



# UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Toksykologii

Kierownik: prof. zw. dr hab. Anna Długosz

Wrocław, 09.05.2017

## Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Petzke pt. „Ocena właściwości antyoksydacyjnych 3,4,5,4'-tetrametoksytylbenzu w modelu kancerogenezy chemicznej u szczura”, wykonanej pod kierunkiem Promotora Pani prof. dr hab. Jadwigi Jodynis-Liebert w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

### 1. Ocena merytoryczna pracy

Trafność podjętej tematyki badawczej oceniam wysoko. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska dotyczy, ogólnie rzecz ujmując, bardzo istotnych zagadnień, związanych z poszukiwaniem możliwości obniżenia ryzyka zapadalności na choroby nowotworowe, także z zapobieganiem ich nawrotom, przez zastosowanie naturalnych związków chemoprewencyjnych lub ich analogów jako środków ochronnych oraz, co szczególnie ważne, z bliższym poznaniem mechanizmów leżących u podstaw ich działania. Choroby nowotworowe są niewątpliwym problemem naszych czasów. Badania Pani mgr Eweliny Petzke wpisują się więc dobrze w światowe trendy naukowe poszukiwania sposobów na zmniejszenie zapadalności na choroby nowotworowe i zainteresowanie chemoprewencją. Związki chemoprewencyjne mogą działać na różnych szlakach kancerogenezy m.in. wpływać na modulację komórkowej transdukcji sygnałów czy ekspresję genów zarówno w fazie inicjacji jak i promocji a także aktywować antyoksydacyjny mechanizm obronny, taki jak Nrf2-Keap1-ARE.

Celem przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej była ocena czy istnieje związek między aktywnością antyoksydacyjną pochodnej resweratrolu, o symbolu DMU-212,

a własnościami chemoprewencyjnymi, a więc bliższe poznanie mechanizmu aktywności biologicznej DMU-212. Cel ten uważam za bardzo wartościowy i znaczący, szczególnie w aspekcie dużego zainteresowania pochodnymi resweratrolu i wzrastającego spożycia antyoksydantów jako tzw. środków ochronnych (kanceroprotekcyjnych), głównie w formie suplementów diety. Udowodniona rola stresu oksydacyjnego w etiologii nowotworów i szereg danych o korzystnym wpływie naturalnych antyoksydantów oraz ich analogów, uzasadniają badania w tym obszarze. Szczególne zainteresowanie budzi resweratrol, fitoaleksyna dostępna komercyjnie, a jeszcze większe bardziej biodostępne analogi. Badany analog resweratrolu, DMU-212 jest pochodną stylbenu, a różni się od resweratrolu tym, że zamiast 3 grup hydroksylowych posiada 4 grupy metoksyłowe. Istotnym jest fakt, że związek do badań zsyntezowano w Katedrze Technologii Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Dane o własnościach przeciwnowotworowych DMU-212, większej biodostępności oraz niskiej toksyczności, uzasadniają badania nad jego działaniem chemoprewencyjnym i mechanizmem tego działania, co jest celem niniejszej rozprawy. Trafność doboru tematyki oceniam więc bardzo wysoko, także sposób jej realizacji.

### **1b. Uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki**

Cel pracy został w pełni zrealizowany. Doktorantka wyjaśniła bowiem zależności między aktywnością antyoksydacyjną DMU-212 a działaniem chemoprewencyjnym preparatu. Wykazała, że preparat DMU-212 obniża uszkodzenia oksydacyjne lipidów i białek, zwiększa stężenie zredukowanego glutationu w wątrobie, ale nie wpływa na aktywność większości enzymów antyoksydacyjnych. Uzyskała jednak szereg interesujących wyników. Wykazała m.in. dwufazowy (dwubiegunowy) charakter ekspresji mRNA enzymów antyoksydacyjnych pod wpływem DMU-212, obniżenie ekspresji po niższej dawce (20 mg/kg m.c.) i wzrost ekspresji po wyższej dawce. Potwierdza to ogólną wiedzę o antyoksydantach (przeciwutleniaczach), które zależnie od dawki mogą działać też prooksydacyjnie. Badania wnoszą również nowe informacje dotyczące własności biologicznych DMU-212. Interesujące jest spostrzeżenie, że DMU-212 znacząco podwyższa aktywność oksydoreduktazy NADPH-chinonowej w wątrobie szczurów, co może sugerować dodatkowy szlak mechanizmu chemoprewencyjnego DMU-212 jako induktora tego enzymu.

### **1c. Poprawność językowa**

Przedłożona do oceny rozprawa napisana jest bardzo ładnym, przejrzystym stylem. Korekta bardzo staranna. Wyniki zestawiono w 32 tabelach i 37 rycinach, komentarz wyników zwięzły, rzeczowy. Część doświadczalna poprzedzona wstępem adekwatnym do wykonywanych badań, o dużym potencjale dydaktycznym i naukowym. Metodyka badań szczegółowo opisana, łącznie z wyjaśnieniem zasady metod (mechanizm oznaczenia). Piśmiennictwo obszerne, obejmuje 259 pozycji, większość z ostatniej dekady. Praca liczy 171 stron i 3 strony załączników, także streszczenia w j. polskim i angielskim

### **Ocena metodologiczna pracy**

Prawidłowy dobór literatury świadczy o umiejętności korzystania z bazy naukowej. Bardzo pozytywnie oceniam zastosowany model badawczy, gdyż badania „in vivo” gwarantują wysoką wartość wyników. Badania wykonano na szczurach, które traktowano N-nitrozodietylloaminą (NDEA), induktorem kancerogenezy oraz fenobarbitalem promotorem kancerogenezy. Uwzględniono więc wieloetapowość kancerogenezy i długotrwałość procesu (doświadczenie trwało 16 tygodni). Na badania uzyskano zgodę Komisji Etycznej, którą załączono. NDEA jest modelowym kancerogenem stosowanym wspólnie z fenobarbitalem do wywoływania raka wątroby. Badany preparat DMU-212 podawano w dwóch dawkach 20 i 50 mg/kg m.c. per os w formie zawiesiny. Całość eksperymentu została starannie zaplanowana, w czym widać znaczące doświadczenie naukowe Promotora, dokładnie opracowana oraz szczegółowo opisana. Praca ma dużą wartość metodyczną, gdyż wciąż istnieje potrzeba dopracowywania właściwych modeli badawczych do oceny chemicznej kancerogenezy.

Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres badań wykonanych przez Doktorantkę, duża liczba parametrów i przemyślany ich dobór, uwzględniający nowo odkryte szlaki i mechanizmy kancerogenezy. Oznaczono spektrofotometrycznie aktywność 7 enzymów antyoksydacyjnych SOD, CAT, GPx, GR, GST, NQO1 i G6PD. Materiałem do badań była frakcja cytozolowa wątroby i nerek pobrana od szczurów. Oznaczono też stężenie zredukowanego glutationu w homogenacie wątroby. Badano stopień peroksydacji lipidowej, i to zarówno endogennej jak i indukowanej, we frakcji mikrosomalnej wątroby (metodą TBARS) i stężenia grup karbonylowych ( metodą immunoenzymatyczną), uszkodzenia DNA (testem kometowym SCGE). Bardzo istotnym elementem badań pozwalającym wnikać w mechanizmy chemoprewencji badanych procesów ,było określenie wpływu DMU-212 na ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne w wątrobie. W tym celu,

z izolowanego z homogenatu RNA, w reakcji odwrotnej transkrypcji syntezowano cDNA, które poddano amplifikacji metodą Real time quantitative PCR (RT-qPCR). Stosując odpowiednie startery i sondy mierzono emisję fluorescencji, proporcjonalną do stężenia powstających produktów. Oznaczano także parametry biochemii klinicznej w osoczu krwi ALT, AST, GGT, LDH, SDH, kreatyniny i białka całkowitego, wykonano badania immunohistochemiczne skrawków wątroby stosując różnorodny zestaw przeciwciał (m.in. PCNA, p53, R61 itp.) i techniki obrazowania. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

Na wyróżnienie zasługuje interesująco przeprowadzona dyskusja, wskazująca na dobrą znajomość problemu i szeroką wiedzę m.in. ciekawe rozważania nad przyczyną braku korelacji między aktywnością badanych enzymów a ekspresją mRNA ze wskazaniem na modyfikacje post-translacyjne oraz proteosomalną degradację białka w systemie proteosom-ubikwityna ; czy wpływ kumulacji disulfidu glutationu na zależność GSH/GPx. Szczególnie interesująca jest analiza udziału dwóch białek, transkrypcyjnego Nrf2 i Keap1 oraz obszaru ARE (antioxidant response element) tj. mechanizmu Nrf2-Keap-1-ARE w działaniu chemoprewencyjnym antyoksydantów.

### **Ocena dorobku naukowego**

Pani mgr Ewelina Petzke jest współautorką 3 prac: jednego doniesienia zjazdowego i dwóch prac doświadczalnych, opublikowanych w renomowanych czasopismach Drug Chemical Toxicology (IF=1.25) i Human Experimental Toxicology (IF=1.604). Druga z wymienionych dotyczy badań w ramach pracy doktorskiej. Ponadto zgłoszony jest manuskrypt kolejnej pracy.

**Podsumowując**, badania wykonane przez Panią mgr Ewelinę Petzke, poszerzają ogólną wiedzę o antyoksydantach, dostarczają dowodów na zależność dawka/odpowiedź, której nieznaną może wywołać efekt odwrotny do oczekiwanego korzystnego. Wyniki dostarczają istotnych informacji o mechanizmie działania chemoprewencyjnego DMU-212, pokazują charakterystyczną dla ksenobiotyków zróżnicowaną toksyczność narządową (np. obserwowany spadek peroksydacji lipidów w wątrobie a wzrost w nerkach po podaniu NDEA). Badania pokazują złożoność i wielowątkowość szlaków przemian w organizmach żywych. Na uznanie zasługuje więc wielka rozwaga i ostrożność w wysuwaniu ostatecznych wniosków.

Chociaż sugestia o badaniu DMU-212 w większych dawkach budzi moje wątpliwości, to jednak biorąc pod uwagę fakt, że resweratrol jest dopuszczony w dawkach do 300mg/kg m.c., być może powinna być uwzględniona. Z obowiązku recenzenta chcę zwrócić uwagę na nieliczne błędne lub niejasne sformułowania np. – na str. 120 cyt. ” jon karboniowy jest zdolny do nukleofilowego alkilowania DNA” – raczej jon (kation) karboniowy jest zdolny do elektrofilowego ataku na nukleofilowe centra DNA;- na str. 119 - cyt. „indukcja grup karbonylowych jest trudna” pewnie chodzi o indukcję procesu utleniania do grup karbonylowych

i sugestia: przy charakterystyce dysmutazy ponadtlenkowej dobrze byłoby nawiązać do terminu „dysmutacja”.

Przytoczone uwagi w niczym nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej pracy, która jest ważnym wkładem w nauki farmaceutyczne, w tym badania toksykologiczne. Wyniki pracy doktorskiej Pani mgr Eweliny Petzke mają duże znaczenie poznawcze i praktyczne. Sposób przeprowadzenia badań i ich wnikliwa analiza świadczą o wysokich kompetencjach naukowych Doktorantki w rozwiązywaniu niełatwych problemów naukowych. Praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. **Zwracam się zatem, z pełnym przekonaniem, do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Prof. dr hab. Anna Długosz

*Anna Długosz*