

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej wykonanej przez mgr chem. Ewelinę Petzke pt.: "Ocena właściwości antyoksydacyjnych 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu w modelu kancerogenezy chemicznej u szczura".

Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Jadwiga Jodynis-Liebert.

Choroby nowotworowe są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów, szczególnie w krajach rozwiniętych. Obecnie dysponujemy szeregiem leków, które można stosować w leczeniu tych chorób. Jednak nie często chemioterapia stosowana jest już we wczesnych etapach procesu nowotworzenia. Od szeregu lat obserwuje się zainteresowanie stosowaniem naturalnych i/lub syntetycznych substancji w celu zahamowania, odwrócenia lub opóźnienia kancerogenezy. Zakłada się, że w przeciwieństwie do chemioterapii, chemoprewencja może ingerować we wczesne etapy procesu kancerogenezy – przede wszystkim hamować inicjację i promocję. Od kiedy stwierdzono, że zaburzenie równowagi pomiędzy powstawaniem reaktywnych form tlenu a wydolnością endogennych układów antyoksydacyjnych może leżeć u podłoża takich schorzeń jak: choroby nowotworowe, miażdżycy, choroby układu krążenia, cukrzyca, choroby neurodegeneracyjne poszukiwania egzogennych przeciwutleniaczy stały się bardziej intensywne. Badania obejmują zarówno związki syntetyczne jak i pochodzenia naturalnego. Największe zainteresowanie budzą związki pochodzenia naturalnego np.: związki fenolowe pochodzenia roślinnego (np. resweratrol), i ich pochodne (np.: 3,4,5,4'-tetrametokdystylben). Wykazują one szerokie spektrum działania, a u podstawy ich antyoksydacyjnego działania leży wiele różnych mechanizmów.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr E. Petzke jest to kolejną bardzo dobrą pracą przygotowaną w Katedrze i Zakładzie Toksykologii UM w Poznaniu z cyklu prac poświęconych badaniom nad protekcyjnym działaniem substancji pochodzenia naturalnego i ich pochodnych.

Praca Pani mgr E. Petzke została przygotowana na 170 stronach. Części pracy: doświadczalna, wyniki i omówienie wyników zostały poprzedzone częścią teoretyczną pracy zatytułowaną „Wstęp”. W tym rozdziale Autorka obszernie,

a jednocześnie przejrzysto przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat reaktywnych form tlenu i azotu, ich biologicznego znaczenia oraz udziału w powstawaniu wybranych schorzeń. Bardzo dobrą częścią tego rozdziału jest fragment, w którym Autorka przedstawiła systemy obrony antyoksydacyjnej organizmu. Ta część stanowi wprowadzenie do prezentacji założeń pracy, a także dobre przygotowanie do dyskusji otrzymanych wyników. Autorka zebrała i cytuje w swojej pracy obszerne piśmiennictwo, 259 pozycji.

Celem przeprowadzonych badań była próba oceny „czy istnieje związek pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną pochodnej reseratrołu, 3,4,5,4'-tetrametoksytylbenu (DMU-212), a jego potencjalnymi właściwościami chemoprewencyjnymi. Założenia pracy Doktorantka realizowała stosując model kancerogenezy chemicznej wątroby po podaniu szczurom N-nitrozodietylaminy (NDEA, prooksydant o właściwościach kancerogennych, wg IARC grupa 2A) i fenobarbitalu (promotor procesu nowotworowego, wg IARC grupa 2B). Wpływ DMU-212 na uszkodzenia obserwowane w wątrobie zwierząt po podaniu NDEA oceniony został na podstawie: a/ poziomu wybranych parametrów obrony antyoksydacyjnej oraz markerów uszkodzeń oksydacyjnych; b/ ekspresji mRNA enzymów antyoksydacyjnych; c/ ekspresji białek, wczesnych markerów procesu nowotworowego; d/ aktywności enzymów wskaźnikowych w surowicy krwi. Dodatkowo, Doktorantka wykonała oznaczenia wybranych parametrów obrony antyoksydacyjnej oraz markery uszkodzeń oksydacyjnych w nerkach. Wymieniony powyżej, w bardzo dużym skrócie, zakres przeprowadzonych badań świadczy o obszerności przedstawionej do oceny pracy. Dla realizacji zamierzonych planów Autorka zastosowała zarówno pomiar klasycznych wskaźników (np.: oznaczanie aktywności aminotransferaz, poziomu GSH) jak i metody z zakresu biologii molekularnej (np.: amplifikacja cDNA za pomocą metody RT-qPCR).

W części doświadczalnej pracy znalazły się opisy układu doświadczenia i zastosowanych metod. Badania przeprowadzone zostały na szczurach. W przypadku przeprowadzania badań z użyciem zwierząt laboratoryjnych konieczne jest uzyskanie zgody na te badania lokalnej komisji etycznej (LKE) – kopię takiej zgody mgr E. Petzke dołączyła do ocenianej pracy. Zwierzęta w eksperymencie podzielone zostały na 5 grup, i odpowiednio otrzymywały: nośnik, jedynie DMU-212, N-nitrozodietylaminę i fenobarbital, a grupie 4 i 5 podawano NDEA i PB oraz DMU-212 w dwóch różnych dawkach. Autorka pracy nie podaje na jakiej podstawie przyjęto taki schemat doświadczenia. Czy liczba i wielkość dawek (NDEA, PB i DMU-212) były ustalone we

wcześniejszych eksperymentach, czy na podstawie danych literaturowych. Proszę o komentarz, szczególnie po zapoznaniu się z uwagą Autorki zamieszczoną w końcowym podsumowaniu pracy: „można przypuszczać, że zastosowane dawki związku były zbyt niskie aby ujawnić w pełni jego potencjał chemoprewencyjny”.

W rozdziale „Część doświadczalna” mgr E. Petzke zamieściła opis przygotowania materiału do badań oraz przebieg oznaczeń szeregu parametrów biochemicznych. Wymieniony powyżej zakres badań uzupełniony został o badania immunohistochemiczne, a uzyskane wyniki poddane analizie statystycznej. Na str. 54 w punkcie „Metodyka badań” Autorka opisuje przygotowanie frakcji subkomórkowych. Czy wirowanie homogenatu tkankowego przez 20 min przy 10000 obrotów/minutę pozwala na otrzymanie frakcji cytozolowej? Czy w tak otrzymana frakcja w dalszych badaniach przyjmowana była jako frakcja cytozolowa?

W rozdziale „Wyniki badań” mgr E. Petzke przedstawiła uzyskane wyniki w 32 tabelach oraz na 37 rycinach. Należy podkreślić, że Doktorantce udało się w sposób przejrzysty i łatwy do śledzenia przedstawić tak dużą liczbę danych.

Oceny działania antyoksydacyjnego 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu Autorka pracy dokonała na podstawie, m. in. wpływu DMU-212 na poziom glutationu oraz stężenia grup karbonylowych w białkach, poziomu uszkodzenia DNA, zdolności do hamowania peroksydacji lipidów i procesów oksydacyjnych zachodzących w białkach, ich zdolności do normalizowania aktywności enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy ponadtlenkowej; katalazy; peroksydazy, reduktazy i S-transferazy glutationowej; oksydoreduktazy NADP(H):chinon; dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej); ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne i wybranych białek w wątrobie.

W rozdziale „Dyskusja” Autorka z dużą wnikliwością i krytycyzmem omówiła własne wyniki i przedyskutowała je z wynikami opublikowanymi przez innych autorów. Mgr E. Petzke na podstawie uzyskanych wyników sformułowała 7 wniosków.

Z opisu układu doświadczenia (str. 53) wynika, że podawanie DMU-212 trwało 16 tygodni i po zakończeniu eksperymentu zwierzęta usypiano i pobierano materiał do badań. Rozumiem, że przedstawione wyniki są odzwierciedleniem zmian w organizmach zwierząt po zakończeniu ekspozycji. Na str. 131 Autorka pisze:” .. podwyższona pod wpływem NDEA/PB aktywność LDH utrzymywała się przez 16 tygodni...” Na jakiej podstawie Autorka doszła do wniosku, że obserwowane zmiany po 16 tygodniach doświadczenia utrzymywały się przez 16 tygodni?

Do najważniejszych osiągnięć uzyskanych przez Doktorantkę można zaliczyć stwierdzenia, że: a/ DMU-212 w organizmach szczurów narażonych na czynnik kancerogeny (NDEA) wykazywał umiarkowane działanie antyoksydacyjne; b/ w wątrobie szczurów otrzymujących łącznie kancerogen i DMU-212 wykazano dwufazowy charakter zależności ekspresji mRNA enzymów antyoksydacyjnych od dawki DMU-212; c/ badany związek jest induktorem oksydoreduktazy NADP(H):chinon, co może stanowić istotny element jego potencjału chemoprewencyjnego; d/ obniżenie poziomu ekspresji białek (GGT, RB, p53) pod wpływem DMU-212 świadczy o ograniczeniu wczesnych zmian neoplastycznych przez N-nirozodietylloaminę; e/ obniżenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej i sorbitolowej (wskaźników funkcji wątroby) w surowicy zwierząt narażonych na NDEA może wskazywać na hepatoprotekcyjne działanie 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu.

Przedstawioną mi do oceny pracę, uważam za bardzo dobrą. Zaplanowany schemat badań i szeroki wachlarz zastosowanych metod analitycznych pozwoliły na realizację celów badawczych jakie postawiła przed sobą Doktorantka. Należy również podkreślić, że większość uzyskanych wyników została już opublikowana – w czasopiśmie z listy filadelfijskiej – w Human and Experimental Toxicology (IF – 1,6).

Stwierdzam, że praca „Ocena właściwości antyoksydacyjnych 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu w modelu kancerogenezy chemicznej u szczura” wykonana przez mgr chem. Ewelinę Petzke spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr chem. Ewelinę Petzke do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI  
MIĘDZYWYDZIAŁOWA KATEDRA FARMAKOLOGII  
OGÓLNEJ, KLINICZNEJ I TOKSYKOLOGII  
Zakład Toksykologii  
90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego 1  
tel. 42-677-91-47, fax 42-677-91-48

PROFESOR ZWYCZAJNY  
Zakład Toksykologii  
  
Prof. dr hab. Jadwiga Szymańska