

Prof. dr hab. Lech Michalczuk  
Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza medycyny Jeffrey'a E. de Graft-Johnsona p.t. „*In vitro* studies on the ferric-ion reducing ability of plant phenolics and their pro- and antioxidant activity in an iron-mediated hydroxyl radical oxidizing system”

Polifenole są dużą grupą związków organicznych występujących powszechnie w tkankach roślinnych, w szczególności w warzywach i owocach. Pomimo częstego występowania, ich funkcja w roślinach nie jest w pełni poznana. Znacznie więcej natomiast wiadomo o ich oddziaływaniu na organizmy zwierząt, w tym na zdrowie ludzi. Wyniki wielu badań wykazały, że dieta bogata w warzywa i owoce zmniejsza prawdopodobieństwo zachorowania na choroby układu krążenia i niektóre nowotwory. Ten korzystny wpływ przypisuje się wysokiej zawartości polifenoli, których dzienna konsumpcja przy zrównoważonej diecie może wynosić do 1 mg. Istnieją też doniesienia, że polifenole, spożywane jako składnik żywności lub w postaci suplementów diety, mogą także przeciwdziałać niektórym chorobom neurodegeneracyjnym, osteoporozie i cukrzycy. Powszechnie uważa się, że korzystny wpływ polifenoli na organizm zwierzęcy polega na ich zdolności do redukcji wolnych rodników, a przez to do ochrony kwasów nukleinowych, białek i tłuszczów przed uszkodzeniem oksydacyjnym. Ostatnio coraz więcej wyników badań wskazuje jednak, że polifenole oddziałują także bezpośrednio na metabolizm komórek poprzez interakcję z receptorami i białkami biorącymi udział w transdukcji sygnału. Należy jednak podkreślić, że istnieją także badania kwestionujące korzystny wpływ polifenoli na zdrowie człowieka. Biorąc pod uwagę, że polifenole stanowią bardzo liczną grupę związków, różniących się zarówno budową jak i właściwościami fizykochemicznymi, a także bardzo skomplikowaną materię, jaką jest etiologia chorób i metody jej badania, takie rozbieżności wyników badań nie powinny dziwić. Wskazuje to na potrzebę dalszych badań, które pozwolą wyjaśnić właściwości fizykochemiczne poszczególnych związków polifenolowych i ich aktywność biologiczną. Z tego względu, podjęcie badań nad właściwościami antyoksydacyjnymi wybranych polifenoli było w pełni uzasadnione.

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 126 stron, z czego 42 strony zajmuje wprowadzenie, prezentacja stanu wiedzy w dziedzinie objętej pracą dokorską z powołaniem

się na dostępną literaturę i uzasadnienie podjęcia badań, 9 stron opis metodyk i materiałów stosowanych w badaniach, 18 stron opis uzyskanych wyników i 12 stron dyskusja i wnioski. Ponadto w pracy, napisanej po angielsku, zamieszczono liczące 7 stron streszczenie w języku polskim. Wykaz cytowanej literatury liczy 114 pozycji.

We wprowadzeniu autor przedstawił istniejący stan wiedzy o naturalnych polifenolach występujących w roślinach a także o mechanizmach obrony przed stresem oksydacyjnym w organizmie człowieka. Przegląd ten, oparty o dane z najnowszej literatury, jest obficie ilustrowany rysunkami przedstawiającymi budowę cząsteczek omawianych związków oraz schematy procesów metabolicznych, co jest szczególnie przydatne dla czytelników mających ograniczoną wiedzę o biochemii polifenoli. Cel i zakres badań został przedstawiony jasno i precyzyjnie.

Opis metodyki badań jest czytelny, z jednym wyjątkiem. Identyfikację polifenoli w ekstrakcie z jabłek wykonano na podstawie spektrum absorpcji w ultrafiolecie, jednakże spektra takie są zbyt mało informatywne, aby na ich podstawie rozróżnić związki o bardzo zbliżonej budowie, jakimi są glukozydy kwercytyny. Autor powołuje się tutaj na metodykę stosowaną w pracy Schieber A., Keller P., Carle R., 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 910: 265-273, jednakże w pracy tej identyfikację związków prowadzono za pomocą spektrometrii masowej, podczas gdy pomiar absorpcji w ultrafiolecie służył tylko do detekcji związków eluowanych z kolumny podczas chromatografii. Zastanawia też dobór standardów analitycznych: rutyny (kwercytyno-6-O-L-ramnozylo-D-glukozydu), kwercytyny i kwercytriny, z których w ekstrakcie z jabłek wykryto tylko ten ostatni. Ponadto, w opisie standardów użyto tylko nazwy zwyczajowej tego związku (quercetrin) a przy opisie chromatogramu tylko jego nazwy chemicznej według IUPAC (quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside), co u niespecjalisty może wywołać wrażenie, że są to dwa różne związki. Nie jest też jasne, czemu w oznaczeniach aktywności antyoksydacyjnej stężenia polifenoli w ekstrakcie jak i stężenia oczyszczonych glukozydów kwercytyny podawano w przeliczeniu na zawartość rutyny, skoro tego glukozydu nie wykryto w ekstrakcie (aczkolwiek występowanie rutyny w jabłkach zostało potwierdzone w szeregu innych badań).

Wątpliwości budzi także nazewnictwo niektórych pochodnych polifenoli (flawonoidów). W opisie chromatogramu (rysunek 12) podano, że w ekstrakcie z jabłek wykryto dwa glukozydy kwercytriny (quercetrin-3-O- $\beta$ -D-xylopyranoside i quercetrin-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside), która sama jest glukozydem (ramnozydem) kwercytyny (quercetin-3-

rhamnoside, CAS database no. 522-12-3). Jeżeli takie nietypowe związki wykryto, należałoby podać, na jakiej podstawie je zidentyfikowano i bliżej objaśnić ich budowę. Być może, jest to jednak tylko błąd literowy i w rzeczywistości były to odpowiednio arabinozyd jak i ksylozyd quercetyny, które w jabłkach faktycznie występują. Należy jednak podkreślić, że wyniki te przedstawione zostały w rozdziale „Materiały i metody” i nie były zasadniczą częścią badań.

Ciekawe, że w ekstrakcie etanolowym z jabłek wykryto tylko pochodne kwercytny, podczas gdy w owocach tych występuje znacznie więcej polifenoli (patrz praca cytowana powyżej).

Wyniki badań przedstawiono w sposób czytelny w sześciu tabelach i na czterech wykresach. Wykazano, że aktywność przeciwutleniająca badanych polifenoli, oznaczana jako zdolność do redukcji jonów żelaza Fe(III) (ferric reducing ability power, FRAP), zależy od ich budowy chemicznej, przy czym szczególne znaczenie ma obecność w ich cząsteczce struktury pirokatechiny (1,2-dihydroksybenzen). Surowy ekstrakt z jabłek oraz mieszanina oczyszczonych glukozydów kwercytny podawane w podobnych stężeniach (w przeliczeniu na zawartość rutyny) miały wyższą aktywność w teście FRAP niż polifenole w stanie czystym, w tym sama rutyna. Jednakże dodatek tych związków do surowicy krwi nie wpłynął znacząco na jej aktywność antyoksydacyjną.

Testowane polifenole miały bardzo zróżnicowany wpływ na reakcję utleniania deoksyrybozy przez rodnik hydroksylowy generowany w reakcji Fentona. Tylko 5 z nich z powodowało spowolnienie tego procesu a 7 go przyspieszało. Reakcja ta była skorelowana ze zdolnością badanych związków do redukcji jonów żelaza.

Wnioski ogólne.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach przewodu doktorskiego dostarczyły nowych danych na temat związku pomiędzy strukturą polifenoli roślinnych a ich aktywnością antyoksydacyjną. Doświadczenia zostały dobrze zaplanowane i wykonane a wyniki dobrze udokumentowane. Kilka drobnych usterek technicznych, o których wspomniałem powyżej, nie umniejsza wartości pracy. Tym bardziej, że dotyczą one części metodycznej a nie głównego celu projektu. Na podkreślenie zasługuje fakt, że część wyników zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej została już opublikowana prestiżowym czasopiśmie naukowym „Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology”.

W mojej opinii przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełni wymogi określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i Ustawy z dnia 18 marca 2011 roku o zmianie ustawy – Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz o zmianie niektórych innych ustaw. W związku z powyższym stawiam wniosek do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lekarza medycyny Jeffrey E. de Graft-Johnsona do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Skierniewice, 14.04.2014.

  
Prof. dr hab. Lech Michaleczuk