



Instytut Farmakologii
Polskiej Akademii Nauk

INSTYTUT FARMAKOLOGII
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ul. Smętna 12
31-343 Kraków

Dyrektor
telefon: (12) 662 32 96
(12) 637 48 93

Centrala

telefon: (12) 662 32 20
(12) 637 40 22

fax: (12) 637 45 00

e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

Kraków, 05.11. 2015

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Bartosza Pomiernego pt. "Ocena neurotoksycznego działania eterów glikolu etylenowego – badania *in vitro* oraz *in vivo*".

Etery glikolu etylenowego (EGE) są szeroko stosowane w gospodarstwie domowym głównie z uwagi na ich korzystne właściwości fizykochemiczne. EGE są składnikami farb, lakierów, płynów chłodniczych, ale także stosowanych rutynowo środków czyszczących, opakowań spożywczych, a nawet niektórych materiałów medycznych. Niestety coraz więcej obserwacji wskazuje, że u ludzi długotrwałe narażenie na te związki ma działanie hematotoksyczne, gonadotoksyczne oraz prowadzące do dysfunkcji układu odpornościowego. Jak dotąd większość tych obserwacji dotyczy wpływu EGE na układy obwodowe. Najnowsze dane pokazują jednak, że działanie tych eterów może prowadzić do zaburzeń koordynacji ruchowej, funkcji kognitywnych, bóli głowy czy dezorientacji, co daje podstawy aby sądzić o ich niekorzystnym działaniu także w obrębie centralnego układu nerwowego. Jak dotychczas niewiele wiadomo o molekularnych mechanizmach działania eterów glikolu etylenowego i dlatego uważam, że cel badawczy jaki w niniejszej rozprawie postawił sobie mgr Pomierny jest nowatorski, posiada aspekt poznawczy, ale także duże potencjalne znaczenie kliniczne. W mojej ocenie dodatkową wartością pracy jest fakt, iż zaplanowane badania objęły nie tylko ocenę działania EGE i ich metabolitów – kwasów alkoksyoctowych *in vitro* z wykorzystaniem linii komórek ludzkiej neuroblastomy SH-SY5Y, ale także *in vivo* określając wpływ 4-tygodniowego podawania EGE na zmiany wywołane w korze czołowej i hipokampie samców szczurów rasy Wistar.

Niniejsza praca napisana została zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami, składa się na nią 138 stron maszynopisu, 37 rycin oraz 3 tabele.

Wstęp liczący 27 stron podzielony został na podrozdziały, w których opisano na podstawie bardzo dobrze dobranej literatury piśmiennictwa poznane dotychczas działanie gonadotoksyczne, hematotoksyczne oraz immunotoksyczne eterów glikolu etylenowego. Autor zebrał także w sposób jasny i czytelny dane sugerujące ich potencjalne działanie

neurotoksyczne, wskazując na prawdopodobne mechanizmy tego ich działania z uwzględnieniem zaburzeń metabolicznych, stresu oksydacyjnego, excytotoksyczności oraz śmierci komórek na drodze nekrozy, apoptozy oraz autofagii. Z obowiązku Recenzenta wspomnę tylko o pewnych powtórzeniach w tym rozdziale tak jak np. na stronie 12 gdzie podano informację, że ME indukuje w spermatocytach mitochondrialną ścieżkę apoptozy poprzez nasilanie ekspresji białek Bax oraz Bak (Bagchi i Waxman, 2008), a następnie powtórzono ją w kolejnym fragmencie wstępu (na str. 19). Dane zamieszczone przez Doktoranta we wstępie potwierdzają zasadność wybranego celu pracy oraz opisanych na następnych stronach rozprawy metod służących do jego realizacji. Dobór modeli doświadczalnych oraz schematów badawczych zarówno *in vivo* jak i *in vitro* nie budzą zastrzeżeń.

Uzyskane wyniki w modelu 4 tygodniowego, przez 5 dni w tygodniu, podawania związków samcom szczurów opisano starannie dokumentując je rycinami. Podkreślić należy, że forma tej części rozprawy została gruntownie przemyślana przez Autora i wskazuje na jego konsekwencję (np. w doborze kolorów i oznaczeń poszczególnych grup na rycinach). W modelu zwierzęcym wykazano, że EGE, a w szczególności 2-fenoksyetanol oraz 2-butoksyetanol, zmniejszały całkowitą aktywność antyoksydacyjną oraz nasilały peroksydację lipidów w korze czołowej oraz hipokampie. Związki te wykazały także działanie proapoptotyczne (ocenione przez wzrost ekspresji kaspazy-3 i kaspazy-9 oraz modulację białek regulatorowych procesu apoptozy). Co więcej w kolejnym etapie przeprowadzonych badań biochemicznych pokazano ich istotny wpływ na wychwyt i metabolizm glukozy w mózgu (tj. nasilenie procesu glikolizy oraz zaburzenia w cyklu Krebsa).

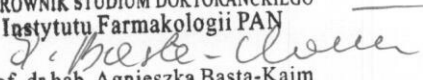
W rozdziale Wyniki mgr Pomierny opisał również rezultaty uzyskane w modelu *in vitro* z użyciem hodowli komórek ludzkiej neuroblastomy SH-SY5Y rozszerzając grupę badanych związków o metabolity EGE, kwasy alkoksyoctowe. Pewien mój niedosyt budzi brak przedstawienia na rycinach 31 i 32, działania stężenia 5 mM PHA oraz PHE na aktywność metaboliczną komórek SHSY5Y (test MTT) oraz na poziom dehydrogenazy mleczanowej (test LDH), ponieważ właśnie te stężenia zostały użyte w kolejnych oznaczeniach do badań molekularnych mechanizmów działania tych związków, co niewątpliwie potwierdziłoby trafność ich wyboru przez Doktoranta. Podobnie przedstawienie na rycinie 35 efektu działania stosowanych modulatorów na komórki kontrolne ułatwiłoby interpretację uzyskanych przez Autora wyników z ich zastosowaniem. Generalnie w badaniach *in vitro* wykazano, że silniejsze działanie toksyczne wykazują metabolity eterów glikolu etylenowego niż same EGE, a o sile ich działania decyduje ich budowa fizyko-chemiczna. Najsilniejsze niekorzystne działanie mgr Pomierny wykazał dla związków o właściwościach lipofilowych jak 2-fenoksyetanol czy 2-butoksyetanol. Oceniając mechanizm ich toksycznego działania Doktorant wykonał szereg oznaczeń z zastosowaniem inhibitorów kinaz białkowych co doprowadziło do wykazania, że w

mechanizmie działania 2-fenoksyetanolu oraz 2-butoksyetanolu istotną rolę pełnią ścieżki związane zarówno z kinazą syntazy glikogenu (GSK-3b), kinazami aktywowanymi mitogenami (MAPK), jak i kinazą białkową C (PKC), ilustrując tym samym brak selektywności wewnątrzkomórkowej działania tych związków.

Dyskusję liczącą 17 stron, którą dla ułatwienia podzielono na podrozdziały mgr Pomierny przeprowadził w sposób zwarty, merytoryczny potwierdzając tym samym doskonałą znajomość dostępnego piśmiennictwa dotyczącego przedmiotu rozprawy. O dojrzałości naukowej Autora świadczy umiejętność wskazania na ograniczenia przeprowadzonych przez niego badań oraz obiektywizm przy interpretacji uzyskanych wyników. Szkoda, jednak że uzyskanych wyników nie przedstawiono w formie kolejnych punktów w końcowym rozdziale dysertacji. Niedosyt budzi także brak jasno sformułowanych wniosków płynących z przeprowadzonych badań. Cieszy natomiast fakt, że Doktorant dostrzega konieczność prowadzenia dalszych badań dotyczących wpływu tych związków na komórki ośrodkowego systemu nerwowego. W mojej ocenie szczególnie rozszerzenie badań w oparciu o techniki immunohistochemiczne oraz immunofluorescencyjne może niezwykle wzbogacić dane o udziale tej grupy związków w patogenezie chorób o podłożu neurodegeneracyjnym. Niech mi będzie wolno w tym miejscu wysłuchać komentarz Doktoranta w tej sprawie ze wskazaniem na profil i kierunek badań jego zdaniem priorytetowy w tym zakresie, oczywiście mając na uwadze wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie. Ocenianą pracę doktorską kończy streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz 151 pozycji piśmiennictwa.

Reasumując praca mgr Bartosza Pomiernego jest w mojej ocenie wysoce wartościowa i wnosi nowe spojrzenie na mechanizmy molekularnego działania eterów glikolu etylenowego w centralnym układzie nerwowym. Wartość dysertacji podnosi nie tylko bardzo dobre zaplanowanie badań, ale także przeprowadzenie ich równolegle w dwóch modelach *in vivo* i *in vitro*. Z pełnym przekonaniem uważam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa pt. "Ocena neurotoksycznego działania eterów glikolu etylenowego – badania *in vitro* oraz *in vivo*" spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i dlatego przedkładam wniosek o dopuszczenie mgr Bartosza Pomiernego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na nowatorski charakter przeprowadzonych badań oraz duże znaczenie poznawcze uzyskanych wyników stanowiących w przyszłości mocny trzon do ich praktycznego zastosowania wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Basta-Kaim
Kierownik Studiów Doktoranckich IFPAN

KIEROWNIK STUDIUM DOKTORANCKIEGO
Instytutu Farmakologii PAN

Prof. dr hab. Agnieszka Basta-Kaim