

Prof. dr hab. n. med. Marek Sanak
Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej
II Katedra Chorób Wewnętrznych im. prof. Andrzeja Szczeklika
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Dot. DZKP.5210.2.2018/PK

Kraków, 30.03.2018 r.

Recenzja osiągnięcia naukowego oraz aktywności naukowej w postępowaniu habilitacyjnym dr n. med. Pauliny Kleniewskiej, w dziedzinie nauk medycznych dyscyplinie medycyna.

Na podstawie powołania przez Radę Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z dn. 15.01.2017 r. na recenzenta w przewodzie habilitacyjnym Pani dr Pauliny Kleniewskiej (nr wniosku 4-L-7700-2017) przedstawiam opinię dotyczącą osiągnięcia naukowego zatytułowanego „Udział probiotycznych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, inuliny oraz inhibitora kinazy białkowej C (α i β 1) w mechanizmie obrony przed reaktywnymi formami tlenu”.

Pani dr n. med. Paulina Kleniewska studiowała pielęgniarstwo na Wydziale Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, uzyskała stopień magistra w roku 2008. Aktywność naukową wykazywała już podczas indywidualnego toku studiów, prowadząc badania w Klinice Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W latach 2009-2013 była doktorantem w Międzywydziałowej Katedrze Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Pracę doktorską zatytułowaną „*Udział endoteliny 1, oksydazy NADPH, oksydazy ksantynowej i kinazy białkowej C w procesie powstawania reaktywnych form tlenu*” obroniła przed Radą w Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w 2013 roku z wyróżnieniem. Promotorem przewodu doktorskiego Habilitantki była Pani prof. Anna Gorąca. Od roku 2014 pracuję na stanowisku adiunkta w Zakładzie Immunopatologii, Katedry Alergologii, Immunologii i Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Pani dr Paulina Kleniewska przedstawiła jako swoje osiągnięcie naukowe cykl 3 prac oryginalnych oraz jedną pracę poglądową dotyczące stresu oksydacyjnego w kontekście jego

powstawania, pomiarów z wykorzystaniem biomarkerów, udziału w patogenezie astmy oskrzelowej oraz możliwości interwencji terapeutycznych.

1. W pracy oryginalnej zatytułowanej „*The influence of probiotic Lactobacillus casei in combination with prebiotic inulin on the antioxidant capacity of human plasma*” Pani dr Kleniewska jest pierwszym autorem. Praca się ukazała w czasopiśmie *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016;2016:1340903, doi: 10.1155/2016/1340903. Wskaźnik oddziaływania czasopisma jest bardzo dobry i wynosi 4,593. W pracy zawarte zostały wyniki eksperymentu medycznego zaprojektowanego i przeprowadzonego przez Habilitantkę. W badaniu prospektywnym zastosowano suplementację dietetyczną polegającą na podaniu synbiotyku – kombinacji probiotycznego szczepu *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* oraz prebiotycznie działającego polisacharydu roślinnego – inuliny (Biotyk, Polfa). Przed rozpoczęciem podawania suplementu oraz po 7 tygodniach jego stosowania przeprowadzono badanie parametrów antyoksydacyjnych osocza na podstawie pomiaru zdolności redukcji jonów żelaza Fe(III), pomiaru aktywności katalazy, łącznej aktywności dysmutaz ponadtlenkowych oraz łącznej aktywności peroksydaz glutationowych. Wyniki tego eksperymentu jednoznacznie udokumentowały zwiększoną zdolność redukcji jonów Fe(III) oraz zwiększenie aktywności katalazowej osocza po zastosowaniu synbiotyku. Nie obserwowano zmian aktywności oksydaz ponadtlenkowych ani peroksydaz glutationowych. W dyskusji, Habilitantka zestawiała dotychczasowe wyniki badań nad probiotykami, wskazując na istotne rozbieżności w zakresie zmian aktywności dysmutaz ponadtlenkowych i peroksydaz glutationowych. Są one głównie zależne od gatunku i szczepu podawanego probiotyku. Rozbieżności z wcześniejszymi doniesieniami naukowymi mogły też wynikać ze stosowanej suplementacji w stanach chorobowych, charakteryzujących się nasilonym postawaniem reaktywnych form tlenu w organizmie. Uzyskany, jakkolwiek umiarkowany efekt przyrostu zdolności redukcji Fe(III) o średnio 11%, oraz znacznie większy wzrost aktywności katalazowej osocza, istotny statystycznie u kobiet (180%) wyznacza możliwości interwencji z zastosowaniem synbiotyku w grupie zdrowych i młodych osób, która nie powinna wykazywać niedoborów w układach antyoksydacyjnych organizmu.

2. Druga z prac oryginalnych, również pierwszego autorstwa Pani dr Pauliny Kleniewskiej dotyczy tego samego eksperymentu medycznego co praca 1. Przedstawiono w niej skutki podawania synbiotycznej kompozycji na wybrane wskaźniki stresu oksydacyjnego. Praca zatytułowana „*Influence of synbiotics on selected oxidative stress*

parameters” została opublikowana w czasopiśmie *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017;2017:9315375, doi: 10.1155/2017/9315375. Przeprowadzone pomiary osocza obejmowały bardzo popularny biomarker peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych – malonyldialdehyd (MDA), nadtlenuk wodoru oraz stężenia glutationu i disiarczku glutationu. Oznaczono również łączne stężenie wolnych grup tiolowych w osoczu. Wyniki tych pomiarów były spójne z oznaczeniami aktywności antyoksydacyjnych osocza, opublikowanych w pracy 1. Stwierdzono, że podawanie przez 7 tygodni synbiotyku składającego się z *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* wraz z inuliną powoduje istotne obniżenie stężenia MDA i mniejsze stężenia nadtlenuku wodoru w osoczu u kobiet. Bardzo jest interesująca obserwacja zwiększonego łącznego stężenia wolnych reszt tiolowych oraz spójne z nią zwiększone stężenie glutationu przy istotnie mniejszym stężeniu jego disiarczku po suplementacji synbiotykiem. Ponownie, dyskusja wyników wskazuje na spore rozbieżności w obserwowanych przez innych badaczy zmianach stężeń biomarkerów i substancji zaangażowanych w system antyoksydacyjny organizmu, w zależności o stosowanego gatunku i szczepu bakterii probiotycznych. Niewątpliwym osiągnięciem Habilitantki jest wyznaczenie profilu tych zmian po zastosowaniu synbiotycznej kombinacji u młodych i zdrowych osób. Stwierdzone w publikacji 1 różnice związane z płcią uczestników badania zostały ponownie potwierdzone. Wskazują one na wpływy hormonalne w kształtowaniu mikrobiomu jelitowego i zasługują na dalsze badania.

3. W pracy zatytułowanej „*ET-1 mediates the release of reactive oxygen species and TNF- α in lung tissue by protein kinase C α and $\beta 1$* ”, która się ukazała w czasopiśmie *Pharmacological Reports* 2016; 68:121-126 (IF=2,587) Pani dr Kleniewska oraz Pani prof. Anna Gorąca przedstawiają wyniki badań eksperymentalnych wykonanych na modelu szczurzym. W publikacji tej Pani dr Kleniewska jest drugim autorem. Badania przeprowadzono, aby wyjaśnić czy endotelina-1 (ET-1) w modelu szczurzego obrzęku płuca wywiera swoje działanie przez aktywację kinaz białkowych C, a także by wyznaczyć jakie zmiany w zakresie markerów stresu oksydacyjnego temu efektowi towarzyszą. W homogenizatach płuca, jako surogat peroksydacji lipidów oznaczono stężenia substancji reaktywnych z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Zmierzono w tej tkance stężenie nadtlenuku wodoru, oraz stężenia glutationu i jego disiarczku. Przy pomocy analizy wagowej oszacowano obrzęk płuca, a także zmierzono w niej zawartość czynnika martwicy guza- α (TNF- α). Uzyskane wyniki wskazują na silny pro-oksydacyjny mechanizm działania ET-1 u szczura, prowadzący do obrzęku płuca charakteryzującego się praktycznie dwukrotnym przyrostem masy narządu w ciągu 5 godz. od dożylnego podania endoteliny. Efekt ten był

całkowicie zablokowany, jeśli uprzednio został podany inhibitor kinaz białkowych α i β 1 - Go6976. Kontrolę dodatnią eksperymentu stanowił aktywujący bezpośrednio kinazę białkową C ester mirystylowy forbolu, który spowodował analogiczne zmiany jak ET-1, jednakże ich odwracalność pod wpływem zastosowanego inhibitora PKC była słabsza. Obserwowane zmiany obrzękowe płuca korelowały ze zwiększoną peroksydacją lipidów, mierzoną stężeniem TBARS. Stwierdzono podniesione stężenia nadtlenu wodoru oraz spadek stężenia glutationu przy wzroście stężenia jego disiarczku. Bardzo interesujące się okazało zmniejszenie peroksydacji lipidów, spadek nadtlenu wodoru i korzystny iloraz zredukowanego do utlenionego glutationu po podaniu samego inhibitora Go6976. Wskazuje to na występujące w prawidłowych płucach zjawisko wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu. Z perspektywy klinicznej, zwiększenie stężenia TNF- α w tkance płuca przy aktywacji PKC, czy to pod wpływem ET-1, czy też estru forbolu wskazuje na długofalowe skutki stresu oksydacyjnego, o charakterze prozapalnym.

4. Czwarta z prac włączonych do osiągnięcia naukowego zatytułowana „*The participation of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma*” ukazała się w czasopiśmie *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2017; 94:100-108 (IF=2,759). Jest to praca pogładowa, w której Pani dr Kleniewska jest pierwszym autorem. Habilitantka przedstawiła w tej pracy aktualne poglądy na temat endogennych i środowiskowych źródeł reaktywnych form tlenu oraz antyoksydacyjnych mechanizmów organizmu, które chronią przed ich szkodliwym działaniem. Reaktywne formy tlenu uczestniczą w mechanizmie zapalenia oskrzeli towarzyszącym astmie. Powstają one głównie wskutek nacieków granulocytowych w mechanizmie zależnym od mieloperoksydazy. Prowadzi to do wyczerpania antyoksydacyjnych systemów tkanki płuca i ustroju oraz do zwiększonej wrażliwości na pro-oksydacyjne czynniki zewnętrzne, takie jak dym tytoniowy, tlenki azotu lub ozon. Uznany biomarkerem peroksydacji lipidów błon komórkowych, również w astmie jest malonyldialdehyd. Stwierdzano również zwiększone stężenia nadtlenu wodoru w powietrzu wydychanym. Nieenzymatyczne utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie kwasu arachidonowego, powoduje uwalnianie z błon komórkowych wysoce reaktywnych biologicznie izoprostanów. Mają one działanie prozapalne i wywołują skurcz mięśni gładkich oskrzeli oraz aktywację płytek krwi. W związku z tym, proponowane są interwencje profilaktyczne polegające na wzbogaceniu diety naturalnymi antyoksydantami, w tym roślinnymi związkami polifenolowymi oraz tokoferolami i witaminami A i C. Dowody na skuteczność takiej interwencji są jednak pośrednie i oparte na obserwacjach epidemiologicznych. Być może doświadczenia Habilitantki ze

stosowaniem synbiotyku efektywnie zwiększającego antyoksydacyjne rezerwy ustrojowe posłużą w przyszłości zaplanowaniu badania kliniczno-kontrolnego, które dostarczyłoby bardziej wiarygodnych dowodów na ochronne działanie antyoksydantów w astmie oskrzelowej. Habilitantka jest obecnie kierownikiem projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, w którym na zwierzęcym modelu indukowanej astmy oskrzelowej i/lub otyłości testuje specjalnie zaprojektowaną dietę niskotłuszczową wzbogaconą o probiotyczne bakterie z rodzaju *Lactobacillus*.

Zebrane we wspólne osiągnięcie naukowe cztery publikacje Pani dr Kleniewskiej dotyczą tematu popularnego i o szerokim odbiorze społecznym, jednak nie często podejmowanego w badaniach naukowych. Wynika to z trudności prowadzenia badań kliniczno-kontrolnych dotyczących modyfikacji diety i jej suplementacji. Szczególny problem, praktycznie nierozwiązalny bez zaangażowania przemysłu farmaceutycznego, stanowi przeprowadzenie takich badań z zaślepieniem. Nie udało się to również Habilitantce, czego była świadoma dyskutując wyniki przedstawione w pracach 1 i 2 i podkreślając niewykonalność takiego badania zaślepionego w warunkach otwartych. Obecnie najczęściej w badaniach podstawowych nad probiotykami są wykorzystywane modele zwierzęce. Mają one swoje ograniczenia wynikające z międzygatunkowych różnic mikrobiomu jelitowego, odmiennych mechanizmów zapalnych i modelowego naśladowania chorób człowieka. Dysbiozy, szczególnie flory jelitowej są stanem częstym u człowieka, najczęściej spowodowanym leczeniem antybiotykami, dietą ubogoresztkową i wyjałowioną lub konserwowaną substancjami bakteriostatycznymi. Badania Pani dr Kleniewskiej bardzo dobrze się wpisują w temat oddziaływania środowiskowego na mechanizm chorób nazywanych cywilizacyjnymi, do których należy również astma. Z uznaniem stwierdzam, że posługując się prostym modelem suplementacji dietetycznej oraz niewyszukanymi oznaczeniami laboratoryjnymi uzyskała interesujące wyniki, które opublikowała w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Włączone w osiągnięcie naukowe publikacje, mimo ich co najwyżej dwuletniej obecności w obiegu naukowym są już cytowane, w przypadku pracy 1, 3 i 4 odpowiednio 6 oraz po 4 razy.

W podsumowaniu, moja ocena głównego osiągnięcia naukowego Pani dr Pauliny Kleniewskiej jest pozytywna, uzyskane wyniki są dobrze udokumentowane i zostały opublikowane w dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Pani dr Paulina Kleniewska wykazuje dużą aktywność naukową. Opublikowała łącznie 22 prace, z których 15 się ukazało przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora. Łącznie, publikacje Habilitantki były cytowane 341 razy (Scopus, marzec 2018) a ich współczynnik Hirscha wyniósł 7. Wśród najczęściej cytowanych prac Pani dr Kleniewskiej należy wspomnieć o powstałej przez uzyskanie stopnia doktora przeglądowej pracy dotyczącej potencjału terapeutycznego kwasu liponowego, cytowanej ponad 150 razy.

Pani dr Paulina Kleniewska jest aktualnie kierownikiem projektu Sonata finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Projekt dotyczy wpływu otyłości i stresu oksydacyjnego na astmę oskrzelową. Była kierownikiem dwóch projektów statutowych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Oba projekty dotyczyły stresu oksydacyjnego; roli endoteliny-1 oraz pomiaru markerów stresu oksydacyjnego u chorych na astmę.

Habilitantka jest silnie zaangażowana w działalność dydaktyczną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W latach 2009-2013 prowadziła zajęcia dla studentów kierunków lekarskiego, pielęgniarstwa, ratownictwo medyczne, biotechnologii medycznej oraz analityki medycznej z przedmiotu Fizjologia. Była opiekunem naukowym sześciorga magistrantów kierunku Analityka medyczna. Od roku 2014 pełni funkcję koordynatora ds. Dydaktyki w Katedrze Alergologii, Immunologii i Dermatologii. Prowadzi zajęcia dla studentów z metodologii badań naukowych i prezentacji wyników oraz z chorób wewnętrznych. Była promotorem dwóch prac magisterskich oraz ośmiu prac licencjackich na Wydziale Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego. Sprawuje obecnie również opiekę naukową w realizowanej pracy doktorskiej.

Działalność naukowa Pani dr Pauliny Kleniewskiej była wielokrotnie nagradzana; czterokrotnie przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W ubiegłym roku uzyskała nagrodę Polskiego Towarzystwa Alergologicznego.

Doświadczenia Habilitantki związane ze współpracą międzynarodową są ograniczone. Z powodzeniem prezentowała wyniki swoich badań na dużych kongresach międzynarodowych, recenzowała manuskrypty naukowe nadsyłane do czasopism o zasięgu międzynarodowym. W swoim Autoreferacie wspomniała również o prowadzeniu zajęć z Health policy w Uniwersytecie Clark, jednakże brak szczegółowych danych nie pozwala na ocenę tego aspektu współpracy.

W podsumowaniu stwierdzam, że Habilitantka spełnia w kryteria stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego, ponieważ jej dorobek stanowi znaczący wkład do rozwoju nauki na poziomie międzynarodowym i znajduje odzwierciedlenie we wskaźnikach bibliograficznych stosowanych w naukometrii.

Przedkładając pozytywną recenzję w postępowaniu habilitacyjnym Pani dr Pauliny Kleniewskiej uprzejmie proszę Pana Dziekana o jej uwzględnienie w dalszych etapach przewodu habilitacyjnego.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marek Sanak', written in a cursive style.

Prof. dr hab. n. med. Marek Sanak