



II DEPARTMENT OF GYNECOLOGY MEDICAL UNIVERSITY IN LUBLIN

Chairman of Department: *Professor Tomasz Rechberger, M.D, Ph.D.*

20-954 Lublin, 8 Jaczewski St., POLAND, tel. +48/81 72 44 268,

72 44 688, 72 44 686; fax + 48/81 72 44 849

Lublin, 12.03.2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Wilczyńskiej pt. „Proteazy i antyproteazy w środowisku wewnątrzmacicznym rozwijającego się płodu”

Po zapoznaniu się z przedstawioną dokumentacją oraz po analizie dorobku naukowego mgr Pauliny Wilczyńskiej stwierdzam, co następuje:

Temat wybrany przez Doktorantkę jest nowatorski, a jednocześnie doskonale wpisuje się w aktualne trendy badawcze dotyczące oceny środowiska wewnątrzmacicznego oraz zmian zachodzących w jego obrębie na rozwój płodu, noworodka oraz na ewentualne wystąpienie określonych schorzeń w kolejnych etapach życia ludzkiego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przedstawia wyniki prowadzonych przez Doktorantkę badań, które zostały zawarte w cyklu 4 opublikowanych prac (2 oryginalnych i 2 poglądowych), spośród których 3 zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach z Impact Factor, jak również 2 publikacji, które są na etapie recenzji. Doktorantka jest pierwszym autorem dwóch opublikowanych artykułów oraz jednego znajdującego się obecnie na etapie recenzowania. Spośród sześciu publikacji przedstawionego cyklu aż 5 jest napisanych w języku angielskim, co ma bardzo istotny wpływ na rozpowszechnianie uzyskanych przez Doktorantkę wyników w międzynarodowym środowisku naukowym. Rozprawa doktorska składa się z krótkiego wstępu, omówienia zagadnienia będącego wiodącym tematem rozprawy doktorskiej, wyników uzyskanych w trakcie prowadzonych badań oraz wniosków końcowych. Warto też podkreślić, że całość została bardzo starannie wydana w formacie A4 oraz jest napisana w sposób zrozumiały. Ponadto do ww. rozprawy zostały dołączone pisemne zaświadczenia dotyczące udziału poszczególnych współautorów w prowadzeniu badań oraz tworzeniu publikacji

końcowych, jak również potwierdzające ich zgodę na wykorzystanie artykułów przez mgr Paulinę Wilczyńską w rozprawie doktorskiej.

W pierwszej publikacji przeglądowej zatytułowanej „Meconium microbiome as a new source of information about long-term health and disease: questions and answers.” Doktorantka przedstawia tematykę mikrobiomu znajdującego się w smółce płodu. Tematyka związana z mikrobiomem człowieka znajduje się obecnie w polu ogromnego zainteresowania naukowego, także w kontekście mikrobiomu płodu. Autorka przedstawia szereg zaburzeń w obrębie ww. mikrobiomu, które mogą mieć wpływ na wystąpienie porodu przedwczesnego, chorób układu immunologicznego, jak również tak odległych następstw, jak wystąpienie otyłości czy zachowań autystycznych u dzieci. W oparciu o model zwierzęcy podnoszone jest również zagadnienie negatywnego wpływu antybiotykoterapii na wewnątrzmaciczny rozwój płodu poprzez zmianę flory bakteryjnej w obrębie jego przewodu pokarmowego. W podsumowaniu Doktorantka opisuje wpływ mikrobiomu przewodu pokarmowego płodu na układ odpornościowy, co może mieć odległe konsekwencje zdrowotne w dalszym okresie rozwojowym człowieka.

W drugiej publikacji „Rola aminopeptydaz łożyskowych w przebiegu ciąży.” przeprowadzona została systematyczna analiza danych dotyczących roli poszczególnych aminopeptydaz, których obecność jest powiązana z funkcjonowaniem ludzkiego łożyska. Doktorantka przedstawia możliwości monitorowania poziomu poszczególnych aminopeptydaz w surowicy krwi matki, który może korelować z ich produkcją w obrębie łożyska. Następnie scharakteryzowana zostaje rola poszczególnych aminopeptydaz w przebiegu ciąży powikłanej stanem przedzrzuawkowym, nadciśnieniem tętniczym oraz porodem przedwczesnym.

W trzeciej publikacji „Total proteolytic activity and concentration of alpha-1 antitrypsin in meconium for assessment of the protease/antiprotease balance.” zaprezentowano wyniki oryginalnych badań dotyczących homeostazy pomiędzy aktywnymi proteazami oraz alfa-1-antytrypsyną w obrębie przewodu pokarmowego płodu w oparciu o wyniki uzyskane z próbek smółki pobranych od 19 donoszonych noworodków. W badaniu porównano również poszczególne próbki smółki uzyskane od tego samego noworodka, co wskazuje na dobrze przemyślany protokół badania. Wskazano, że matki noworodków były w dobrym stanie zdrowia w przebiegu ciąży, niemniej moim zdaniem warto byłoby w przyszłych, podobnych pracach dokładniej uściślić, że nie chorowały i nie przyjmowały leków przed ciążą lub w okresie ciąży mogących modulować poziom proteaz lub ich inhibitorów. W oparciu o uzyskane dane Doktorantka wysnuła wniosek, że poziom alfa-1-antytrypsyny kilkukrotnie przewyższa poziom proteaz, dzięki czemu zachowana jest jej funkcja protekcyjna. Warto zauważyć, że równowaga ta ma charakter dynamiczny, co zostało udowodnione dzięki porównaniu różnych próbek smółki

pobranymi od określonego noworodka, reprezentujących różne etapy rozwojowe płodu, w oparciu o pasaż jelitowy.

Kolejna publikacja cyklu „Correlation between the concentrations of lactoferrin and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in meconium.” przedstawia dalsze badania Doktorantki nad biomarkerami znajdującymi się w smółce. Autorka wykorzystując 81 próbek pobranych od 20 zdrowych noworodków przeprowadziła analizę stężenia lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofilów (NGAL – neutrophil gelatinase-associated lipocalin) oraz laktoferyny. Dotychczas opisywano możliwość oznaczania NGAL jako wczesnego markera pozwalającego na wykrycie ostrego uszkodzenia nerek. Doktorantka zaobserwowała zmiany zachodzące w stężeniach laktoferyny oraz NGAL na różnych etapach życia płodowego. Biorąc pod uwagę zaangażowanie ww. substancji w metabolizm żelaza, Doktorantka sugeruje w podsumowaniu, że ocena ich stężenia w smółce może być przydatna w rozpoznawaniu niedoboru żelaza u noworodka oraz może być pomocna w podjęciu decyzji o ewentualnej suplementacji tego pierwiastka.

Zawarty materiał w złożonej do recenzji publikacji pt. „Meconium proteases and antiproteases as a potential source of biomarkers for the assessment of the intrauterine environment of fetus” Doktorantka dokonała klasyfikacji proteaz oraz ich inhibitorów pobranych ze smółki płodów wykorzystując dostępne międzynarodowe systemy katalogowania enzymów. Powyższa praca badawcza pozwala na lepszą charakterystykę biomarkerów uzyskiwanych ze smółki, jak również na lepsze zrozumienie zjawisk fizjologicznych zachodzących *in utero*.

W materiale badawczym umieszczonym w drugiej nieopublikowanej pracy zatytułowanej „Association between meconium aminopeptidase N/CD13 and inflammation parameters” przedstawiono powiązania stężenia aminopeptydazy N/CD13 (APN/CD13) z licznymi substancjami związanymi ze stanem zapalnym (kalprotektyną, mieloperoksydazą, ceruloplazminą, laktoferyną oraz interleukiną 8) w oparciu o próbki smółki pobrane od zdrowych noworodków. Wykazano istotną zależność pomiędzy wzrostem stężenia APN/CD13 a wzrostem stężeń mieloperoksydazy, ceruloplazminy, laktoferyny oraz interleukiny 8. Pozwala to przyjąć założenie, że powyższe substancje mogą być pomocne w rozpoznawaniu procesów zapalnych, które rozpoczęły się w życiu płodowym.

Podsumowując, rozprawa doktorska stanowi cykl starannie zaplanowanych, spójnych tematycznie badań, których wyniki zostały przedstawione w dwóch artykułach przeglądowych oraz czterech wartościowych publikacjach dotyczących procesów metabolicznych zachodzących *in utero* w oparciu o biomarkery zawarte w smółce noworodka. Wyniki tych badań były również

prezentowane w trakcie międzynarodowych kongresów naukowych. Największym atutem prac jest ich nowatorskość oraz potencjalna możliwość wykorzystania w przyszłości w praktyce klinicznej. Prace oryginalne zamykają wnioski wysunięte na podstawie przeprowadzonych analiz, które odpowiadają celowi badań. Oczywiście idealnie byłoby, gdyby wyniki umieszczone w dwóch ostatnich artykułach (pt. „Meconium proteases and antiproteases as a potential source of biomarkers for the assessment of the intrauterine environment of fetus” oraz „Association between meconium aminopeptidase N/CD13 and inflammation parameters”) zostały już finalnie opublikowane w czasopiśmie, do których zostały wysłane przez Doktorantkę. Niemniej jednak z własnego doświadczenia naukowego wiem, że czas recenzowania w poszczególnych czasopiśmie niejednokrotnie przekracza okres kilku-, a nawet kilkunastu miesięcy. Biorąc pod uwagę wysoką jakość oraz spójność tematyczną badań naukowych zawartych w ww. 2 artykułach uważam, że słusznie zostały one włączone do rozprawy doktorskiej, gdyż stanowią integralną część prezentowanej dysertacji. Uwzględniając ich wartość merytoryczną mam nadzieję, że zostaną one wkrótce opublikowane, ponieważ wnoszą wiele istotnych informacji, które w przyszłości mogłyby zostać wykorzystane w sposób praktyczny w diagnostyce bezinwazyjnej noworodków.

Żadna z oryginalnych publikacji nie dotyczyła sytuacji związanych z patologicznym przebiegiem ciąży. Mam zatem nadzieję, że prace badawcze dotyczące biomarkerów zawartych w smółce będą nadal prowadzone i uwzględnia również patologiczne sytuacje kliniczne. Liczę, że powyższa uwaga zachęci Doktorantkę do kontynuowania tych nowatorskich i interesujących prac badawczych, na przykład w zakresie porodu przedwczesnego.

Warto również podkreślić staranność edytorską, z jaką zostały zaprezentowane zagadnienie, co znacząco ułatwiło zapoznanie się z przedstawionym do recenzji tekstem. Pomimo wielokrotnego czytania przedstawionego materiału, odnalazłem tylko pojedyncze błędy interpunkcyjne, które oczywiście nie wpływają na ocenę końcową rozprawy doktorskiej.

Podsumowując gratuluję Autorce doboru tematu i jakości prac naukowych. Rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie. Stanowi ona interesujące, przedstawione w zrozumiałym sposób i mające potencjalnie duże znaczenie praktyczne, opracowanie naukowe. Biorąc pod uwagę powyższe, po wnikliwym zapoznaniu się z treścią rozprawy doktorskiej pt. „Proteazy i antyproteazy w środowisku wewnątrzmacicznym rozwijającego się płodu”, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Pauliny Wilczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego



Dr hab. n. med. Paweł Miotła