

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Mężyńskiej pt.:

„Wpływ ekstraktu z owoców aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa* L.) na stan oksydacyjno – redukcyjny i uszkodzenia oksydacyjne wątroby w modelu doświadczalnym *in vivo* odpowiadającym niskiej i umiarkowanej ekspozycji chronicznej człowieka na kadm”

Praca została wykonana w Zakładzie Toksykologii, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem promotora prof. dr hab. n. med. Małgorzaty Michaliny Brzośki.

Przedstawiona do recenzji praca została przygotowana w oparciu o monotematyczny cykl 4 publikacji opublikowanych w renomowanych czasopismach z listy JCR o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF równym 14,101 oraz punktacji MNiSW równej 130 pkt., w tym **dwóch prac oryginalnych**: **1)** Mężyńska M., Brzośka M. M., Rogalska J., Piłat-Marcinkiewicz B.: Extract from *Aronia melanocarpa* L. berries prevents cadmium-induced oxidative stress in the liver: a study in a rat model of low-level and moderate lifetime human exposure to this toxic metal. *Nutrients*, 2019; 11: 21 (IF: 4,196); **2)** Mężyńska M., Brzośka M. M., Rogalska J., Galicka A.: Extract from *Aronia melanocarpa* L. berries protects against cadmium-induced lipid peroxidation and oxidative damage to proteins and DNA in the liver: a study in a rat model of environmental human exposure to this xenobiotic. *Nutrients*, 2019; 11: 758 (IF:4,196) oraz **dwóch prac przeglądowych**: **1)** Mężyńska M., Brzośka M.M.: Environmental exposure to cadmium – a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2018; 25 (IF:2,8); **2)** Mężyńska M., Brzośka M. M.: Review of polyphenol-rich products as potential protective and therapeutic factors against cadmium hepatotoxicity. *J. Appl. Toxicol.*, 2019; 39 (IF:2,909).

We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a Jej wiodący udział w powstaniu poszczególnych prac wynosi odpowiednio: nie mniej niż 60% w przypadku prac oryginalnych oraz nie mniej niż 70% w przypadku prac przeglądowych, co zostało potwierdzone przez pozostałych współautorów.

Rozprawa doktorska - oprócz wymienionych artykułów (rozdziały 4-7) - zawiera syntetyczne wprowadzenie do podjętej tematyki (rozdział 1), założenia i cel pracy (rozdział 2), metodykę badań (rozdział 3), dyskusję (rozdział 8), wnioski (rozdział 9), a także streszczenie pracy w języku polskim (rozdział 10) i angielskim (rozdział 11). Dodatkowo jako suplement (rozdział 12) Doktorantka zamieściła opis swojego dorobku naukowego, w tym: spis pozostałych publikacji naukowych oraz listę doniesień konferencyjnych, a także swój życiorys. Całość tych materiałów obejmuje łącznie 184 strony maszynopisu i stanowi spójną



dokumentację przygotowaną w sposób bardzo czytelny i jednocześnie opatrzone jest ładną szatą graficzną.

Ocena rozprawy

Niezamierzona, całonocowa ekspozycja środowiskowa populacji generalnej na metale toksyczne od wielu lat stanowi zagrożenia priorytetowe. Do metali uznanych za szczególnie niebezpieczne dla ludzi z pewnością należy kadm (Cd), o czym świadczy fakt, że umieszczono go na 7 pozycji listy substancji chemicznych należących do najbardziej niebezpiecznych zanieczyszczeń środowiskowych. Całonocowa ekspozycja na kadm skutkuje jego kumulacją w ustroju, co niestety prowadzi do nieprzewidywalnych następstw zdrowotnych, w tym niepożądanym działaniem na różne narządy. Oznacza to, że nie można wykluczyć także działania toksycznego kadmu na wątrobę. Wątroba jest jednym z głównych miejsc kumulacji i detoksykacji różnych groźnych ksenobiotyków (w tym także kadmu) i z tego powodu może być obciążona zwiększonym ryzykiem jej uszkodzenia. Mechanizm działania toksycznego kadmu jest z pewnością wielokierunkowy, ale w ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę na potencjalne konsekwencje wynikające z jego działania prooksydacyjnego. Kadm pośrednio indukuje stres oksydacyjny, co skutkuje uszkodzeniem kluczowych makrocząsteczek komórkowych i prowadzi do działania układowego. Dotychczasowy stan wiedzy na temat efektów zdrowotnych u ludzi narażonych środowiskowo na kadm wskazuje, że za narządy krytyczne uznaje się przede wszystkim nerki oraz układ kostny. W części wprowadzającej dysertacji Doktorantka przedstawiła możliwe konsekwencje dla zdrowia populacji generalnej ekspozowanej środowiskowo na Cd, w tym związane z działaniem nowotworowym. Z zebranego i przedstawionego w tej części rozprawy piśmiennictwa (w tym również badań epidemiologicznych) wynika, że pojawiają się już pierwsze doniesienia o możliwym niekorzystnym oddziaływaniu kadmu na wątrobę w przypadku ekspozycji środowiskowej. Ponieważ udowodniono, że metal ten hamuje mechanizmy naprawcze DNA, nie można wykluczyć działania hepatotoksycznego na drodze zakłóconej apoptozy lub nekrozy komórek wątrobowych, co w konsekwencji może prowadzić do zaburzenia funkcji tego narządu. Tym bardziej tematyka pracy podjęta przez Doktorantkę jest w pełni uzasadniona.

Podstawą sformułowania celu badawczego pracy doktorskiej mgr Magdaleny Mążyńskiej było założenie, że należy poszukiwać skutecznych metod zapobiegających skutkom toksyczności kadmu poprzez wdrożenie działań profilaktyczno-prewencyjnych. Doktorantka założyła, że podawanie antyoksydantów w diecie może działać protekcyjnie na wątrobę i chronić przed prooksydacyjnym działaniem kadmu. Powyższe przypuszczenia wynikają również z doświadczenia wieloletnich badań promotora pracy - Pani prof. Małgorzaty Michaliny Brzózki, która jest uznanym autorytetem w tej dziedzinie. Zespół Pani Profesor potwierdził eksperymentalnie między innymi, że podawanie bogatego w związki

polifenolowe ekstraktu z owoców aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa* L.) istotnie zmniejsza kumulację kadmu w organizmie, w tym także w wątrobie. W publikacji przeglądowej nr 2, będącej składową pracy doktorskiej, Doktorantka bardzo skrupulatnie opisała korzystne antyoksydacyjne działanie związków polifenolowych, których bogate źródło stanowią różne produkty roślinne w tym także owoce aronii (*Aronia melanocarpa*). Autorka zwraca w tej pracy uwagę, że związki polifenolowe swoje właściwości zawdzięczają obecności grup hydroksylowych (-OH) zdolnych do kompleksowania jonów metali o działaniu prooksydacyjnym, a także bezpośredniej zdolności do inaktywacji wolnych rodników (FR) i reaktywnych form tlenu (ROS). Można więc uznać, że związki polifenolowe będą także chronić przed hepatotoksycznym działaniem kadmu. Aby zweryfikować słuszność tej hipotezy, Doktorantka zaplanowała badanie eksperymentalne mające na celu sprawdzenie, czy podawanie samicom szczura Wistar ekstraktu z owoców aronii podczas niskiej i umiarkowanej ekspozycji na kadm będzie chroniło przed indukcją stresu oksydacyjnego w wątrobie. Aby zweryfikować poprawność postawionej hipotezy Doktorantka zaproponowała cztery cele szczegółowe obejmujące: **1)** ocenę wpływu niskiej i umiarkowanej ekspozycji na kadm na stan oksydacyjno-redukcyjny i stopień uszkodzeń oksydacyjnych makrocząsteczek komórkowych (lipidy, białka i DNA) oraz obraz morfologiczny wątroby; **2)** zbadanie wpływu długotrwałego podawania ekstraktu z owoców *Aronia melanocarpa* na stan oksydacyjno-redukcyjny i obraz morfologiczny wątroby w warunkach narażenia na jedynie śladowe ilości kadmu, wynikające z jego, trudnej do uniknięcia, obecności w diecie; **3)** stwierdzenie, czy podawanie ekstraktu z owoców aronii czarnoowocowej podczas niskiej i umiarkowanej ekspozycji chronicznej na kadm chroni przed rozwojem stresu oksydacyjnego i zapobiega uszkodzeniom oksydacyjnym lipidów, białek i DNA w wątrobie oraz zmianami patologicznymi w obrazie morfologicznym tego narządu; **4)** wyjaśnienie potencjalnych mechanizmów ochronnego wpływu ekstraktu z owoców aronii na stan oksydacyjno-redukcyjny oraz makrocząsteczki komórkowe i strukturę morfologiczną wątroby w warunkach narażenia na kadm. Badania zostały przeprowadzone na modelu zwierzęcym: samicach szczura szczepu Wistar, którym kadm podawano w paszy w stężeniu 1 lub 5 mg Cd/kg oddzielnie lub łącznie z 0,1% wodnym ekstraktem z owoców *Aronia melanocarpa* przez okres 3, 10, 17 lub 24 miesięcy. Aby zrealizować tak zróżnicowane cele szczegółowe Doktorantka przeprowadziła bardzo szeroki panel oznaczeń biochemicznych, których wyniki zostały opublikowane w dwóch pracach oryginalnych (publikacja 3 i 4). Aby ocenić stan antyoksydacyjny wątroby Doktorantka badała: aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych (takich, jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx) oraz reduktaza glutationowa (GR)); stężenie S-transferazy glutationowej (GST); stężenia antyoksydantów nieenzymatycznych (tj. glutation zredukowany (GSH), tioredoksyna (Trx) i całkowite grupy –SH) oraz całkowity status antyoksydacyjny (TAS). Stan oksydacyjny wątroby został oceniony na podstawie oznaczeń: stężenia nadtlenu wodoru (H₂O₂); stężenia glutationu utlenionego

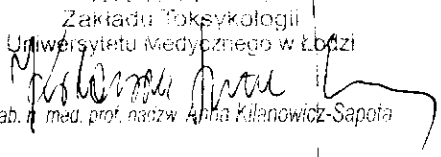
(GSSG) oraz wyliczonego stosunku GSH/GSSG; stężenia oksydazy ksantynowej (XOD) i mieloperoksydazy (MPO), a także całkowitego statusu oksydacyjnego (TOS). Stopień uszkodzeń oksydacyjnych makrocząsteczek komórkowych w wątrobie obejmował: lipidy błon komórkowych i wewnątrzkomórkowych – co zostało wyrażone stężeniem nadtlenników lipidów (LPO), dialdehydu malonowego (MDA) oraz 8-izoprostanu; w przypadku białek – oznaczono stężenie białkowych grup karbonylowych (PC) i 3-nitrotyrozyny (3-NT); w przypadku zmian DNA oznaczono stężenie 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (8-OHdG). Dodatkowo, aby potwierdzić potencjalną hepatotoksyczność, Doktorantka oznaczyła aktywności wskaźnikowych enzymów wątrobowych z grupy aminotransferaz: alaninowej (ALT) i asparaginianowej (AST) w surowicy, a także za pomocą badania histologicznego oceniła zmiany morfologiczne w wątrobie. Na szczególną uwagę zwraca wykonana przez Doktorantkę ocena ekspresji matrycowego kwasu rybonukleinowego (mRNA) metalotionein: 1 (MT1) i 2 (MT2) w wątrobie.

Jakkolwiek w literaturze można znaleźć prace, w których wykazano, że narażenie zwierząt doświadczalnych na kadm w dawkach toksycznych (na ogół ekspozycja ostra) prowadzi do zwiększonego powstawania wolnych rodników i reaktywnych form tlenu, co pośrednio indukuje stres oksydacyjny w wątrobie, co Doktorantka omówiła w pracach przeglądowych (publikacja 1 i publikacja 2), to praktycznie brak jest takich badań przeprowadzonych na modelu odzwierciedlającym rzeczywiste narażenie populacji generalnej na kadm, co w mojej ocenie bardzo podnosi wartość aplikacyjną pracy. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki, mogą zostać praktycznie wykorzystane do szacowania ryzyka zdrowotnego populacji generalnej. Na podkreślenie zasługuje także wybór zastosowanego przez Doktorantkę modelu doświadczalnego, tj. samic szczurów szczepu Wistar. Badania ostatnich lat potwierdzają, że w przypadku narażenia środowiskowego na kadm, to kobiety, u których w ustroju stwierdza się istotnie wyższe poziomy kadmu w porównaniu do mężczyzn, są uznane za grupę zwiększonego ryzyka na działanie toksyczne kadmu. To konsekwentne w każdym szczególe, wzorcowe zaplanowanie badań z udziałem zwierząt, a następnie ich realizacja, która wymagała opanowania nie tylko szerokiego pakietu metod biochemicznych, ale także znajomości technik preparacji materiału biologicznego, świadczą o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktorantki. Z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że Doktorantka zrealizowała wszystkie zaplanowane przez siebie cele badawcze. Wyniki uzyskane w pracy doktorskiej zostały przez Nią i wsp. opublikowane jako dwie prace oryginalne w bardzo dobrym, renomowanym czasopiśmie, co oznacza, że przeszedł skrupulatny proces recenzji i zyskały uznanie ekspertów międzynarodowych. Chciałabym także podkreślić, że bez wątpienia najważniejszym osiągnięciem pracy doktorskiej jest wykazanie, że podawanie 0,1% ekstraktu z owoców aronii w warunkach niskiej i umiarkowanej ekspozycji na kadm zapobiega rozwojowi stresu oksydacyjnego i chroni przed uszkodzeniami oksydacyjnymi w wątrobie, a tym samym potwierdza hepatoprotekcyjny wpływ ekstraktu. Drugim równie istotnym osiągnięciem (szczególnie

w badaniach toksykologicznych) jest wykazanie, prawdopodobnie po raz pierwszy, że kadm może uszkadzać wątrobę już przy tak niskim poziomie narażenia (tj. po podaniu w dawce 1 mg Cd/kg paszy). Oznacza to, że wątroba - podobnie, jak nerki i układ kostny - może być narządem docelowym w przypadku ekspozycji środowiskowej populacji generalnej na kadm. Na uznanie zasługuje także fakt, że Autorka uzyskane wyniki z dużą swobodą potrafi konfrontować na tle piśmiennictwa światowego, nie tracąc przy tym krytycyzmu, co świadczy nie tylko o dojrzałości naukowej, ale także potwierdza Jej doskonałe przygotowanie do dalszej pracy naukowej. Pracę doktorską kończy rozdział „Wnioski”, w którym Doktorantka przedstawiła pięć prawidłowo i logicznie sformułowanych wniosków.

Podsumowując, praca doktorska Pani mgr analityki medycznej Magdaleny Mężyńskiej pt. **„Wpływ ekstraktu z owoców aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa* L.) na stan oksydacyjno-redukcyjny i uszkodzenia oksydacyjne wątroby w modelu doświadczalnym *in vivo* odpowiadającym niskiej i umiarkowanej ekspozycji chronicznej człowieka na kadm”** stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jak również wnosi istotny aspekt nowości w ramach rozwoju toksykologii doświadczalnej jako dyscypliny naukowej. Recenzowana praca w pełni spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim wynikające z art. 16 ust. 2 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 późn. zm.), dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Białymstoku o dopuszczenie mgr Magdaleny Mężyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wysoki poziom merytoryczny pracy, szeroki zakres wykonanych badań, których wyniki zostały opublikowane jako dwie publikacje oryginalne w renomowanym czasopiśmie z bazy JCR (Nutrients) o sumarycznym IF=8,39 wnoszę do Wysokiej Rady wniosek formalny o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK
Zakładu Toksykologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

dr hab. n. med. prof. naczw. Anna Kilanowicz-Sapota