KATEDRA I ZAKŁAD PATOFIZJOLOGII
UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W LUBLINIE
ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin
tel.: +48-81-448-65-00
fax: +48-81-448-65-01
kierownik: prof. zw. dr hab. n. med. Stanisław J. Czuczwar
(czuczwarsj@yahoo.com)

Recenzja pracy doktorskiej „Ocena neurotoksycznego działania eterów glikolu etylenowego – badania in vitro oraz in vivo" wykonanej przez mgr. Bartosza Pomiernego w Zakładzie Biochemii Toksykologicznej Katedry Toksykologii na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusławy Budziszewskiej

Liczba przypadków chorób neurodegeneracyjnych rośnie, prawdopodobnie także na skutek działania różnych ksenobiotyków, które poprzez długotrwałą ekspozycję mogą prowadzić do stopniowej utraty neuronów ośrodkowych. Dlatego tak istotnym jest poznanie ewentualnych ksenobiotyków będących zagrożeniem pod tym względem, gdyż dopiero wiedza na ten temat pozwala na zmniejszenie lub eliminację istniejącego zagrożenia. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska znakomicie wpisuje się w ten typ badań naukowych, które charakteryzują własności toksykologiczne szeregu substancji używanych np. szeroko w celach przemysłowych. Jest kwestią oczywistą, iż narażenie na etery glikolu etylenowego jest względnie duże a efekty ich działania na ośrodkowy układ nerwowy są praktycznie nieznane. Dlatego też cel rozprawy zakładający szerokie zbadanie ewentualnego

działania neurotoksycznego eterów glikolu etylenowego uważam za niezwykle istotny. Za bardzo cenne uważam również zaplanowanie badań in vitro, dzięki czemu możliwa była ocena toksykologiczna metabolitów badanych ksenobiotyków oraz zbadanie mechanizmów działania neurotoksycznego.

Oceniana dysertacja doktorska ma układ typowy dla tego typu rozpraw, liczy 159 stron wydruku komputerowego i zawiera 37 kolorowych rycin, 3 tabele oraz 151 pozycji piśmiennictwa. Liczący 28 stron Wstęp został napisany, moim zdaniem, bardzo dobrze. Autor zawarł informacje istotne dla dalszych części pracy doktorskiej i wystrzegał się powtórzeń. Dlatego też potencjalny czytelnik nie będzie miał problemów z zaznajomieniem się z niezbędną wiedzą na temat specyfiki eterów glikolu etylenowego. Doktorant przedstawił znaczenie tych ksenobiotyków w różnych gałęziach przemysłu oraz dokonał przeglądu danych na temat ich toksyczności w odniesieniu do szeregu układów i/lub narządów. Istotna część Wstępu dotyczy gonado- , immuno- oraz hematotoksyczności eterów glikolu etylenowego. Bardzo interesujący jest przegląd danych sugerujących możliwość neurotoksycznego działania eterów glikolu etylenowego. Doktorant słusznie dowodzi, że jedynie pośrednio można zakładać toksyczne działanie tych ksenobiotyków na mózg na bazie ich efektów ośrodkowych, takich jak ataksja, zaburzenia koordynacji ruchowej, czy też zaburzeń funkcji poznawczych u osób narażonych. Podczas dalszych rozważań przytaczane są kolejne dowody pośrednie, jak np. fakt istnienia w mózgu enzymów zaangażowanych w metabolizm eterów glikolu etylenowego oraz generowanie przez etery glikolu etylenowego wolnych rodników. W badaniach na innych tkankach wykazano ponadto wywoływanie przez etery glikolu etylenowego apoptozy, zwiększanie ekspresji białek proapoptotycznych i zmniejszenie ekspresji białek antyapoptotycznych. Wreszcie, zdaniem Doktoranta, koronnym argumentem na rzecz neurotoksycznego działania eterów glikolu etylenowego może być zaburzanie przez nie metabolizmu glukozy, kluczowego czynnika energetycznego dla

neuronów. Wstęp kończą dwa podrozdziały na temat mechanizmów neurotoksycznego działania ksenobiotyków oraz typów śmierci komórkowej. W podrozdziałach tych umieszczono szereg szczegółowych danych, także z ostatnich lat, charakteryzujących szczególnie stres oksydacyjny, mechanizmy ekscytotoksyczności oraz zaburzenia energetyczne mózgu. Bardzo dokładnie zostały także scharakteryzowane typy śmierci komórkowej na poziomie zachodzących procesów enzymatycznych, jonowych i receptorowych.

Metodykę pracy przedstawiono na niemal 35 stronach wydruku komputerowego. Scharakteryzowano użyte zwierzęta doświadczalne i warunki prowadzenia eksperymentów oraz opisano schemat przewlekłego podawania stosowanych eterów glikolu etylenowego. Następnie przedstawiono sposób oznaczania markerów stresu oksydacyjnego, ocenę procesu apoptozy, oznaczanie markerów metabolizmu glukozy oraz stężenia białka w homogenatach kory czołowej i hipokampa szczurów. Część metodyczną, dotycząca eksperymentów in vivo, kończy opis zastosowanych metod statystycznych. Część metodyczna odnośnie badań in vitro zawiera opisy stosowania testowanych ksenobiotyków i ich metabolitów na hodowle komórek SH-SY5Y oraz metody oceny żywotności komórek. Co istotne, żywotność komórek oceniano w obecności szeregu inhibitorów kinaz białkowych celem wyodrębnienia mechanizmów neurotoksycznego działania badanych substancji. Podobnie, jak w przypadku doświadczeń in vivo, także tę część kończy opis stosowanych metod statystycznych.

Wyniki zajmują 39 stron wydruku i są ilustrowane 32 kolorowymi, czytelnymi rycinami, na których w doświadczeniach in vivo oddzielnie przedstawiono wyniki badań biochemicznych dla kory czołowej i hipokampa. W dużym skrócie, badane związki zmniejszały całkowitą aktywność antyoksydacyjną oraz nasilały proces peroksydacji lipidów w obu badanych strukturach mózgu. Ponadto stwierdzono wyraźne efekty proapoptotyczne poprzez ścieżkę mitochondrialną apoptozy. Najbardziej aktywne pod względem działania

neurotoksycznego były 2-fenoksyetanol (PHE) i 2-butoksyetanol (BE). Związki te także zmniejszały stężenie czynników transportujących glukozę i nasilały glikolizę przy równoczesnym hamowaniu uczestnictwa pirogronianu w cyklu Krebsa.W modelu in vitro wykazano działanie uszkadzające komórki także przede wszystkim dla dwóch wspomnianych wyżej substancji o charakterze lipofilnym, przy znacznie mniej nasilonym efekcie substancji hydrofilnej – 2-etoksyetanolu. Co więcej, metabolity stosowanych substancji charakteryzowały się bardziej zaznaczonym efektem neurotoksycznym. Modyfikacja funkcji szeregu kinaz białkowych prowadziła do zmiany efektów neurotoksycznych, co słusznie, zdaniem Doktoranta, wskazuje na udział wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału w wywoływaniu neurotoksyczności.

Omówienie wyników świadczy o dużej znajomości tematu przez Doktoranta. Dyskusję rozpoczyna od ewidentnej neurotoksyczności substancji lipofilnych w modelu in vitro, co jego zdaniem może świadczyć o ich lepszej penetracji do wnętrza komórek. Dalsza część dyskusji została poświęcona problemowi metabolizmu badanych związków i silniejszego działania neurotoksycznego metabolitów. Konieczność wykonania badań in vivo jest bardzo dobrze uzasadniona, gdyż można w nich rozważyć stopień przechodzenia badanych ksenobiotyków przez barierę krew-mózg oraz bardziej zbliżyć się do warunków naturalnej ekspozycji. Uzyskane wyniki na temat nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu w obecności badanych ksenobiotyków mogą wg Doktoranta być jednym z mechanizmów neurotoksyczności, przy czym znowu związki lipofilne okazały się być bardziej toksyczne. Bardzo ciekawe jest wytłumaczenie zwiększenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w hipokampie po narażeniu na BE i PHE – zdaniem Doktoranta jest to efekt niekorzystny przy równoczesnym spadku aktywności katalazy i peroksydazy glutationowej, co może skutkować niemożnością rozkładu dużych ilości nadtlenku wodoru. Obszerna część dyskusji dotyczy proapoptotycznego działania badanych ksenobiotyków oraz mechanizmów

ich działania neurotoksycznego. Niezwykle trafna jest interpretacja wyników dotyczących aktywności enzymów uczestniczących w procesie glikolizy. Doktorant rozważał zarówno osłabienie jak i wzmożenie glikolizy – po gruntownej analizie wszystkich „za" i „przeciw" osłabieniu doszedł do wniosku, iż w korze czołowej procesy glikolizy są raczej nasilone. Z drugiej strony wejście pirogronianu w cykl Krebsa w hipokampie jest zmniejszone. Zgadzam się z głównym przesłaniem rozprawy, sugerującym, iż należy poważnie rozważyć udział eterów glikolu etylenowego w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. Tym samym wyniki rozprawy po raz pierwszy sugerują taką możliwość.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na kilka kwestii:

- Badania zostały przeprowadzone na szczurach szczepu, a nie rasy, Wistar.
- Str. 63 – stwierdzenie „Dla zmian istotnych statystycznie przeprowadzono test post hoc Dunett'a" jest nieścisłe. Test post hoc przeprowadza się celem ustalenia istotności statystycznej pomiędzy grupami badanymi i grupą kontrolną lub wybranymi grupami badanymi.
- Str. 75 – zdanie „Narażenie na PHE skutkowało zmniejszeniem aktywności tego enzymu tylko w korze czołowej, jednak ta zmiana nie była istotna statystycznie" jest niewłaściwe. Z punktu widzenia statystyki aktywność enzymu nie została istotnie zmieniona.
- Str. 105, p. 4.5.1., w. 3 – jeśli metabolit wywierał silniejsze działanie od związku macierzystego, to była to substancja PHA a nie PHE.
- Str. 118 – dyskutując wyniki innych autorów i posługując się dawkami w mg/kg, Doktorant powinien przeliczyć ich wielkość na stosowane w pracy dawki wyrażone w μmol/kg.

- Pozycja 108 literatury – brak jest, poza rokiem opublikowania, pozostałych danych bibliograficznych.

Przedstawione przez mnie uwagi nie wpływają istotnie na wysoki merytoryczny poziom przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. Chciałbym podkreślić jej pionierski charakter oraz ostrożność Doktoranta przy generalizowaniu wniosków nt. neurotoksyczności eterów glikolu etylenowego. Zwraca także uwagę staranna redakcja dysertacji oraz jej duża przejrzystość. Moim zdaniem spełnia ona wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i to upoważnia mnie do wystąpienia do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego UJ CM o dopuszczenie mgr. Bartosza Pomiernego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na pionierski charakter otrzymanych wyników uważam, iż rozprawa mgr. Pomiernego powinna otrzymać wyróżnienie.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Patofizjologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Prof. dr hab. Stanisław Czuczwar

Lublin, 07.11.2015