



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Toksykologii

Kierownik: prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

**„Wpływ ekstraktu z owoców aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa* L.)
na metabolizm cynku i miedzi w organizmie szczura narażonego przewlekłe na kadm”,
wykonanej przez Panią mgr Sylwię Borowską,
pod kierunkiem Promotora, Pani prof. dr hab. n. med. Małgorzaty Michaliny Brzóska,
w Zakładzie Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny
Laboratoryjnej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.**

Przedłożona do recenzji dysertacja dotyczy wielopłaszczyznowej oceny wpływu ekstraktu z owoców aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa* L.) na metabolizm dwóch ważnych dla homeostazy organizmu biopierwiastków - cynku i miedzi, u zwierząt doświadczalnych narażonych przewlekłe na kadm. Podjęte badania modelowe, mające odzwierciedlać przewlekłe narażenie organizmu ludzkiego na ten ksenobiotyk, z uwagi na wciąż nie do końca oszacowane rzeczywiste narażenie na zanieczyszczenia chemiczne, w tym również związki kadmu, są bardzo aktualne. Kadm i jego związki charakteryzują się stosunkowo dużą trwałością w środowisku, silnymi właściwościami kumulacyjnymi w tkankach i narządach, zdolnościami do interakcji w różnych układach biologicznych, oraz działaniem toksycznym na organizm ludzki, nawet w niskich stężeniach. Pierwiastek ten został umieszczony przez ekspertów IARC w pierwszej grupie czynników o udowodnionym epidemiologicznie działaniu rakotwórczym na ludzi.

Wydawałoby się, iż problem przewlekłego narażenia na kadm obecnie nie stanowi zagrożenia w populacji ogólnej, to jednak dane z piśmiennictwa wskazują, iż gwałtowny rozwój cywilizacyjny, urbanizacja czy uprzemysłowienie może często prowadzić do

znacznego stopnia zanieczyszczenia środowiska naturalnego i niekorzystnego działania na organizm ludzki. W tym aspekcie badania Pani mgr Sylwii Borowskiej, w zaproponowanym modelu doświadczalnym są autorskie i interesujące. Ocenę działania protekcyjnego ekstraktu etanolowego z *Aronia melanocarpa* w narażeniu przewlekłym na kadm oraz oszacowanie potencjalnie niekorzystnego wpływu ekstraktu przy długotrwałym jego podawaniu na metabolizm jonów cynku i miedzi oraz na zmiany stężenia metalotioneiny uznaję za trafne i interesujące, zwłaszcza, że brak jest badań w tak zaprojektowanym modelu doświadczalnym. Zmiany stężenia jonów cynku i miedzi w organizmie mogą być indukowane obecnością jonów kadmu, z drugiej strony, biopierwiastki te są aktywnymi biochemicznie antagonistami tego ksenobiotyku, uważam zatem podjęty przez Doktorantkę temat badawczy za aktualny i w pełni uzasadniony, a sformułowane hipotezy badawcze za trafne i zgodne z kierunkiem współczesnych trendów badań epidemiologiczno-toksykologicznych.

Należy podkreślić, iż tematyka ocenianej rozprawy doktorskiej doskonale wpisuje się w zakres badań prowadzonych przez Panią Profesor Małgorzatę Brzósę, promotora rozprawy doktorskiej, w Zakładzie Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Pani Promotor jest uznanym Ekspertem w dziedzinie toksykologii. Dzięki Jej wiedzy i doświadczeniu, oraz przy ogromnym zaangażowaniu Doktorantki, mogła powstać tak znakomita rozprawa. Na znaczący udział Pani mgr wskazują oświadczenia dotyczące jej udziału procentowego w powstawaniu manuskryptów prac stanowiących ocenianą dysertację (nie mniej niż 65-70%). Również informacje zawarte w załączonych do rozprawy dokumentach (życiorys naukowy) wskazują na ogromne zaangażowanie i duży potencjał naukowy Pani mgr Sylwii Borowskiej. W krótkim okresie (lata 2015-2017) była Ona kierownikiem 3 projektów badawczych, finansowanych ze środków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Ponadto Pani mgr, poza autorstwem 3 głównych prac stanowiących rozprawę doktorską, jest autorem i współautorem 3 innych publikacji o łącznej punktacji MNiSW = 70 i współczynniku wpływu IF = 5,958, ponadto jednego rozdziału w książce oraz 8 doniesień zjazdowych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest cyklem 3 monotematycznych prac, 2 przeglądowych i 1 eksperymentalnej, opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, takich jak: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *Current Drug Targets* oraz *Nutrients*, znajdujących się na tzw. liście filadelfijskiej, które ukazały się w ostatnich trzech latach (2016-2018). Ich łączny współczynnik oddziaływania (IF) wynosi **12,76**, zaś punktacja MNiSW to **120** punktów. We wszystkich tych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a liczba wszystkich współautorów nie

przekracza 4. Dwie z prac wchodzących w ww. cykl publikacji, są to bardzo obszerne prace przeglądowe, powstałe w oparciu odpowiednio o 326 i 219 pozycje literaturowe, pochodzące w ponad 60% z ostatnich 10-ciu lat (notabene, w piśmiennictwie nr 155 w drugiej publikacji brak jest roku jej opublikowania). Trzecia z prac cyklu, jest oryginalnym osiągnięciem badawczym, w którym Doktorantka szczegółowo przedstawiła przeprowadzone badania, zobrazowała je w 5 tabelach i na 12 rycinach, oraz odpowiednio odniosła uzyskane wyniki do danych światowych, wykorzystując 58 pozycji piśmiennictwa, pochodzących również w większości (67%) z ostatnich 10-ciu lat. Pozycja ta jest wzbogacona *Supplementary Materials*, zawierające dodatkowo 14 tabel i 5 rycin. Chciałabym wyrazić uznanie w stosunku do przejrzystości i spójności przedstawianych przez Panią mgr zagadnień badawczych w stanowiących trzon dysertacji publikacjach pełnotekstowych, zarówno aspektów eksperymentalnych jak i ich podstaw teoretycznych. Jest to rzadko spotykana na tym etapie rozwoju naukowego umiejętność i świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki oraz swobodzie poruszania się w obszarze prowadzonych badań naukowych. Pozwoliło to na właściwe postawienie hipotez badawczych, zaplanowanie badań i ich realizację.

Głównym celem niniejszej dysertacji, jak podaje Pani magister, było dokonanie oceny wpływu długotrwałego spożywania ekstraktu z owoców *A. melanocarpa* podczas niskiego oraz umiarkowanego przewlekłego narażenia na kadm na metabolizm cynku i miedzi oraz stężenie metalotioneiny, w modelu doświadczalnym z udziałem zwierząt laboratoryjnych (szczurów). Dobrane stężenia ksenobiotyku oraz ekstraktu z *Aronia Melanocarpa*, schematy podawania oraz wielopunktowe przeprowadzenie badań zagwarantowało śledzenie dynamiki rozwoju zaburzeń indukowanych przez kadm oraz oceny działania ww. ekstraktu. W tym miejscu jedyne zastrzeżenie Recenzenta dotyczy użytego określenia „spożywania”, które wydaje się być bardziej właściwym dla badań prowadzonych z udziałem ludzi, niż dla testowanych organizmów zwierzęcych.

Oceniana rozprawa doktorska opatrzona jest obszernym Opracowaniem, na które składają się: *Wprowadzenie do rozprawy doktorskiej* – przedstawiające spis ww. 3 publikacji i ich tematykę oraz źródła finansowania; *Wykaz stosowanych skrótów i Spis treści*; *Wstęp* - wprowadzający czytelnika w zagadnienia dotyczące roli jonów kadmu jako czynnika ryzyka dla zdrowia populacji ogólnej, znaczenia jonów miedzi i cynku jako istotnych biopierwiastków w utrzymaniu homeostazy organizmu oraz możliwych interakcji między nimi a testowanym ksenobiotykiem, oraz znaczenia metalotioneiny w dystrybucji obu biopierwiastków. Ponadto Doktorantka scharakteryzowała rolę biologiczną owoców *Aronia melanocarpa* oraz ich znaczenie w profilaktyce skutków zdrowotnych przewlekłego narażenia

na jony kadmu. Rozdział ten kończy spis piśmiennictwa (95 pozycji literaturowych), na których opierała się doktorantka przygotowując tę część rozprawy. Doceniając nakład pracy włożony w przygotowanie dysertacji przez Panią mgr Sylwię Borowską, uważam, iż wystarczającym byłoby jedynie wskazanie najważniejszych dla ocenianej rozprawy informacji naukowych, gdyż są one bardzo obszernie przedstawione w ww. 2 pracach przeglądowych.

W kolejnym rozdziale dysertacji: *Założenia i cel pracy*, Doktorantka przekonująco uzasadnia wybór podjętych zadań badawczych. Rozdział ten zawiera również jasno sformułowane 3 *Hipotezy badawcze oraz Cel badań*, również w postaci 3 głównych założeń, wyjaśniających celowość ich podjęcia. Ponadto zawiera podrozdział zatytułowany *Sposób realizacji celu badawczego* oraz zakres przeprowadzonych badań, scharakteryzowanych w podrozdziale zatytułowanym „*Badania obejmowały*”. W opinii Recenzenta cele 1 i 2 mogłyby być ujęte w postaci jednego celu, z uwagi na niewielkie różnice w ich sformułowaniu. Kolejne rozdziały to opublikowane wspomniane wcześniej 3 prace pełnotekstowe. Opracowanie zamyka *Dyskusja* z 3 podrozdziałami omawiającymi w sposób bardzo dojrzały i wnikliwy wyniki badań własnych na tle doniesień z piśmiennictwa światowego (50 pozycji literaturowych). Brakuje mi jedynie rozdziału *Materiały i Metody*, gdzie w sposób syntetyczny Doktorantka wskazałaby zastosowane techniki badawcze. Opracowanie kończą *Wnioski*, w liczbie 7, stanowiące ostateczne podsumowanie uzyskanych wyników i interpretujące opisane spostrzeżenia.

Przeprowadzone badania pozwoliły w pełni na zrealizowanie założonych celów badawczych. Pani mgr Sylwia Borowska wykazała, iż przewlekłe narażenie szczurów na kadm (podawany wraz z dietą) w zastosowanym modelu badawczym, będący odpowiednikiem niskiej i umiarkowanej ekspozycji środowiskowej człowieka, prowadzi do wielopłaszczyznowych zaburzeń metabolizmu jonów cynku i miedzi. Niska ekspozycja na ten ksenobiotyk już w początkowym okresie może powodować niedobory obu tych biopierwiastków w organizmach testowych, zwłaszcza w wątrobie i nerkach, zaś długotrwałe narażenie może skutkować zwiększoną retencją obu biopierwiastków w tych narządach. Obserwacje poczynione w stosunku do działania ekstraktu z owoców *Aronia melanocarpa* potwierdziły, że nawet długotrwałe jego przyjmowanie nie wpływa niekorzystnie na metabolizm jonów cynku i miedzi, nawet w przypadku obecności śladowych ilości kadmu podawanego z dietą standardową. Natomiast podczas niskiej i umiarkowanej ekspozycji na kadm, ww. ekstrakt całkowicie lub częściowo chroni przed większością zmian w metabolizmie tych biopierwiastków. Może jednak prowadzić do zmian niektórych

wskaźników ich metabolizmu, które nie ulegały zmianie w wyniku działania ksenobiotyku. Kluczową konkluzją, jest stwierdzenie, iż korzystny efekt ekstraktu z owoców *Aronia melanocarpa* jest jednak dominujący i jest niezależny od interakcji jego składników z jonami kadmu. Wskazuje to, jak konkluduje Doktorantka, iż przetwory aronii czarnoowocowej mogą być rozpatrywane jako naturalne produkty o potencjalnym wykorzystaniu w profilaktyce zagrożeń dla zdrowia wynikających z narażenia na kadm, jednak jak słusznie zauważa, konieczne są dalsze badania w tym zakresie. Wyrazem nowatorskiego charakteru i naukowej wartości uzyskanych wyników jest ich opublikowanie w renomowanym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, podobnie jak opracowań przeglądowych, które były recenzowane przez międzynarodowy zespół ekspercki. Znacząco podnosi to ich wartość merytoryczną i zwalnia Recenzenta z oceny ich waloru naukowego. Jednak nie mogę odmówić sobie przyjemności podkreślenia dogłębności i szczegółowości opracowania teoretycznego badanego zagadnienia oraz doskonałej realizacji i opracowania wyników przeprowadzonych eksperymentów, zarówno w pracy opublikowanej w *Nutrients*, jak i w załączonych *Supplementary Materials*. Zdaniem Recenzenta mogłyby one stanowić odrębne dzieło oryginalne, opublikowane jako niezależny manuskrypt. Z całym przekonaniem mogę stwierdzić, iż Doktorantka w sposób logiczny i przemyślany przedstawiła osiągnięcia wszystkich etapów swojej pracy. Dysertacja zawiera również dwustronicowe *Streszczenie* w języku polskim i angielskim, co jest typowe dla tego rodzaju prac oraz życiorys naukowy i spis wszystkich publikacji i komunikatów zjazdowych, których współautorką jest Doktorantka.

Na podkreślenie zasługuje bardzo staranne przygotowanie rozprawy, napisane poprawną polszczyzną, z dbałością o szczegóły. Z obowiązku Recenzenta muszę jedynie zwrócić uwagę na pewne drobne niedociągnięcia pojawiające się w recenzowanej dysertacji. Przykładowo, na str. 23 niezbyt fortunate wydaje się użycie określenia „obciążenie organizmu kadmem”; ponadto wskazanym byłoby konsekwentne stosowanie określenia „biopierwiastki (np. na str. 24 jest - bioelementów), W wykazie użytych skrótów dwukrotnie podane jest wyjaśnienie polskie „transporter cynku” dla dwóch różnych skrótów (hZTL1 i ZNT1). Bardziej właściwym byłoby również zastosowanie określenia dwuczynnikowa/wieloczynnikowa analiza wariancji. Recenzent zauważył także drobny błąd edytorski w nazwie łacińskiej aronii czarnoowocowej. Wydaje się ponadto, iż w załączonych *Supplementary Materials* skład i sposób przygotowania ekstraktu powinien być raczej przedstawiony w sekcji *Materiały i metody*, a nie pod tabelą (str. 4 artykułu oryginalnego nr 3), gdyż byłoby to bardziej czytelne.

Powyższe drobne uwagi, absolutnie nie wpływają na wysoką ocenę całościową dysertacji, również w aspekcie ogromu włożonej przez Doktorantkę i jej Promotora pracy w przygotowanie teoretyczne oraz zaplanowanie, realizację i opublikowanie wyników badań. Praca doktorska Pani mgr Sylwii Borowskiej jest wartościowym i nowatorskim opracowaniem, wydawałoby się znanego problemu przewlekłego narażenia na kadm, ale w nowym ujęciu, w ocenie długotrwałego stosowania wyciągu z *Aronia Melanocarppa*, zarówno jego działania protekcyjnego jak i aspektów niekorzystnego działania na organizm modelowy w zastosowanym schemacie badawczym. Chciałabym również podkreślić, iż załączone do dysertacji *Curriculum vitae* daje pełny obraz aktywności naukowej i organizacyjnej doktorantki oraz dobrze rokuje na przyszłość. Z analizy tej części rozprawy wynika, iż Pani mgr Sylwia Borowska jest doskonale przygotowana do realizacji różnorodnych celów badawczych i dysponuje rozległym warsztatem badawczym.

Reasumując stwierdzam, iż przedłożona do recenzji dysertacja w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Pani mgr Sylwia Borowska wykazała dojrzałość i doświadczenie wymagane od kandydatów ubiegających się o stopień doktora nauk farmaceutycznych. Z pełnym przekonaniem przedkładałam zatem Panu Dziekanowi i Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Borowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, zważywszy na istotne elementy nowości naukowej, zawarte w ocenianej rozprawie, zastosowanie złożonego warsztatu metodycznego pozwalającego na przeprowadzenie wielopłaszczyznowych analiz, a także potencjalne znaczenie praktyczne opisanych badań, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Sylwii Borowskiej.

Prof. dr hab. n. farm. Agnieszka Piwowar

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA i ZAKŁAD TOKSYKOLOGII

którą

prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

Wrocław, 4 lipiec 2018r.