

Gdańsk, 23.07.2024 r.

Dr hab. Agnieszka Ćwiklińska
Zakład Chemii Klinicznej
Katedra Analityki Klinicznej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk
tel. 58 349 27 95
mail: agnieszka.cwiklinska@gumed.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Elżbiety Radajewskiej pt.:

Poszukiwanie nowych sposobów protekcji nerek w zespole metabolicznym i uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym. Pozytywny efekt działania antyoksydantów.

Promotor: dr hab. n. farm. Iwona Bil-Lula, prof. uczelni

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Anna Krzywonos-Zawadzka

Choroby nerek są heterogenną grupą schorzeń, które dotyczą obecnie ponad 10% populacji i stanowią bardzo istotny problem zdrowotny i społeczny. Na wysoki odsetek chorych wpływa duże rozpowszechnienie w populacji czynników ryzyka sercowo-naczyniowego takich jak otyłość, nadciśnienie tętnicze oraz zaburzenia gospodarki węglowodanowej i lipidowej, których współwystępowanie określa się jako zespół metaboliczny i które są związane z upośledzeniem funkcji nerek. Mechanizmy uszkodzenia nerek w zespole metabolicznym nie są w pełni poznane, ale prawdopodobnie obejmują połączenie zmian zapalnych, hemodynamicznych i metabolicznych, w tym nasilenie procesów oksydacyjnych.

Choroby nerek mogą przebiegać w pewnym okresie rozwoju bezobjawowo, skąpoobjawowo lub z niecharakterystycznymi objawami, stąd też znacząca część chorych nie zdaje sobie sprawy z toczącego się w nerkach procesu chorobowego. Z tego powodu rzeczywista liczba chorych pozostaje nieznaną, a w wielu przypadkach choroba rozpoznawana jest dopiero w stadium schyłkowej

niewydolności narządu wymagającej leczenia nerkozastępczego: dializoterapii lub transplantacji nerki. Przeszczepienie nerki jest uważane za optymalną metodę leczenia nerkozastępczego, ponieważ zapewnia chorym najlepszą jakość życia i najdłuższy okres przeżycia.

Istotnym problemem klinicznym, szczególnie w przypadku transplantacji nerki od dawcy zmarłego, jest wczesne okołoprzeszczepowe uszkodzenie narządu w mechanizmie niedokrwiennie-reperfuzyjnym. Uszkodzenie to jest konsekwencją m.in. procesu zapalnego związanego z aktywacją granulocytów obojętnochłonnych prowadzącą do nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu i ma ono wpływ zarówno na wczesną, jak i odległą funkcję przeszczepionej nerki.

Biorąc po uwagę powyżej przedstawione aspekty podjęta przez Doktorantkę tematyka pracy dotycząca oceny wpływu stresu oksydacyjnego oraz protekcyjnego działania antyoksydantów w uszkodzeniu nerek w przebiegu zespołu metabolicznego i uszkodzeniu niedokrwiennie-reperfuzyjnym uważam za w pełni uzasadnioną.

Rozprawa doktorska została przygotowana na podstawie trzech powiązanych tematycznie prac (jednej przeglądowej i dwóch oryginalnych) opublikowanych w latach 2022-2023, w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym:

1. Anna Radajewska, Anna Krzywonos-Zawadzka, Iwona Bil-Lula. *Recent methods of kidney storage and therapeutic possibilities of transplant kidney*. Biomedicines 2022;10:1013. doi: 10.3390/biomedicines10051013
2. Anna Radajewska, Jakub Szyller, Anna Krzywonos-Zawadzka, Agnieszka Olejnik, Grzegorz Sawicki, Iwona Bil-Lula. *Mitoquinone alleviates donation after cardiac death kidney injury during hypothermic machine perfusion in Rat Model*. Int J Mol Sci 2023;24:14772. doi: 10.3390/ijms241914772
3. Anna Radajewska, Jakub Szyller, Joanna Niewiadomska, Agnieszka Noszczyk-Nowak, Iwona Bil-Lula. *Punica granatum L. polyphenolic extract as an antioxidant to prevent kidney injury in metabolic syndrome rats*. Oxid Med Cell Longev 2023;6:144967. doi: 10.1155/2023/6144967

W pracy przeglądowej i jednej pracy oryginalnej Doktorantka jest pierwszym autorem, a w drugiej pracy oryginalnej pierwszym autorem równorzędnym. Łączna wartość wskaźnika oddziaływania IF prac wynosi 10,300, łączna punktacja MEiN – 260.

Całkowity dorobek Doktorantki wynosi 33,605 punktów IF oraz 780 punktów MEiN. Doktorantka jest także kierownikiem projektu Narodowego Centrum Nauki Preludium oraz wykonawcą w pięciu innych projektach naukowych. Otrzymała również liczne nagrody i wyróżnienia oraz odbyła dwa półroczne staże naukowe w ośrodkach zagranicznych.

Rozprawa doktorska posiada typowy dla tego rodzaju prac układ i zawiera kolejno: streszczenie w języku polskim i języku angielskim, informacje o dorobku naukowym Doktorantki, wstęp, cel i założenia pracy, materiały i metody, omówienie wyników publikacji wchodzących w skład rozprawy, podsumowanie i wnioski, wykaz skrótów i definicji, piśmiennictwo, spis rycin, publikacje wchodzące w skład rozprawy oraz oświadczenia współautorów publikacji. Z oświadczeń tych wynika jednoznacznie, że udział Doktorantki w realizacji pracy był dominujący i obejmował opracowanie metodologii badań, wykonywanie doświadczeń, analizę wyników oraz przygotowanie manuskryptów, w tym prezentowanych w pracach rycin i tabel.

W rozdziale „Wprowadzenie” Doktorantka w sposób syntetyczny przedstawiła informacje dotyczące chorób nerek, transplantacji nerki i uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego oraz zespołu metabolicznego, jak również informacje dotyczące stresu oksydacyjnego i jego wpływu w uszkodzeniu niedokrwiennie-reperfuzyjnym oraz zespole metabolicznym. Przedstawiła także szczegółowe informacje dotyczące antyoksydantów, których działanie zostało ocenione w ramach prezentowanej rozprawy. W rozdziale „Cel” Doktorantka jako swój główny kierunek badawczy wskazała ocenę wpływu działania stresu oksydacyjnego w wybranych patomechanizmach uszkodzenia nerki oraz zbadanie ochronnego działania związków antyoksydacyjnych, co zostało rozwinięte w postaci pięciu celów szczegółowych. W części „Materiały i metody” w sposób wyczerpujący i dokładny przedstawione zostały informacje dotyczące wykorzystanych w pracy modeli i procedur badawczych, metod oznaczania analizowanych parametrów oraz informacje na temat analizy statystycznej. W kolejnym rozdziale omówione zostały wyniki prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, a następnie, w rozdziale XI, przedstawiono ich podsumowanie oraz wnioski, które zostały ujęte w dwóch punktach. W kolejnych rozdziałach umieszczono wykaz skrótów i definicji

oraz piśmiennictwo, które liczy 59 pozycji. Są to aktualne prace z literatury światowej dobrze powiązane z tematyką rozprawy doktorskiej.

Edytorska strona pracy nie budzi więc zastrzeżeń i należy podkreślić dużą dbałość Doktorantki o wysoką jakość przygotowanej rozprawy, a pojedyncze błędy literowe lub pomyłki edytorskie występujące w pracy nie wpływają na jej wartość.

W pracy wykorzystano dwa szczurze modele badawcze. Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach uzyskana została zgoda Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

W pracy oryginalnej pt.: *Mitoquinone alleviates donation after cardiac death kidney injury during hypothermic machine perfusion in rat model* Doktorantka oceniła, czy w nerkach pobranych od szczurów w warunkach śmierci mózgowej i sercowej, poddanych zimnej maszynowej perfuzji, występują różnice w poziomie parametrów uszkodzenia nerek, stresu oksydacyjnego i związanych z apoptozą komórek oraz zbadała wpływ leku o działaniu antyoksydacyjnym (Mitoquinone) na te parametry. Doktorantka zaobserwowała wyższe stężenie KIM-1, ROS/RNS, kaspazy 3 i 9, fosforylowanej formy białka Akt i stosunku formy fosforylowanej do całkowitego stężenia białka Akt w nerkach pozyskanych po wydłużonym czasie ciepłego niedokrwienia (śmierć sercowa) oraz statystycznie znamienne niższy poziom tych parametrów przy obecności Mitoquinone w płynie reperfuzyjnym. Uzyskane wyniki wskazują więc, że wydłużony czas ciepłego niedokrwienia może być związany z niekorzystnymi zmianami w nerce przygotowywanej do transplantacji, a zastosowanie Mitoquinone w płynie reperfuzyjnym może poprawić kondycję narządu.

Tematyka pracy pogłądowej jest nie tylko ściśle powiązana z pracą eksperymentalną, ale stanowi jej rozszerzenie poprzez przedstawienie mechanizmów uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego, omówienie rozszerzonych kryteriów i statystyk związanych z transplantacją nerki, przedstawienia metod przechowywania narządów przed transplantacją oraz najnowszych rozwiązań mających na celu poprawę procesu przechowywania i perfuzji narządu, które skutkowałyby zmniejszeniem uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego i ryzyka utraty przeszczepu. Praca ta jest bardzo dobrą podstawą do wyznaczania kolejnych zadań badawczych mających na celu optymalizację warunków przechowywania narządów przed transplantacją.

Celem badawczym drugiej pracy oryginalnej pt.: *Punica granatum L. polyphenolic extract as an antioxidant to prevent kidney injury in metabolic syndrome rats* była ocena wpływu przyjmowania wyciągu ze skórek granatu na parametry stresu oksydacyjnego i uszkodzenia nerek, w przebiegu zespołu metabolicznego. Badania przeprowadzono w warunkach *in vivo* na szczurzym modelu zespołu metabolicznego. Doktorantka zaobserwowała m.in. statystycznie znamienne niższe stężenia dla ROS/RNS oraz oxLDL w nerkach szczurów z zespołem metabolicznym, którym podawano wyciąg ze skórek granatu. Interesujące jest również uzyskanie około 2-krotnie niższych średnich wartości KIM-1 w grupie szczurów z zespołem metabolicznym po zastosowaniu wyciągu ze skórek granatu, choć tutaj (najprawdopodobniej ze względu na duży rozrzut wyników w grupie kontrolnej) nie osiągnięto poziomu istotności statystycznej pozwalającej stwierdzić znamienność różnic między grupami. Doktorantka zaobserwowała również znacząco (około 2,5-krotnie) niższe stężenia KIM-1 i oxLDL u szczurów bez zespołu metabolicznego, w stosunku do szczurów z zespołem metabolicznym (porównanie grup, w których podawano wyciąg ze skórek granatu). Przeprowadzone badania pozwoliły na wyciągnięcie interesujących i ważnych wniosków, że zastosowanie *Punica granatum L.* wiąże się z redukcją stresu oksydacyjnego w nerkach w przebiegu zespołu metabolicznego, co może mieć działanie nefroprotekcyjne.

Analiza nasunęła mi pewne pytania, które mają charakter dyskusyjny i chętnie poznam opinię Doktorantki w trakcie obrony rozprawy doktorskiej:

1. Czy przeprowadzono próby oceny korelacji np. między stężeniem parametrów stresu oksydacyjnego a stężeniem parametrów uszkodzenia nerek?
2. Które z uzyskanych wyników wskazałaby Pani jako bezpośrednio potwierdzające stwierdzenia, że „stres oksydacyjny jest istotnym czynnikiem uszkadzającym nerki w przebiegu zespołu metabolicznego” oraz że „w przebiegu zespołu metabolicznego dochodzi do zmian w obrębie układu antyoksydacyjnego”?
3. Doktorantka wskazała w manuskrypcie w rozdziale: *Limitations*, że przydatne w analizie byłoby dodanie jeszcze jednej grupy, tj. szczurów bez zespołu metabolicznego nieleczonych wyciągiem ze skórek granatu. Miałabym prośbę o rozwinięcie tego zagadnienia i uzasadnienie sensu włączenia takiej grupy do badania.

WNIOSEK KOŃCOWY

Tematyka podjętych badań jest aktualna i trafna, uzyskane wyniki są oryginalne i wartościowe, a przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Anny Elżbiety Radajewskiej jest dojrzałym opracowaniem postawionego zadania badawczego.

Rozprawa doktorska, autorstwa mgr Anny Elżbiety Radajewskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., pozycja 1668 ze zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Anny Elżbiety Radajewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Z uwagi na wysoką jakość przygotowanej rozprawy, szeroki warsztat badawczy, wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników potwierdzoną ich opublikowaniem w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz fakt, że Doktorantka jest pierwszym lub pierwszym równorzędnym autorem manuskryptów wnosząc o wyróżnienie pracy.



dr hab. n. med. Agnieszka Ćwiklińska