

Poznań, 30. 08. 2023 r.

Prof. dr hab. n. farm. Barbara Zielińska-Psuja
Katedra i Zakład Toksykologii
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Recenzja pracy doktorskiej
magistra farmacji **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.

Promotor: prof. dr hab. n. med. Małgorzata Michalina Brzóska

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego tematycznie opracowania w oparciu o cykl 3 trzech artykułów opublikowanych w 2023 roku w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym o łącznym współczynniku IF wynoszącym 11,6 i punktacji MEiN równej 420. W skład cyklu wchodzi: jedna praca przeglądowa (1) oraz dwie prace oryginalne (2,3):

1. *Current levels of environmental exposure to cadmium in industrialized countries as a risk factor for kidney damage in general population: A comprehensive review of available data.*
2. *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.*
3. *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.*

Dwie prace zostały opublikowane w *International Journal of Molecular Sciences*, trzecia natomiast w *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. We wszystkich trzech publikacjach, Doktorant jest pierwszym autorem a Jego udział w powstawaniu niniejszych prac, według oświadczeń autora i współautorów, jest przeważający i wynosi od 60 do 75%.

Integralną częścią przedłożonej rozprawy doktorskiej jest maszynopis pracy liczący 172 strony, w którym poza trzema publikacjami stanowiącymi podstawę rozprawy doktorskiej, zawarto typowe dla tego rodzaju dysertacji rozdziały uzupełniające, w tym: 1. „Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej”, 2. „Wprowadzenie”, 3. „Cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej”, 4. „Realizacja celów naukowych, zwięzłe omówienie materiałów i metod badawczych, wyniki badań, podsumowanie i dyskusja....”, 5. „Wnioski”, 6. „Skróty zastosowane w rozprawie doktorskiej”, 7. „Literatura”, 8. „Streszczenie w języku polskim”, 9. „Streszczenie w języku angielskim”, 10. „Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej”, 11. „Zgoda Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach z 2009 r.”, 12. „Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej”, 13. „Oświadczenia współautorów”. W rozdziale 14. kończącym rozprawę doktorską mgr farm. Nazar M. Smereczański zaprezentował swój dorobek naukowy, dydaktyczny i organizacyjny.

W rozdziale „Wprowadzenie”, dokonano przeglądu aktualnego piśmiennictwa dotyczącego rośliny *Aronia melanocarpa* oraz występujących w niej substancji wykazujących wielokierunkowe działania prozdrowotne i możliwości wykorzystania tej rośliny w profilaktyce i ograniczeniu niekorzystnych skutków w następstwie ekspozycji na ksenobiotyki charakteryzujące się różnymi mechanizmami toksycznego działania. Kadm (Cd) jest jednym z najbardziej toksycznych metali niemających funkcji biologicznej i donoszono o jego akumulacji w organizmach żywych. Nerki są narządem docelowym w przypadku toksyczności kadmu; zaobserwowano, że Cd powoduje uszkodzenie nerek nawet przy niskich stężeniach, a uszkodzenie Cd może szybko przekształcić się w przewlekłą chorobę nerek. W rozdziale tym zawarto również informacje dotyczące środowiskowego narażenia populacji generalnej na kadmu i jego związki w kontekście możliwości szkodliwego działania na wiele narządów i układów, w tym wielokierunkowy wpływ na nerki i mechanizmy odpowiedzialne za jego nefrotoksyczność. Zagadnienia te przedstawiono w pierwszej z wchodzących w skład cyklu publikacji pracy pogładowej pt. *Current levels of environmental exposure to cadmium in industrialized countries as a risk factor for kidney damage in general population: A comprehensive review of available data*. W dalszej części dysertacji (rozdział 3) uzasadniono cel badań podjętych w ramach

rozprawy doktorskiej. Dokonano przeglądu aktualnych wyników badań wskazujących na korzystne oddziaływanie przetworów z owoców aronii czarnoowocowej w przeciwdziałaniu i ograniczaniu negatywnych skutków działania kadmu z uwagi na wysoki potencjał antyoksydacyjny oraz wysoką zawartość związków polifenolowych, które mogą kompleksować jego dwuwartościowe jony. Postawiono hipotezę badawczą zakładając, że przewlekłe narażenie na niskie stężenia kadmu może skutkować uszkodzeniem narządu tarczowego, jakim są dla niego nerki, a podawanie ekstraktu z owoców aronii czarnoowocowej może ograniczać lub niwelować jego toksyczne działanie. Ponadto określono cele szczegółowe podjętych badań. Do weryfikacji postawionej hipotezy badawczej zastosowano, opisany w rozdziale 4, zwierzęcy model doświadczalny, odzwierciedlający przewlekłą niską i umiarkowaną ekspozycję populacji generalnej na kadm przez kolejne lata życia człowieka i obejmujący ocenę stężenia kadmu oraz markerów uszkodzenia kanalików (KIM-1, β 2-MG, NAG, ALP) i kłębuszków (ACR, PCR), a także podstawowych wskaźników czynności nerek. Uzupełnieniem badań laboratoryjnych jest ocena histopatologiczna nerek. W celu oceny protekcyjnego działania ekstraktu z owoców aronii czarnoowocowej, zwierzętom narażonym na kadm podawano handlowy standaryzowany ekstrakt zawierający związki polifenolowe (65,74%) i antocyjany (18,65%) w stężeniach kilkakrotnie wyższych od przeciętnie spożywanych w populacji generalnej. W zwierzęcym modelu doświadczalnym oceniono u samic szczurów narażonych na kadm wpływ ekstraktu z aronii czarnoowocowej na funkcję nerkowych kanalików i kłębuszków, strukturę morfologiczną tego narządu, wydalanie kadmu z moczem oraz wybrane parametry stanu zapalnego w nerce, jako jednego z mechanizmów nefrotoksycznego działania. Do oceny stanu zapalnego wykorzystano takie markery jak: stężenie chemeryny, stężenie białka zapalnego makrofagów-1-alfa oraz stężenie białka z rodziny białek Bcl-2. Schemat modelu doświadczalnego wraz z zakresem wykonanych badań w ramach rozprawy doktorskiej przedstawiono w manuskrypcie na ryc. 3. W tym miejscu recenzentowi nasuwa się pytanie, - „Jakie było uzasadnienie prowadzenia badań doświadczalnych z wykorzystaniem tylko jednej płci zwierząt to jest samic?”.

W rozdziale 4 rozprawy doktorskiej zamieszczono również szczegółowe wyniki dotyczące oceny wpływu niskiego i umiarkowanego narażenia na kadm, pojedynczo lub łącznie z podawaniem ekstraktu z owoców aronii na strukturę i funkcje nerek oraz stężenie kadmu w moczu oraz biomarkery stanu zapalnego w tym narządzie, które podsumowano w tabelach 3 - 6 manuskryptu oraz przedstawiono w drugiej z publikacji 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.

Innym z mechanizmów nefrotoksycznego działania kadmu są zaburzenia oksydacyjno-redukcyjne prowadzące do rozwoju stresu oksydacyjnego, którym poświęcono kolejną część badań. Oceniono wpływ kadmu oraz ekstraktu z owoców aronii w opisanym powyżej modelu zwierzęcym na nerkowy całkowity status antyoksydacyjny, aktywność enzymów antyoksydacyjnych i stężenie antyoksydantów nieenzymatycznych, stan oksydacyjny oraz indeks stresu oksydacyjnego oznaczone przy użyciu dostępnych testów komercyjnych. Wyniki uzyskane w tej części pracy doktorskiej przedstawiono w trzeciej z publikacji 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* oraz zaprezentowano w tabeli 7 manuskryptu. W publikacji tej dokonano również całościowej oceny zależności pomiędzy stężeniem kadmu w krwi, moczu i nerce oraz parametrami funkcji nerek, stanu zapalnego oraz równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w tym narządzie. Wyniki badań uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej poddano ocenie statystycznej. W rozdziale 4 zamieszczono również podrozdział „Podsumowanie i dyskusja”, w którym zwięźle przedyskutowano uzyskane wyniki badań. Szczegółowa dyskusja została zawarta w trzeciej z publikacji wchodzących w skład cyklu rozprawy doktorskiej. Na podstawie uzyskanych wyników badań przeprowadzonych wykazano, że zarówno przewlekłe narażenie szczurów na niskie jak i umiarkowane stężenia kadmu prowadzi do dysfunkcji nerek a indukowane przez kadm uszkodzenia kanalików nerkowych poprzedzają zmiany w obrębie kłębuszków. Nie mogę się jednak całkowicie zgodzić z Doktorantem, że badania z wykorzystaniem modelu eksperymentalnego są pierwszymi, w których oceniano mechanizmy wpływu kadmu na nerki. Zagadnienia te są poruszane również w pracy opublikowanej w 2021 roku Yan L-J i Allen DC (*Biomolecules* 2021,11,1575). Bezspornie precedensowe są badania, w których Doktorant wykazał ochronne działanie przetworów z aronii czarnoowocowej w odniesieniu do nefrotoksycznego narażenia na niskie i wysokie stężenia kadmu. Pomimo, że na obecnym etapie badań nie udało się w pełni wyjaśnić mechanizmów odpowiedzialnych za działanie ochronne ekstraktów z aronii, charakteryzujących się właściwościami antyoksydacyjnymi, przeciwzapalnymi, przeciwapoptycznymi i antyproliferacyjnymi, przeprowadzone badania stanowią bogate źródło informacji dotyczących środowiskowego narażenia populacji generalnej na kadm a szczególnie na narząd krytyczny jakim są nerki i mają istotne znaczenie dla rozwoju toksykologii eksperymentalnej. Uzyskane wyniki badań mają nie

tylko wartość naukową, ale również posiadają aspekt praktyczny szczególnie z uwagi na możliwość wykorzystania ekstraktów z aronii w profilaktyce nefrotoksycznego działania kadmu. Ponadto wpisują się w nurt badań od wielu lat prowadzonych przez promotora pracy prof. dr hab. Małgorzatę Brzósę. W rozdziale 5. Wnioski, Doktorant ujął najistotniejsze wyniki swoich badań w sześciu wnioskach. Kolejny rozdział - 6. Obejmuje wykaz skrótów stosowanych w monografii. W rozdziale 7. Literatura zamieszczono 75 pozycji piśmiennictwa, których dobór świadczy o dojrzałości naukowej doktoranta, dużym zainteresowaniu przedmiotem badań oraz doskonałym poruszaniu się w tematyce. Osobiście, zmieniałabym tytuł tego rozdziału z „Literatura” na „Piśmiennictwo” lub „Bibliografia”, gdyż pojęcie „literatura” kojarzy się głównie z utworami epickimi mającymi wartość artystyczną, a więc powieściami, dramatami, wierszami itp. a nie z pracami naukowymi. W spisie piśmiennictwa nie znalazłam pracy opublikowanej przez Ziyin Li i wsp. (Arch Toxicol, 2021, Nov,95(11):3497-3513), w której autorzy opisują indukowane przez kadm zmiany zapalne w nerkach w następstwie aktywacji inflamasomu NLRP₃, a więc zmiany dotyczące mechanizmu nefrotoksycznego działania kadmu rozważanego przez Doktoranta. Kolejne dwa rozdziały 8 i 9 stanowią streszczenia w języku polskim i języku angielskim, których układ i treść nie odbiegają od ogólnie przyjętego schematu. Doktorant wprowadza czytelnika w tematykę badań, wskazuje hipotezę badawczą i cel pracy, charakteryzuje zastosowane metody badawcze a następnie uzyskane wyniki badań. Kompatybilną częścią dysertacji jest rozdział 10, w którym zamieszczono kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W rozdziale 11, zamieszczono kopię zgody LKE z 2009 r. - (Dołączona do rozprawy zgoda LKE dotyczy oceny zastosowania związków polifenolowych z *Aronia melanocarpa* w zapobieganiu uszkodzeniom układu kostnego w warunkach chronicznej ekspozycji na kadm - badania w modelu doświadczalnym *in vivo*. Fakt wykorzystania tej zgody w badaniach prowadzonych przez Doktoranta powinien być wyjaśniony i uzasadniony). Rozdziały 12 i 13 zawierają oświadczenia autora i współautorów rozprawy doktorskiej. Kończący monografię rozdział 14 „Dorobek naukowy i organizacyjny” pozwala na zapoznanie się z sylwetką ogólną Doktoranta.

Podsumowując, Doktorant w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej pt. „Ocena możliwości wykorzystania ekstraktu z owoców *Aronia melanocarpa* L. w profilaktyce uszkodzenia nerek przez kadm - badania w modelu doświadczalnym *in vivo*” wykazał się umiejętnością stawiania hipotezy badawczej, celu badań i konsekwencją w ich realizacji

oraz wyciągania właściwych wniosków. Na podkreślenie zasługuje opanowanie nowoczesnego warsztatu badawczego oraz skrupulatność w realizacji poszczególnych etapów badań. Ogromną zaletą pracy zasługującą na szczególną uwagę jest niezwykle staranna strona edytorska maszynopisu, dobry język polski, wysoka jakość dokumentacji tabelarycznej i graficznej. Drobne uwagi zamieszczone w recenzji nie umniejszają wysokiej oceny merytorycznej przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Nazara Michała Smereczańskiego dotyczy aktualnej problematyki badawczej, stanowi znaczącą pozycję naukową i przyczynia się do rozwoju nauk farmaceutycznych spełniając warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z uwzględnieniem zmian wprowadzonych ustawą z dnia 13.1. 2023 r. (Dz.U. z 2023 r. poz. 212). W związku z powyższym wnioskuję do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Nazara Michała Smereczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne.