https://doi.org/10.3390/nu13010051>.
IF: 5,717, Punkty MEiN: 140
2. Kuźmicka W, Manda-Handzlik A, Mroczek A, Cieloch A, Moskalik A, Demkow U, Wachowska M, Ciepela O. Iron excess affects release of neutrophil extracellular traps and reactive oxygen species but does not influence other functions of neutrophils. *Immunology & Cell Biology* 2021; <https://doi.org/10.1111/imcb.12509>.
IF: 5,126, Punkty MEiN: 140
3. Kuźmicka W, Moskalik A, Manda-Handzlik A, Demkow U, Wachowska M, Ciepela O. Influence of iron- and zinc-chelating agents on neutrophil extracellular trap formation. *Central European Journal of Immunology* 2021, 46(2):135-139. <https://doi.org/10.5114/ceji.2021.106985>.
IF: 2,085, Punkty MEiN: 40

Publikacje te tworzą monotematyczny cykl trzech oryginalnych prac naukowych opublikowanych w 2021 roku, pt. „*Wpływ żelaza i cynku na tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs)*”, stanowiący podstawę rozprawy doktorskiej. Wszystkie prace zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym znajdujących się w wykazie *Journal Citation Reports (JCR)*: *Nutrients*, *Immunology & Cell Biology* oraz *Central European Journal of Immunology*. Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania (IF) opublikowanych prac wynosi 12,928, punktacja MEiN 320.

W przedstawionych jako osiągnięcie naukowe publikacjach Pani mgr Weronika Kuźmicka jest pierwszym Autorem, co świadczy o wiodącej roli Pani Magister w ich powstawaniu. Zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami współautorów publikacji, udział w tworzeniu prac składających się na cykl wynosił: 67% w pracy pierwszej, 70% w pracy drugiej oraz 60% w pracy trzeciej. Autorkami korespondencyjnymi dwóch pierwszych publikacji są Promotor pracy Pani dr hab. n. med. Olga Ciepiela oraz Promotor pomocniczy Pani dr n. med. Małgorzata Wachowska, a autorem korespondencyjnym publikacji trzeciej Promotor pracy Pani dr hab. n. med. Olga Ciepiela.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania realizowane przez Doktorantkę były finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Preludium 13, co świadczy, że istotność realizowanego tematu została także podkreślona przez najważniejsze krajowe instytucje finansujące badania oraz promujące nowatorską tematykę.

Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Kuźmickiej jest zgodny z wymogami przyjętymi dla tego typu opracowań, szczególną uwagę zwraca duża staranność w jego opracowaniu.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została zawarta na 87 stronach jednostronnego wydruku komputerowego z podziałem na 9 rozdziałów z zachowaniem właściwych proporcji treści pracy oraz kolejności. Obejmuje następujące elementy: *1. Streszczenie w języku polskim; 2. Streszczenie w języku angielskim; 3. Wstęp; 4. Założenia i cel pracy; 5. Kopie opublikowanych prac; 6. Podsumowanie i wnioski; 7. Piśmiennictwo; 8. Opinie Komisji Bioetycznej i Etycznej oraz 9. Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład każdego z nich w ich powstanie.* Treść dysertacji została poprzedzona słowami kluczowymi w języku polskim i angielskim, informacją o projekcie badawczym w ramach, którego wykonano badania, wykazem publikacji stanowiących pracę doktorską, spisem treści oraz wykazem stosowanych skrótów.

Streszczenie, które zostało zamieszczone zarówno w języku polskim, jak i angielskim w sposób syntetyczny ujmuje analizowaną tematykę oraz zakres prowadzonych badań.

We *Wstępie*, który podzielony jest na trzy podrozdziały, Autorka w pierwszym z nich przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący roli neutrofilów w odporności nieswoistej ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów działania tych komórek. W podrozdziale drugim

czytelnie charakteryzuje strukturę, proces uwalniania oraz czynniki stymulujące wyrzut zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych. Przedstawia także rolę NETs w odporności nieswoistej oraz zaburzenia spowodowane ich wyrzutem. W trzeciej części analizuje rolę żelaza i cynku w organizmie człowieka ze szczególnym uwzględnieniem w odpowiedzi immunologicznej. *Wstęp* zawiera 1 tabelę i 4 ryciny, które są czytelne i dokumentują prezentowane treści. Opracowanie zagadnień w zaprezentowanym rozdziale świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki do pojęcia badań w zakresie realizacji tematyki rozprawy doktorskiej.

W części zatytułowanej *Założenia i cel pracy*, Autorka na podstawie obecnej wiedzy uzasadnia potrzebę pełniejszego poznania molekularnych podstaw interakcji zachodzących pomiędzy najpowszechniej występującymi mikroelementami w organizmie takimi jak: cynk i żelazo oraz wpływu ich niedoboru i nadmiaru na regulację układu odpornościowego w mechanizmie nieswoistej odpowiedzi immunologicznej związanej z wyrzutem zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych. Do realizacji celu pracy wyznaczono następujące szczegółowe zadania badawcze: 1. Zweryfikowanie za pomocą jakiego mechanizmu cynk wpływa na wyrzut NETs poprzez przebadanie wpływu tego pierwiastka na poszczególne etapy wyrzutu sieci; 2. Zweryfikowanie, czy cynk wpływa na inne mechanizmy obronne neutrofilii; 3. Ocena wyrzutu NETs oraz zweryfikowanie wpływu diety na mechanizmy obronne neutrofilii: u myszy karmionych karmą niedoborową w cynk oraz karmionych karmą nadmiarową w cynk; 4. Ocena wpływu chelatorów cynku na wyrzut NETs; 5. Zweryfikowanie za pomocą jakiego mechanizmu żelazo wpływa na wyrzut NETs, poprzez przebadanie wpływu tego pierwiastka na poszczególne etapy wyrzutu sieci; 6. Zweryfikowanie, czy żelazo wpływa na inne mechanizmy obronne neutrofilii; 7. Ocena wyrzutu NETs oraz mechanizmów obronnych neutrofilii u pacjentów z niedokrwistością z niedoboru żelaza; 8. Ocena wyrzutu NETs oraz mechanizmów obronnych neutrofilii u myszy z hemochromatozą; 9. Ocena wyrzutu NETs oraz zweryfikowanie wpływu diety na mechanizmy obronne neutrofilii: u myszy karmionych karmą niedoborową w żelazo oraz karmionych karmą nadmiarową w żelazo; 10. Ocena wpływu chelatorów żelaza na wyrzut NETs.

W rozdziale *Podsumowanie i wnioski*, Doktorantka prezentuje przede wszystkim najważniejsze wyniki badań uzyskane podczas realizacji eksperymentu naukowego:

W pracy pierwszej pt. „*Zinc Supplementation Modulates NETs Release and Neutrophils' Degranulation*” uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań wskazują, że cynk hamuje wyrzut NETs indukowany różnymi stymulatorami w neutrofilach izolowanych od zdrowych ludzi, zdrowych myszy oraz w zróżnicowanych granulocytopodobnych komórkach HL-60. Przeprowadzone badania wykazały, że cynk hamuje uwalnianie NETs poprzez wpływ na cytrulinację histonów, podczas gdy NETs stymulowane są na drodze niezależnej od oksydazy NADPH. Ponadto, Autorka wykazała hamujący wpływ cynku na degranulację neutrofilii izolowanych od zdrowych osób i myszy. Natomiast w przypadku stosowania diety niedoborowej w cynk następowało większe uwalnianie NETs oraz degranulacja.

W pracy drugiej pt. „*Iron excess affects release of neutrophil extracellular traps and reactive oxygen species but does not influence other functions of neutrophils*”, Autorka na podstawie po raz pierwszy przeprowadzonej analizy wpływu holo-transferyny (holo-Tf, holotransferin) na uwalnianie NETs, wykazała, że białko to hamuje wyrzut NETs tylko na drodze zależnej od oksydazy NADPH poprzez hamowanie aktywności elastazy neutrofilowej (NE). Przeprowadzone badania nie wykazały wpływu holo-Tf na fagocytozę, degranulację i uwalnianie ROS u ludzi, ani na wyrzut NETs w zróżnicowanych granulocytopodobnych komórkach HL-60. Natomiast eksperyment przeprowadzony na modelach mysich wykazał, że przeładowanie żelazem hamuje uwalnianie NETs i produkcję ROS w neutrofilach izolowanych od myszy z hemochromatozą i od myszy, u których stosowano dietę nadmiarową w żelazo.

W pracy trzeciej „*Influence of iron- and zinc-chelating agents on neutrophil extracellular trap formation*” na podstawie przeprowadzonych badań Autorka wykazała, że chelatory żelaza i cynku mogą modulować zdolność neutrofilii do wrzutu NETs. Preinkubacja neutrofilii z wewnątrzkomórkowym chelatorem cynku hamuje wyrzut NETs. Ponadto, chelatory żelaza wpływają na uwalnianie NETs, co jest uzależnione od zastosowanego chelatora.

Przeprowadzone badania pozwoliły Autorce na sformułowanie trzech w pełni uzasadnionych wniosków, które ujmują najważniejsze osiągnięcia przeprowadzonych badań:

1. Cynk i żelazo mają wpływ immunomodulujący na nieswoistą odpowiedź immunologiczną.

2. Przed rozpoczęciem suplementacji cynkiem lub żelazem, należy zwrócić szczególną uwagę na korzyści i zagrożenia wynikające z wpływu tych pierwiastków na układ odpornościowy pacjenta.
3. Identyfikacja żelaza i cynku jako związków modulujących funkcje neutrofilii może pomóc w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych w leczeniu pacjentów cierpiących na choroby związane z wyrzutem NETs.

Rozdział *Piśmiennictwo* obejmuje 68 aktualnych pozycji, zostało starannie dobrane oraz zacytowane w tekście pracy.

Na przeprowadzenie badań uzyskana została zgoda Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym oraz II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie, których kopie uchwał zostały zawarte w pracy.

Przedmiotem prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego była ocena wpływu żelaza i cynku na tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych, co zostało jasno sformułowane w tytule pracy i w pełni odzwierciedla zakres prowadzonych badań, które wpisują się w aktualny nurt badawczy współczesnej immunologii. Cele badawcze, które zostały precyzyjnie określone zrealizowano z zastosowaniem adekwatnie dobranych różnorodnych modeli doświadczalnych, które obejmowały materiał kliniczny, w tym: neutrofile zdrowych osób i pacjentów z niedokrwistością z niedoboru żelaza oraz model doświadczalny neutrofilii zdrowych myszy i myszy z hemochromatozą, a także model oparty na linii komórkowej HL-60. Ponadto, w badaniach zastosowano neutrofile wyizolowane z modelu myszy karmionych dietą niedoborową lub nadmiarową w cynk lub żelazo. Części eksperymentalne przeprowadzono z zastosowaniem nowoczesnych metod kompleksowo oceniających wpływ żelaza i cynku na mechanizmy obronne neutrofilii: wyrzut NETs, wybuch tlenowy, fagocytozę, degranulację oraz zbadano mechanizmy za pomocą których badane metale wpływają na wyrzut NETs poprzez analizę wpływu metali na generację reaktywnych form tlenu, aktywność elastazy neutrofilowej oraz cytrulinację histonów. Ponadto, analiza obejmowała wpływ cynku i żelaza na zdolność neutrofilii do zabijania bakterii. Prawidłowo zaplanowane i zrealizowane badania pozwoliły na uzyskanie ciekawych wyników, których starannie przeprowadzona analiza oraz sposób przedyskutowania zasługują na uwagę oraz wskazują na dużą wiedzę Autorki w zakresie realizowanego tematu badawczego.

Merytoryczną wartość rozprawy oceniam bardzo wysoko. Jej przedmiotem jest istotny i oryginalny problem naukowy. Zawarte w cyklu prac i prezentowanej dysertacji osiągnięcia Doktorantki, wnoszą cenne obserwacje wskazujące na nowe ujęcie problemu zarówno w aspekcie poznawczym, ale stanowią także przesłanki do zastosowania klinicznego.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi 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 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.).

W związku z powyższym, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Weroniki Kuźmickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem uzyskania stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Jednocześnie, ze względu na wysoki poziom merytoryczny recenzowanej rozprawy, wartość naukową uzyskanych wyników badań mających potencjalne znaczenie praktyczne oraz opublikowanie ich w prestiżowych czasopismach posiadających znaczący współczynnik oddziaływania IF, proponuję wyróżnienie rozprawy.

Sosnowiec 10.01.2022 r.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Immunologii i Serologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
A. Mielczarek-Palacz
dr hab. n. med. Aleksandra Mielczarek-Palacz