



Bydgoszcz, 05.05.2022 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Elizy Marii Matuszewskiej pod tytułem

„Zastosowanie spektrometrii mas do charakterystyki wybranych produktów pszczelich oraz do proteomicznych analiz wpływu jadu owadów błonkoskrzydłych na organizm ludzki”

Praca wykonana na Wydziale Farmaceutycznym

w Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Jana Matysiaka

Wykorzystanie produktów pochodzenia naturalnego w celach leczniczych, czy prozdrowotnych praktykowane jest od stuleci w ramach medycyny naturalnej, a bez wątplenia do takich produktów pochodzenia naturalnego należą produkty pszczele stosowane w ramach szerokorozumianej apiterapii. Jednakże, jak słusznie wskazała Doktorantka w swojej pracy, oprócz wielu znaczących korzyści prozdrowotnych, zastosowanie produktów pszczelich niesie za sobą ryzyko wystąpienia działań niepożądanych. Wiadomym jest, że działania takie mogą być związane z występowaniem w produktach pszczelich wielu związków czy składników o właściwościach alergizującym stanowiących pozostałości m.in. pyłków roślin czy produktów metabolizmu i/lub jadu owadów należących do rzędu błonkoskrzydłych, ale również mogą być efektem występowania w tych produktach zanieczyszczeń nieorganicznych, a w tym przede wszystkim metali ciężkich, co jest w głównej mierze wynikiem wpływu postępującego antropogenicznego zanieczyszczenia środowiska naturalnego, gdzie informacja o składzie produktów pszczelich może być nie tylko wskaźnikiem ich potencjału prozdrowotnego, ale również może wskazywać na występowanie w tych produktach związków czy metali mogących wywierać toksyczny wpływ na organizm człowieka. Dlatego też, podjęta w rozprawie doktorskiej tematyka jest szczególnie istotna, ze względu na fakt, że skład produktów pszczelich, który zależy jest od czynników środowiskowych, powinien być rutynowo określany ze względu na konieczność poprawy bezpieczeństwa ich wykorzystania terapeutycznego. Dodatkowo, niezmiernie ważne jest zwiększenie możliwości diagnostycznych i prognostycznych alergii wywoływanych przez produkty pszczele. W związku z tym, szczegółowa ocena składu



produktów pszczelich oraz określenie ich potencjalnego wpływu na organizm człowieka jest w pełni uzasadniona, tym bardziej, że ocena składu produktów farmaceutycznych, a w tym produktów pochodzenia naturalnego stanowi jeden z trendów współczesnych nauk farmaceutycznych, a przedłożona przez Panią mgr Elizę Matuszewską rozprawa doktorska znakomicie wpisuje we wspomniane powyżej zagadnienia dotyczące współczesnej wieloaspektowej analityki farmaceutycznej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, stanowi spójny tematycznie zbiór czterech prac eksperymentalnych opublikowanych w latach 2019-2021 w recenzowanych czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej o sumarycznym wskaźniku Impact Factor równym **15,858** i **450** punktach ministerialnych. W trzech publikacjach wchodzących w skład cyklu Doktorantka jest pierwszym autorem. W tym miejscu należy także dodać, że całkowity dorobek naukowy Doktorantki jest znacznie bogatszy, gdyż jest Ona współautorem łącznie 14 publikacji, a współczynnik oddziaływania tych prac wynosi **50,740** i **1530 pkt.** MNiSW. Ponadto, wyniki badań uzyskanych przez Doktorantkę były również prezentowane na wielu krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych, co wskazuje, że Doktorantka jest nie tylko specjalistką w obszarze realizowania tematyki własnego doktoratu, ale ma znacznie szersze zainteresowania naukowo-badawcze.

Odnosząc się bezpośrednio do układu przedłożonej do oceny pracy doktorskiej, to obejmuje ona łącznie 120 stron i po rozdziale w którym przedstawiono informacje dotyczące aktywności naukowej Doktorantki, podobnie jak w klasycznych dysertacjach, zawiera spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, założenia rozprawy oraz część nazwaną omówienie prac wchodzących w skład cyklu publikacji w której opisane zostały wyniki uzyskane w trakcie realizacji prac badawczych. W dalszej części, praca zawiera podsumowanie wyników oraz wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis literatury, a także kopie publikacji wchodzących w skład cyklu. W związku z tym, że prezentowana rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl czterech prac, które są pracami zbiorowymi, stąd w pracy Doktorantka zamieściła stosowne oświadczenia wszystkich współautorów opublikowanych prac naukowych.

Stwierdzić należy, że układ pracy doktorskiej jest przejrzysty i nie budzi zastrzeżeń, a dodatkowo praca napisana jest z dużą dbałością zarówno o stronę merytoryczną, jak i graficzną rozprawy, ale również o poprawny język i formę. Należy również podkreślić, że przedstawiona w pracy dyskusja uzyskanych wyników w porównaniu do obecnej wiedzy w tym zakresie, jednocześnie



potwierdza dużą wiedzę Doktorantki, ale i wskazuje na duże zaangażowanie Doktorantki w tematykę objętą pracą doktorską.

Wskazać również należy, że wyniki badań uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały już opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (dwie prace opublikowane w *Molecules* oraz po jednej pracy opublikowanej w *Metabolites* czy w *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*), dlatego jestem przekonany, że ich poprawność merytoryczna wraz z interpretacją uzyskanych wyników, została już zweryfikowana przez niezależnych recenzentów w procesie *peer review*, dlatego też, jako recenzent z obowiązku dokonam jedynie krótkiej analizy zawartości publikacji wchodzących w skład cyklu pod kątem ich spójności tematycznej oraz nowości naukowej. Po zapoznaniu się z ich treścią z przekonaniem stwierdzam, że publikacje te zostały dobrze zaplanowane, a zarówno zakres zrealizowanych badań, ich dyskusja oraz wnioski w nich przedstawione są na wysokim poziomie pod względem merytorycznym, jak i edytorsko-graficznym.

Cel badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej został jasno sprecyzowany i dotyczył dwóch głównych aspektów, w którym jeden, który można określić mianem badań jakości składu produktów pszczelich, dotyczył charakterystyki składu białkowo-peptydowego mleczka pszczelego oraz oznaczenie zawartości pierwiastków chemicznych w mleczku pszczelim, pyłku pszczelim i propolisie, a drugi aspekt który można określić mianem badań biologicznych związany był z określeniem wpływu jadu pszczelego na organizm człowieka i obejmował nie tylko analizę wpływu składników jadu pszczelego na błony komórkowe, ale również poszukiwanie potencjalnie statystycznie istotnych zmian w proteomie pacjentów uczulonych na jad owadów błonkoskrzydłych. Doprecyzowując, aby zrealizować założone cele Doktorantka zaplanowała i wykonała szereg prac w ramach czterech dobrze zaplanowanych głównych etapów, w ramach których wykonała analizę proteomiczną próbek mleczka pszczelego przy użyciu tandemowego spektrometru mas typu MALDI-TOF/TOF, gdzie na podstawie uzyskanych widm zidentyfikowano peptydy i białka wchodzące w skład mleczka pszczelego, wykorzystując w tym celu bazę danych sekwencji nukleotydowych NCBI i wykonując analizę podobieństwa aminokwasów z zastosowaniem algorytmu BLAST. Ponadto, z użyciem techniki spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-MS), a także z użyciem atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem plazmowym (ICP-OES) Doktorantka oznaczyła zawartość wybranych 24 pierwiastków śladowych i metali ciężkich w różnych produktach pszczelich (w pyłku pszczelim, propolisie i mleczku pszczelim). Natomiast w ramach etapu badań biologicznych przeprowadzonych z wykorzystaniem systemu nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS/MS



przeanalizowała wpływ wybranych alergenów jadu pszczelego, jak melityna, apamina i tertiapina zarówno na proteom pełnych erytrocytów, jak i erytrocytów pozbawionych organelli komórkowych i cytoplazmy. Dodatkowo, Doktorantka z użyciem tandemowego spektrometru mas typu MALDI-TOF/TOF wykonała profilowanie białkowo-peptydowe celem określenia charakterystyki zmian w ekspresji białek zawartych w surowicy krwi pacjentów uczulonych na jad owadów błonkoskrzydłych, jak również celem wskazania białek uczestniczących w odpowiedzi zapalnej towarzyszących odczynowi alergicznemu po użądleniu przez pszczołę lub osę.

Na podstawie uzyskanych wyników obszernych badań, Doktorantka sformułowała poprawnie wnioski podsumowujące najważniejsze osiągnięcia odpowiadające założonemu celowi pracy. Doktorantka w swoich badaniach wykazała m.in., że zastosowanie techniki wyrównywania stężeń pozwoliło nie tylko na potwierdzenie w mleczku pszczelim obecności białek, które były już wskazywane w literaturze, ale umożliwiło także detekcję nowych 10 białek hipotetycznych odpowiadających sekwencji nukleotydów w genomie pszczoły miodnej, których istnienie nie zostało wcześniej potwierdzone eksperymentalnie, a właściwości i funkcje nie były znane. Uzyskane rezultaty badań pokazały również, że stężenia poszczególnych pierwiastków w produktach pszczelich różnią się w zależności od rodzaju produktu i jakości surowca roślinnego z którego pszczoły czerpią substraty do produkcji, a pszczoły i produkty pszczele stanowią mogące czułe wskaźniki antropogenicznego zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Dodatkowo, przeprowadzona przez Doktorantkę analiza proteomiczna erytrocytów oraz ich cieni wykazała istotne zmiany w profilach białkowo-peptydowych błon komórkowych poddanych działaniu toksyn (melityny, tertiapiny, czy apaminy), a obserwowane w proteomie zmiany mogą być związane z potencjalnym działaniem stabilizującym na błony komórkowe, gdyż większość białek których poziom był zmieniony uczestniczy w procesach adhezji i regulacji molekularnej. Przeprowadzone badania wykazały również silną aktywność hemolityczną melityny, przy niewielkich właściwościach hemolitycznych tertiapiny i apaminy, co wskazuje na działanie ochronne i stabilizujące tych toksyn na błony komórkowe. Ponadto, uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują na występowanie statystycznie istotnych różnic w profilach proteomicznych u pacjentów uczulonych na jad owadów błonkoskrzydłych w porównaniu do osób zdrowych, a zidentyfikowane różnice dotyczą poziomu białek uczestniczących w odpowiedzi zapalnej i wskazują na IgE-zależny mechanizm powstawania reakcji alergicznej, co jest niezmiernie ważną informacją w aspekcie etiologii i diagnostyki alergii na jad owadów błonkoskrzydłych wskazując grupę



mediatorów zapalnych jako potencjalnych biomarkerów odpowiedzi alergicznej zachodzącej w ludzkim organizmie po narażeniu na jad tych owadów.

Podsumowując, z przyjemnością stwierdzam, że odnosząc się do całej rozprawy doktorskiej Pani mgr Elizy Matuszewskiej zatytułowanej „Zastosowanie spektrometrii mas do charakterystyki wybranych produktów pszczelich oraz do proteomicznych analiz wpływu jadu owadów błonkoskrzydłych na organizm ludzki”, to trudno w tej pracy znaleźć słabe strony i jako recenzent nie mam żadnych wątpliwości, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska jest pracą nowatorską, wartościową i stanowi oryginalny i twórczy wkład w rozwój współczesnej wieloaspektowej analityki farmaceutycznej wykorzystującej różne techniki separacyjne i systemy detekcji w połączeniu z różnymi algorytmami klasyfikacyjno-predykcijnymi, a dotyczącej zarówno oceny składu produktów pochodzenia naturalnego do jakich zaliczamy produkty pszczele w aspekcie bezpieczeństwa ich wykorzystania terapeutycznego, jak i dotyczącej zwiększenia możliwości diagnostycznych i prognostycznych alergii wywoływanych przez jad owadów błonkoskrzydłych do jakich zaliczamy pszczoły i osy.

Wnioski końcowe

W związku z powyższym przedstawiona dysertacja spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim i z pełnym przekonaniem wnioskuję i proszę Wysoką Radę Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Elizy Marii Matuszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne i równocześnie wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Kierownik
Katedry Toksykologii i Bromatologii

dr hab. inż. Marcin Koba, prof. UMK