

OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr farm. Nazara Michała Smereczańskiego
pt.: „Ocena możliwości wykorzystania ekstraktu z owoców *Aronia melanocarpa* L.
w profilaktyce uszkodzenia nerek przez kadm – badania w modelu doświadczalnym
in vivo” wykonanej w Zakładzie Toksykologii, Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku,
pod kierunkiem Prof. dr hab. n. farm. Małgorzaty Michaliny Brzózka**

Podstawa prawna wykonania recenzji: art. 13 ust.1 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 późniejszymi zmianami) oraz o przepisach zmieniających ustawę- Prawo o szkolnictwie Wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669).

Charakterystyka formalna pracy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr farm. Nazara Smereczańskiego jako podstawa uzyskania stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne stanowi cykl trzech powiązanych tematycznie artykułów tj. dwóch oryginalnych eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej, wszystkich opublikowanych w roku 2023 w recenzowanych czasopismach naukowych tj.: *International Journal of Molecular Sciences* (2 prace) oraz *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* (1 praca). Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF prac tworzących cykl wynosi 11,6, natomiast punktacja MEiN 420, co potwierdza wysoką wartość naukową rozprawy.

Wszystkie prace cyklu doktorskiego są zespołowe, przy czym Doktorant jest ich pierwszym autorem jak również współautorem korespondującym. Zarówno Doktorant, jak i pozostali współautorzy złożyli zgodne oświadczenia potwierdzające, że wkład Pana mgr Nazara Smereczańskiego w ich powstanie był wiodący i możliwy do wyodrębnienia. Wkład oszacowany przez Doktoranta wynosił od 60 do 75% i obejmował zarówno sformułowanie koncepcji badawczej, przegląd i analizę danych literaturowych, jak i kluczowy udział w realizacji części eksperymentalnej i interpretacji wyników, a także miał wiodący udział w przygotowaniu manuskryptów. Wobec bardzo nielicznego zespołu współautorów (od 2 do maksymalnie 4 autorów) jak również bardzo szerokiego zakresu przeprowadzonych badań, deklaracja Doktoranta, określająca Jego wiodący autorski wkład w ich powstanie nie budzi żadnych wątpliwości.

Rozprawa doktorska mgr Nazara Smereczańskiego oprócz reprintów trzech źródłowych artykułów wraz z suplementami zawiera także ich spis wraz z podaniem aktualnej punktacji, syntetyczne wprowadzenie w tematykę rozprawy, logicznie sformułowane cele badawcze pracy, omówienie metod oraz uzyskanych wyników wraz z dyskusją, sześć wniosków końcowych, listę 75 cytowanych pozycji piśmiennictwa, streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, wykaz zastosowanych skrótów oraz zgodę lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach. Tak przygotowany cykl doktorski pod względem merytorycznym jest komplementarny z załączonymi publikacjami.

Wprowadzenie do cyklu wraz z uzasadnieniem podjętej tematyki jest spójne z publikacją I pt. „Current levels of environmental exposure to cadmium in industrialized countries as a risk factor for kidney damage in the general population: A comprehensive review of available data” (*International Journal of Molecular Sciences*, 2023) i świadczy zarówno o znakomitej znajomości przez Doktoranta podjętej tematyki badawczej, jak i o umiejętności wyboru bardzo licznej w tym zakresie literatury. Realizacja zaplanowanych przez Pana mgr Nazara Smereczańskiego celów badawczych pracy doktorskiej jest zgodna z publikacjami eksperymentalnymi: II pt., „The protective potential of *Aronia melanocarpa* L. berry extract against cadmium-induced kidney damage: A study in an animal model of human environmental exposure to this toxic element” (*International Journal of Molecular Sciences*, 2023) oraz publikacją III pt. „Protective effect of the extract from *Aronia melanocarpa* L. berries against cadmium-induced oxidative stress in the kidney: A study in an *in vivo* experimental model. (*Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 2023). Całość pracy doktorskiej zawarta jest w 172 stronach maszynopisu, bardzo starannie przygotowanego i przejrzystego pod względem graficznym, co chciałabym szczególnie podkreślić.

Zgodnie z obranym przez Doktoranta zasadniczym celem pracy doktorskiej było zbadanie na zwierzęcym modelu doświadczalnym czy narażenie na kadm w dawkach stanowiących odpowiednik niskiej i umiarkowanej ekspozycji środowiskowej populacji generalnej może doprowadzić do uszkodzenia nerek, oraz czy ekstrakt z owoców *A. melanocarpa* może działać ochronnie przed uszkodzeniem nerek przez kadm. W kolejnym etapie, Doktorant postanowił także zbadać czy mechanizm uszkodzenia nerek przez kadm ma charakter działania prooksydacyjnego oraz czy potencjalny efekt ochronny na nerkę ekstraktu z owoców *A. melanocarpa* będzie wynikać z jej właściwości antyoksydacyjnych.

Uzasadnienie podjętej tematyki oraz ocena merytoryczna pracy

Zanieczyszczenie środowiska naturalnego przez substancje, które oprócz ewidentnej toksyczności mogą powodować także efekty odległe definiowane jako: działanie mutagenne, genotoksyczne czy też kancerogenne, sprawia, że obserwuje się wzrastający trend zainteresowania suplementami roślinnymi, które mogłyby działać ochronnie. Związki kadmu uważane są od wielu lat za jedno z najgroźniejszych trucizn środowiskowych, na które narażona jest nieświadoma zagrożeń populacja generalna. Doktorant w części wprowadzającej syntetycznie przedstawia kluczowe informacje na temat najważniejszych zagrożeń zdrowotnych w wyniku środowiskowego narażenia na kadm, zwracając uwagę, że już nawet bardzo niskie dawki Cd (narażenie środowiskowe) mogą stwarzać realne ryzyko uszkodzenia nerek, które są uznane za narząd krytyczny. Zagadnienia te w sposób bardzo wyczerpujący Doktorant opisał w załączonej do cyklu pracy poglądowej (publikacja I). Tak więc poszukiwanie łatwo dostępnych związków naturalnych, które byłyby bezpieczne i jednocześnie posiadały udokumentowane właściwości prozdrowotne stanowi bardzo dobre uzasadnienie do podjęcia tematyki pracy doktorskiej przez Pana mgr Nazara Smereczańskiego. Potencjałem takim bez wątplenia charakteryzują się przetwory z owoców aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa* L.), co zostało potwierdzone przez licznych badaczy, w tym także przez Panią Profesor Małgorzatę Brzóska z zespołem, która we wcześniejszych badaniach, jako jedna z pierwszych dowiodła ich ochronne działanie na wątrobę w przypadku ekspozycji na kadm. To protekcyjne działanie *A. melanocarpa*, prawdopodobnie wynika z wysokiego potencjału antyoksydacyjnego rośliny, a także obecności związków polifenolowych, które mogą kompleksować toksyczne jony metali dwuwartościowych takich jak kadm. Praca doktorska mgr Nazara Smereczańskiego jest więc kontynuacją tych badań, przy czym Doktorant postanowił jako pierwszy zbadać ryzyko uszkodzenia nerek u szczurów w wyniku długotrwałego narażenia na kadm drogą pokarmową w niskich dawkach odpowiadających ekspozycji środowiskowej, co należy szczególnie podkreślić. Doktorant postanowił także sprawdzić czy ekstrakt z aronii czarnoowocowej (*A. melanocarpa*) może zabezpieczyć nerki przed toksycznym oddziaływaniem kadmu. Nadmieniam, że badań takich

jak dotąd nie przeprowadzono, co spełnia warunek rozprawy doktorskiej dotyczący rozwiązania nowego problemu naukowego.

Aby ocenić wpływ kadmu podawanego oddzielnie lub łącznie z ekstraktem z owoców *A. melanocarpa* na funkcjonowanie nerek u szczurów narażanych przewlekle na kadm drogą pokarmową (od 3 do aż 24 miesięcy), Pan mgr Nazar Smereczyński musiał właściwie dobrać czułe biomarkery nefrotoksyczności, co zrobił znakomicie, wykazując się dobrą znajomością biochemicznych wskaźników diagnostycznych. Do oceny funkcjonowania kanalików nerkowych wybrał stężenie białka uszkodzenia nerek-1 oraz beta2-mikroglobuliny, aktywność N-acetylo- β -D-glukozaminidazy i fosfatazy alkalicznej, natomiast do oceny funkcji kłębuszków nerkowych: stężenie albuminy i białka całkowitego w moczu, klirens kreatyniny, stężenie mocznika i kwasu moczowego w surowicy i moczu. Badania nefrotoksyczności kadmu u narażanych szczurów zostały uzupełnione o badanie wydalania kadmu z moczem, stężenie kadmu we krwi i w nerkach oraz ocenę struktury histologicznej tego narządu, a także przykładowe markery stanu zapalnego (chemeryna, białko zapalne makrofagów-1 – MIP1a oraz *białko* z rodziny białek Bcl-2 – Bax). Wyniki badań z tego etapu badań Doktoranta są przedstawione w publikacji II. Natomiast w kolejnym etapie badawczym, Doktorant ocenił wpływ kadmu i/lub ekstraktu z owoców aronii na równowagę oksydacyjno - redukcyjną oraz stopień nasilenia stresu oksydacyjnego w nerce mierząc uznane wskaźniki równowagi oksydacyjno – redukcyjnej, w tym wskaźniki enzymatycznej i nieenzymatycznej bariery antyoksydacyjnej, całkowity status antyoksydacyjny – TAS, całkowity status oksydacyjny – TOS czy indeks stresu oksydacyjnego (OSI). Wyniki badań z tego etapu pracy, Doktorant zamieścił w publikacji III. Na szczególne uznanie zasługuje fakt, że dodatkowo Kandydat przeprowadził bardzo liczne analizy zależności pomiędzy oznaczonymi biomarkerami funkcji nerek a markerami stanu zapalnego i równowagą oksydacyjno-redukcyjną w nerce oraz badanymi parametrami a stężeniem kadmu w krwi, moczu i nerce, których wyniki są zawarte w obu pracach eksperymentalnych cyklu (Publikacja II i III).

Prace eksperymentalne (II i III) jak i praca przeglądowa (publikacja I) stanowiące podstawę cyklu doktorskiego stanowią bardzo szerokie opracowania, są zaopatrzone w bogatą dokumentację zebranych danych (załączone suplementy). Badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane na wysokim poziomie naukowym. Metodyka badawcza jak również interpretacja uzyskanych wyników zawarta w publikacjach oryginalnych pod

względem merytorycznym nie budzi żadnych zastrzeżeń, zresztą prace te zostały już wcześniej pozytywnie ocenione przez niezależnych międzynarodowych recenzentów. Ponadto, podjęcie przez Doktoranta trudu przeprowadzenia tak szerokiego zakresu badawczego na modelu zwierzęcym, wymagającym podawania obu badanych związków aż do 24 miesięcy oceniam bardzo wysoko, nie tylko z uwagi na wniesienie istotnych elementów nowości naukowej, ale także na otwierające się dzięki temu dalsze perspektywy badawcze przed Doktorantem. Z toksykologicznego punktu widzenia, za najważniejsze osiągnięcie cyklu doktorskiego uważam, udokumentowanie po raz pierwszy niekorzystnego wpływu kadmu na funkcję i obraz morfologiczny nerek już przy stężeniach tego pierwiastka w moczu szczurów mieszczących się w dolnym przedziale wartości notowanych u populacji generalnej, co niestety wskazuje, że nawet niskie środowiskowe narażenie na Cd może stwarzać potencjalne ryzyko uszkodzenia nerek. Doktorant udowodnił ponadto, że mechanizm działania nefrotoksycznego kadmu jest związany z indukcją zmian zapalnych oraz działaniem prooksydacyjnym prowadzącym do rozwoju stresu oksydacyjnego w nerce, co także należy podkreślić. Kandydat potwierdził jednocześnie ochronny wpływ ekstraktu z owoców aronii także w odniesieniu do działania nefrotoksycznego kadmu, co może zostać w przyszłości praktycznie wykorzystane. Doktorant ostrożnie jednak konkluduje, że zastosowanie produktów aroniowych w profilaktyce zagrożeń dla zdrowia wynikających z narażenia na metale toksyczne takie jak kadm u ludzi wymaga jednak dalszych badań, co świadczy nie tylko o Jego dojrzałości naukowej, ale także potwierdza Jego doskonale przygotowanie do dalszej pracy naukowej. Nie wnoszę uwag krytycznych do rozprawy doktorskiej mgr Nazara Smereczańskiego.

Oprócz trzech prac tworzących cykl doktorski Kandydat jest współautorem także 4 innych artykułów naukowych, a Jego całkowity dorobek wyrażony łącznym współczynnikiem oddziaływania IF wynosi 24,206 (740 pkt MEiN). Wyniki swoich badań Kandydat prezentował także na sześciu krajowych konferencjach naukowych, w tym 3-krotnie Jego prezentacje zajmowały pierwsze i drugie miejsce lub też były wyróżniane przez grona eksperckie. Doktorant odbył liczne szkolenia, w tym naukowe, a także kierował czterema projektami badawczymi (prace własne UMB) oraz brał udział w realizacji czterech dużych projektów finansowanych przez macierzystą Uczelnię. Pan mgr Nazar Smereczański jest również bardzo zaangażowany w działalność organizacyjną na rzecz macierzystej Uczelni oraz legitymuje się dużym doświadczeniem dydaktycznym. Kandydat prowadzi zajęcia z zakresu toksykologii dla

studentów kształcących się praktycznie na wszystkich kierunkach Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku tj. Farmacji, Analityki Medycznej, Kosmetologii, Ratownictwa Medycznego, Dietetyki, Zdrowia Publicznego oraz kierunku Lekarskiego, w tym również w języku angielskim dla studentów zagranicznych kierunku lekarskiego Medical Faculty.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Nazara Smereczańskiego pt. „Ocena możliwości wykorzystania ekstraktu z owoców *Aronia melanocarpa* L. w profilaktyce uszkodzenia nerek przez kadm – badania w modelu doświadczalnym *in vivo*” **stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dyscyplinie nauki farmaceutyczne** spełniając w pełni formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

Wnoszę więc do **Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku** o dopuszczenie Pana mgr farm. Nazara Smereczańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na bardzo szeroki zakres wykonanej pracy badawczej, co przekłada się na wysoką wartość merytoryczną opublikowanych badań, potwierdzoną wysokim współczynnikiem oddziaływania cyklu doktorskiego (IF=11,6), a także uwzględniając całokształt dorobku Doktoranta **wnoszę do Wysokiego Senatu o wyróżnienie rozprawy.**