



Zakład Farmakognozji  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku  
ul. Mickiewicza 2a, 15-230 Białystok, Polska  
tel.: 85-748-56-92; fax.: 85-748-54-16  
e-mail: [michal.tomczyk@umb.edu.pl](mailto:michal.tomczyk@umb.edu.pl)

---

Białystok, 12 września 2023 r.

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „Wpływ urolityn na strukturę i funkcje podocytów kłębuszka nerkowego w warunkach cukrzycy”**

**Pani mgr Mileny Magdaleny Kotewicz**

wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. n. farm. Barbary Lewko, prof. uczelni  
oraz Pana prof. dr hab. Leszka Kalinowskiego

w Katedrze i Zakładzie Patofizjologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

Zainteresowanie świata naukowego związkami pochodzenia roślinnego i ich właściwościami biologicznymi wzięło niewątpliwie swój początek z medycyny etnicznej. Ten współcześnie rosnący nurt naukowy w wielu przypadkach okazuje się niezastąpionym źródłem wiedzy na temat właściwości leczniczych roślin i wyznacza obecnie wskazówki do dalszych poszukiwań naukowych. Oparte na różnych modelach farmakologicznych badania, w modelach *in vitro*, *in vivo* czy badania kliniczne, potwierdzają zasadność stosowania przetworów roślinnych jako środków leczniczych, jednakże dla wielu surowców są w większości przypadków w dalszym ciągu niewystarczające aby stwierdzić, że są nie tylko bezpieczne ale również skuteczne. Medycyna naturalna oparta na faktach stanowi obecnie podstawę racjonalnej fitoterapii, nie zawsze docenianej, a wręcz pomijanej. Oceniana dysertacja wpisuje się w bardzo aktualny nurt prowadzonych badań opisujących wykorzystanie metabolitów elagotanoidowych, urolityn na strukturę i funkcję podocytów kłębuszka nerkowego w przebiegu cukrzycy. Nefropatia cukrzycowa należy do przewlekłych powikłań cukrzycy. Ryzyko uszkodzenia nerek u chorych na cukrzycę jest około 20 krotnie większe niż u osób zdrowych. Nefropatia cukrzycowa to strukturalne i czynnościowe zmiany w nerkach, wywołane bezpośrednio przez hiperglikemię. Podobnie jak wszystkie powikłania cukrzycy, dość trudne do terapii, a sama nefropatia jest efektem braku jej wyrównania. Do innych czynników sprzyjających rozwojowi nefropatii cukrzycowej należą: predyspozycja genetyczna, długi czas trwania cukrzycy, płeć, nadciśnienie tętnicze, wysokie stężenia lipidów surowicy krwi, palenie tytoniu czy bogato białkowa dieta.

Przedstawiona rozprawa doktorska została złożona do oceny w formie tematycznego cyklu dwóch publikacji, jednej oryginalnej oraz jednej pracy poglądowej. Wszystkie z wymienionych prac zostały opublikowane w roku 2022 w czasopismach tematycznych, a jedno z nich znajduje się na liście filadelfijskiej, *Cells* (IF = 7.666, 140 pkt). Z pewnością zostały one poddane bardzo rygorystycznemu procesowi oceny recenzenckiej. Doktorantka jest pierwszą autorką we wszystkich wymienionych w rozprawie publikacjach, co wybitnie wskazuje na Jej wiodący charakter w ich opublikowaniu. Dodatkowym potwierdzeniem powyższej oceny jest, fakt prowadzenia korespondencji w ramach pracy przeglądowej. Jednakże, bardzo trudno mi jest ocenić Jej pełny udział ponieważ do rozprawy doktorskiej nie dołączono stosownych oświadczeń zarówno autorki rozprawy jak i współautorów.

Mgr Milena Kotewicz postawiła sobie za zadanie, rozwiązanie szeregu celów naukowych uwzględniających przemyślane poszczególne etapy badawcze z szerokiego zakresu badań biologicznych w tym odpowiedź na pytanie czy urolityny, działając na podocyty pośrednio lub bezpośrednio, mogłyby w warunkach cukrzycy chronić komórki przed uszkodzeniem, co mogłoby zapobiegać lub spowalniać rozwój nieodwracalnych zmian komórkowych. Ponadto, podjęła się wyjaśnienia w jaki sposób związki te mogą wpływać na strukturę i funkcje podocytów w warunkach imitujących cukrzycę w modelu eksperymentalnym *in vitro*. Założone cele badawcze zostały zrealizowane prawidłowo. Po raz pierwszy wykazano wielokierunkowy wpływ wybranej do badań z urolityn, urolityny A (UA) na komórki podocytarne. Doktorantka wykazała, że w warunkach imitujących cukrzycę UA hamuje, a nawet odwraca zmiany w uszkodzonych podocytach indukowane przez hiperglikemię. Dodatkowo, mgr Kotewicz wykazała, że w warunkach hiperglikemii urolityna A może chronić komórki podocytarne przed niekorzystnym wpływem TGF $\beta$ , który jest jednym z głównych czynników niwelujących podocyty w cukrzycy. Uzyskując szereg wyników Doktorantka zaobserwowała, iż UA jest metabolizowana przez podocyty, przy czym w warunkach hiperglikemii proces ten zachodzi znacznie wolniej. Poza tym wykazała, że obydwie badane urolityny A i B w sposób zależny od stężenia regulują żywotność podocytów, przy czym UA w warunkach odpowiadających hiperglikemii zwiększa żywotność komórek podocytarnych poprzez hamowanie apoptozy, stymulowanie autofagii i hamowanie produkcji wolnych rodników tlenowych (ROS). Doktorantka opisała również, iż jedynie UA wpływa na efekty przeciwstawne do działania glukozy o wysokim stężeniu oraz TGF- $\beta$ 1 poprzez inhibicję ekspresji białek błony szczelinowej, zmniejszenie zdolność podocytów do migracji czy inhibicyjny wpływ na przemianę nabłonkowo-mezenchymalną podocytów. W ramach uzyskanych wyników potwierdziła, iż UA wpływa na efekty wywierane przez TGF $\beta$  przez regulowanie ekspresji receptorów tego białka oraz aktywności szlaku sygnalizacyjnego zależnego od białek SMAD. Cenną obserwacją z uzyskanych wyników jest podkreślenie przez Doktorantkę faktu, że UA w warunkach *in vivo* wpływa na ochronę komórek podocytarnych przed czynnikami niszczącymi je w przebiegu cukrzycy. Jak trafnie zauważa, bezpośredni wpływ UA na strukturę błony szczelinowej może przyczynić się do zachowania jej integralności, a także jej działanie może skutkować redukcją białkomoczu i stabilizacją prawidłowej funkcji nerek. Tym samym Doktorantka wskazuje na aplikacyjność z uzyskanych wyników, podkreślając, że UA powinna być brana pod uwagę jako potencjalny lek chroniący nerki w podocytopatii cukrzycowej. Nadal jednak pozostaje istotne w dalszych dociekaniach naukowych, w jakim stopniu przeprowadzone eksperymenty dają fizjologicznie istotne wyniki? Niemniej jednak alternatywne jest rozważenie traktowania podocytów z wykorzystaniem nanocząstek jako potencjalnych nośników umożliwiających aktywny transport aglikonu - urolityny bezpośrednio do komórek docelowych. W tym momencie nasuwa się pytanie otwierające dyskusję nad bezpieczeństwem stosowania urolityn w tym badania pod kątem potencjalnych skutków długoterminowych i potencjalnych działań niepożądanych i jakie propozycje w tym zakresie zaproponować może Doktorantka. Kolejnym cennym aspektem badań jest również zwrócenie uwagi jakie czynniki strukturalne predysponują wysoką aktywność cząsteczki UA?

Dopełnieniem pracy doktorskiej jest włączona do rozprawy doktorskiej praca pogładowa zestawiająca wyniki dotychczasowych badań nad urolitynami w kontekście badań w modelach *in vivo* i *in vitro* opisujących efekty biologiczne urolityn w różnego typu tkankach oraz biochemiczne mechanizmy działania tych związków. W publikacji zestawiono także informacje o właściwościach biologicznych i farmakologicznych urolityn do modulowania wielu komórkowych szlaków sygnalizacyjnych, które odpowiadają za zróżnicowane działanie tych związków, w tym działanie przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i antyoksydacyjne. Uwzględniając powyższe efekty, w publikacji podkreślono korzystny wpływ urolityn w modulowaniu odpowiedzi organizmu na przewlekłą hiperglikemię podczas cukrzycy, kiedy dochodzi do nadprodukcji cytokin prozapalnych, czynników wzrostu i reaktywnych form tlenu oraz wzrasta poziom glikacji białek. Szczególną uwagę

zwrócono przy tym na skutki działania urolityn w nerkach, a zwłaszcza na procesy związane z aktywnością systemów zależnych od TGF $\beta$ , które odpowiadają za rozwój patologicznych zmian obserwowanych w nefropatii cukrzycowej. Doktorantka jednakże zaznacza, iż stosunkowo niewiele badań odnosi się do chorób nerek, a żadne z nich nie dotyczą komórek podocytowych, których stan i liczba decyduje o losie całego nefronu. Tym bardziej należy podkreślić, iż uzyskane wyniki w ramach rozprawy doktorskiej stają się niezwykle cenne.

Wysoko oceniam rangę i znaczenie wielokierunkowych badań podjętych w zespole badawczym prof. Barbary Lewko i prof. Leszka Kalinowskiego. Lektura dysertacji uprawnia mnie do stwierdzenia, że Autorka wykazała się zdolnością w opanowaniu szeregu technik pracy w laboratorium i to nie tylko analiz fitochemicznych (techniki LC-MS/MS) ale i biologicznych. Przedstawione wyniki badań zarówno w zakresie opublikowanym jak i przedstawionych w rozprawie doktorskiej i nieuwzględnionych w publikacji doświadczalnej (ocena wpływu urolityn na aktywność transformującego czynnika wzrostu TGF- $\beta$ 1 w komórkach podocytowych oraz ocena zdolności podocytów do migracji – test gojenia rany) wskazują na dojrzałość badawczą Doktorantki jak i dociekliwość oraz umiejętność stawiania i rozwiązywania problemów badawczych. Na szczególną uwagę zasługuje również umiejętność współpracy naukowej z naukowcami z rodzimego Wydziału Farmaceutycznego w szczególności z zespołem Katedry Chemii Organicznej w zakresie syntezy urolityn, jak i analiz chromatograficznych z zespołem Prof. Mirosławy Krauze-Baranowskiej z Katedry Farmakologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Realizacja badań w ramach pracy doktorskiej możliwa była również w ramach uzyskanych środków finansowych w tym projekcie NCBiR POWR.03.05.00-00-z082/18 współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, grantów Narodowego Centrum Nauki OPUS 2015/19/B/NZ7/03830 i 2019/33/B/NZ7/02699 oraz grantu Ministra Edukacji i Nauki 10/E-389/SPUB/SP/2020.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska mgr Mileny Magdaleny Kotewicz jest niezwykle wartościowa zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Wnoszę tym samym do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Mileny M. Kotewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z racji na wysoką wartość merytoryczną rozprawy potwierdzoną wysokim sumarycznym wskaźnikiem IF = 7.666 (180 pkt MEiN) obecnie IF<sub>2022</sub> (JCR) = 6.0 – publikacja pierwszoautorska, wnoszę o jej wyróżnienie.



Michał Tomczyk