

Dr hab. n.med. prof. nadzw. Elżbieta Rębas

Zakład Neurochemii Molekularnej

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Recenzja pracy doktorskiej

mgr Magdaleny Ewy Szejek

„Antyoksydanty polifenolowo – polisacharydowe z roślin leczniczych z rodziny *Rosaceae* i *Asteraceae* jako radioprotektory”

Celem przedstawionej do recenzji pracy była ocena zdolności do radioprotekcji preparatów roślinnych zawierających związki o strukturze glikokoniugatów polifenolowych i ich aglikonów, wyizolowanych z roślin leczniczych z rodziny *Rosaceae* i *Asteraceae*. Podjęto także próbę wyjaśnienia mechanizmu radioochronnego działania badanych związków. Biorąc pod uwagę uciążliwość efektów ubocznych radioterapii oraz liczbę pacjentów, którzy są jej corocznie poddawani, niezwykle ważne jest by stworzyć lepsze warunki leczenia w tak trudnym dla pacjenta okresie. Dlatego tak istotne jest znalezienie większej liczby łatwiej dostępnych związków, które bez ubocznych efektów, polepszają jakość życia podczas radioterapii, nie zmniejszając jednocześnie jej skutecznego, niszczącego wpływu na komórki nowotworowe. Jak sama doktorantka pisze, szukanie idealnego radioprotektora, który posiadałby minimalną toksyczność w stosunku do całego organizmu, działanie wybiórcze - ochrona komórek zdrowych (podczas radioterapii napromieniowaniu ulegają nie tylko komórki nowotworowe lecz także okoliczne tkanki zdrowe) bez ochrony komórek nowotworowych jest bardzo trudne. Dodatkowo pożądane są pewne właściwości fizyko-chemiczne takiego związku jak brak interakcji z innymi lekami podawanymi w trakcie terapii, długi okres półtrwania, stabilność, rozpuszczalność i łatwość podania. Nie bez znaczenia jest też czynnik ekonomiczny. Związki o działaniu radioochronnym często pozyskiwane są z roślin egzotycznych, co powoduje znaczny wzrost końcowej ceny preparatu. Dlatego podjęcie przez Doktorantkę badań, zmierzających do znalezienia radioprotektora, posiadającego większość

Department of Molecular Neurochemistry
Medical University of Lodz

92-215 Łódź | 6/8 Mazowiecka Str.
tel. (+ 48 42) 272 56 84 | fax. (+48 42) 272 56 79
e-mail: elzbieta.rebas@umed.lodz.pl
www.umed.pl

z wymienionych cech i dostępnego cenowo uważam za jak najbardziej uzasadnione. Przyjęty przez Doktorantkę model oraz podjęcie badań nad mechanizmem działania badanych związków – potencjalnych radioprotektorów uważam za zasadne, tym bardziej, że dostępne są nieliczne doniesienia literaturowe na ten temat, a informacje na temat potencjalnych radioprotektorów, zarówno syntetycznych jak i naturalnych są czasem sprzeczne, niepełne lub związki są w trakcie badań. Obecnie praktycznie jest tylko jeden związek zatwierdzony do użytku klinicznego, amifostyna, która jednak ze względu na wysoką cenę i skutki uboczne stosowana jest tylko w terapii wybranych nowotworów.

Rozprawa doktorska jest opracowaniem liczącym 130 stron i podzielonym klasycznie na Część teoretyczną (29 stron), Założenia i cel pracy (1 strona), Materiały i metody (28 stron), Wyniki (27 stron), Dyskusję (11 stron) oraz Podsumowanie i Wnioski (1 strona). Proporcje poszczególnych rozdziałów są prawidłowe. W pracy zamieszczono także streszczenie w języku polskim i angielskim (na końcu) a całości dopełnia zamieszczony na początku rozprawy spis stosowanych skrótów, w języku polskim i angielskim. Skróty wyjaśniane są także w tekście, przy pierwszym użyciu.

We wstępie/części teoretycznej doktorantka wystarczająco przedstawia dostępny w literaturze stan wiedzy na temat rodzajów promieniowania na jakie narażony jest człowiek, nie tylko promieniowania wykorzystywanego w medycynie, lecz także naturalnego. Więcej miejsca Doktorantka poświęca skutkom działania promieniowania jonizującego na komórkę, opisując wpływ promieniowania na funkcjonowanie białek, lipidów oraz na strukturę DNA. Następnie opisuje cechy związków o właściwościach radioochronnych oraz ich potencjalne źródła. Doktorantka związki te podzieliła ze względu na sposób działania na radioprotektory, mitygatory i leki oraz przedstawiła charakterystykę wybranych radioprotektorów syntetycznych i naturalnych, w tym głównie pochodzenia roślinnego oraz wybranych mitygatorów. Część ta uzupełniona jest dziewięcioma ilustracjami, a cały wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie w tematykę pracy i świadczy o teoretycznym przygotowaniu Doktorantki do podjęcia prac doświadczalnych oraz o dobrej znajomości tematu. Warto podkreślić, że Doktorantka jest również pierwszym autorem i współautorką prac przeglądowych opublikowanych w 2015 i 2016 roku, których tematem były właśnie radioprotektory i ich właściwości.

Doktorantka powołuje się na raport GIOŚ z 2012 roku pisząc jednocześnie, że raport o stanie środowiska w Polsce opracowywany jest nie rzadziej niż raz na 4 lata – może dostępne są nowsze dane dotyczące udziału różnych źródeł promieniowania w Polsce. Ponadto, może warto było wspomnieć, że instytucjami odpowiedzialnymi za monitorowanie promieniowania, zarówno naturalnego jak i stosowanego celowo m.in. w medycynie w Polsce zajmują się Państwowa Agencja Atomistyki oraz Centralne Laboratorium Ochrony Radiologicznej. Warto też było podać definicje jednostek promieniowania i narażenia na promieniowanie (np mSv, Gy) stosowanych później w pracy.

W podrozdziale „Radioprotektory pochodzenia roślinnego” Doktorantka wspomina o grupie tzw. radiouczulaczy. Są to ważne informacje, powinny się jednak znajdować w osobnym podrozdziale na końcu Wstępu. Dodatkowo doktorantka opisuje kwercetynę raz jako radiouczulacz, drugi raz jako radioprotektor. Dobrze byłoby rozwinąć głębiej ten złożony mechanizm działania kwercetyny, tym bardziej że Autorka stosuje w swoich badaniach kwercetynę jako związek referencyjny.

Ponadto nie NADPH generuje tylko enzym i niejasne jest dla mnie użycie zwrotu: receptor kinazy serynowo-treoninowej.

Na kolejnej stronie rozprawy jasno przedstawione zostały założenia i cel pracy. Celem pracy było zbadanie czy preparaty roślinne o strukturze glikokoniugatów polifenolowych i ich aglikony wyizolowane z wybranych roślin leczniczych takich jak *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, wykazują właściwości radioochronne in vitro. Do zadań badawczych należały: a) ocena cytotoksyczności badanych glikokoniugatów polifenolowych (do badań użyto fibroblasty mysie L929 oraz komórki jednojądrzaste krwi), b) określenie wpływu badanych związków na indukowane promieniowaniem gamma: stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA i apoptozę w komórkach jednojądrzastych krwi oraz w osoczu oraz c) określenie wpływu badanych glikokoniugatów polifenoli na indukowany promieniowaniem gamma stres oksydacyjny i apoptozę w komórkach białaczki linii K562.

Kolejny rozdział to Materiały i metody. Zwraca uwagę znajomość technik wykorzystywanych w biologii molekularnej stosowanych przez Autorkę. Wśród nich wymienić należy m.in. techniki z zakresu hodowli komórkowych, pomiary aktywności enzymów, cytometrię

przeptywową, spektrofotometrię, elektroforezę, testy badające uszkodzenia DNA, mikroskopię fluorescencyjną. Doktorantka w wielu doświadczeniach stosowała gotowe zestawy do oznaczeń, zostały one jednak prawidłowo dobrane i zostały zastosowane prawidłowe próby kontrolne. Rozdział ten zawiera 4 tabele w których Autorka przedstawiła zawartość fenoli i skład części polisacharydowej w badanych preparatach roślinnych. Preparaty roślinne oraz ich charakterystykę chemiczną uzyskano z Zakładu Chemii Medycznej I Mikrobiologii Politechniki Wrocławskiej w ramach współpracy naukowej. Ponieważ izolacja glikokoniugatów polifenoli z badanych roślin chroniona jest patentem, procedura została opisana w skróconej formie. Kolejne procedury zostały opisane przez Autorkę bardzo dokładnie. Zarówno linie komórkowe, jak i metody zostały dobrane prawidłowo do realizacji zaplanowanych doświadczeń, a różnorodność metod wskazuje na bardzo dobre przygotowanie Doktorantki do pracy doświadczalnej.

Zabrakło mi w opisie badań uzasadnienia stosowania różnych dawek promieniowania tj. 10, 15 Gy lub 100, 200 i 500 Gy w zależności od stosowanego materiału biologicznego a także informacji czy stosowane w eksperymentach dawki można odnieść do dawek stosowanych w radioterapii.

Uzyskane wyniki przedstawiono przy użyciu 24 czytelnych i starannie wykonanych rycin oraz 3 tabel. Budzi moje zastanowienie zmiana stężeń badanych związków w poszczególnych eksperymentach np. początkowo stosowano stężenia 1,6 30 $\mu\text{g/ml}$ lub 25 $\mu\text{g/ml}$ co przyjęto za stężenie optymalne. W kolejnych doświadczeniach używano 6, 30 i 150 $\mu\text{g/ml}$ a nawet 750 $\mu\text{g/ml}$ przy czym ostatnie dwa stężenia nie były badane wcześniej np. pod kątem cytotoksyczności. W kolejnych badaniach stężenia znów wynosiły 5, 10, 25 i 50 $\mu\text{g/ml}$ więc były w zakresie początkowo stosowanych ale jednak zmienione.

Dyskusja to 11 stron tekstu, na których Doktorantka omawia uzyskane wyniki i porównuje je z doniesieniami dostępnymi w literaturze światowej co pozwoliło Autorce na wyciągnięcie kilku wniosków, które zostały przedstawione w kolejnym rozdziale pt. Podsumowanie i Wnioski.

Niewątpliwie wynikiem zasługującym na podkreślenie jest wykazanie, że badane polifenole z roślin z rodziny *Rosaceae* i *Asteraceae*, szczególnie z *Sanguisorba officinalis*, wykazują działanie radioochronne i co ważniejsze ich działanie jest selektywne tzn. wykazują radioprotekcję tylko wobec komórek prawidłowych, natomiast nie chronią komórek nowotworowych (w tym

przypadku komórek K562). Spełniają więc kryterium radioprotektora. Doktoranta wykazała także że głównym mechanizmem radiochronnego działania badanych polifenoli jest ich aktywność antyoksydacyjna. Dodatkową ważną informacją jest to, że niektóre z badanych związków działają ochronnie, zmniejszając poziom uszkodzeń DNA, podawane zarówno przed napromieniowaniem, jak i po napromienieniu.

Umieszczony na końcu spis literatury obejmuje 184 pozycje, z szerokiego okresu od roku 1947 do najnowszych danych z 2018 roku. Jednak ok 90 % prac cytowanych w rozprawie to artykuły opublikowane po roku 2000. Śledząc najnowszą literaturę, doktorantka umieściła w pracy także dane z prac opublikowanych w latach 2017 – 2018 (ok. 10%). Co ważne, najnowsze artykuły zostały wykorzystane w rozdziale Dyskusja, a więc Doktorantka porównuje swoje wyniki z jak najbardziej aktualnymi doniesieniami.

Co warto podkreślić Autorka rozprawy jest współautorem pięciu artykułów oryginalnych opublikowanych w liczących się czasopismach zagranicznych o zasięgu światowym ze współczynnikami IF: 2,673; 3,671; 3,671; 1,687 i 1,522 (w dwóch jest pierwszym autorem – IF 2,673; 3,671) oraz współautorką dwóch artykułów przeglądowych wspomnianych wcześniej. Wyniki prac były także przedstawiane w formie doniesień na 15 konferencjach krajowych i zagranicznych.

Doktorantka jest także współautorem zgłoszenia patentowego – „Zastosowanie roślinnego środka przeciwutleniającego w ochronie przed promieniowaniem jonizującym”.

Praca przygotowana jest starannie, niewielka liczba błędów stylistycznych i gramatycznych (pomyłka w numeracji ryciny 18 – jest 17, brak spacji pomiędzy wyrazami), a całość napisana jest poprawnym językiem.

Podsumowując, praca zawiera elementy nowości, doświadczenia i model badawczy są przemyślane i zaplanowane prawidłowo, a uzyskane wyniki wnoszą nową wiedzę na temat potencjalnego zastosowania polifenoli w radioterapii oraz komórkowego mechanizmu ich ochronnego działania. **Przedstawiona do recenzji praca w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim i uzasadnia nadanie Pani mgr Magdalenie Szejki stopnia naukowego doktora. Zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony**

Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz. 595 z późn.zm.).

dr hab. n.med. prof. nadzw. Elżbieta Rębas



Łódź, 25 maja 2018