

Recenzja pracy

pt.: „*In Vitro* Studies on the Ferric-Ion Reducing Ability of Plant Phenolics and their Pro – and Anti - Oxidant Activity in an Iron – Mediated Hydroxyl Radical Oxidizing System”

lekarza medycyny Jeffrey’a E. de Graft – Johnson’a

w ramach dysertacji na stopień doktora nauk medycznych

Przesłanki teoretyczne wskazują, że polifenole należą do najbardziej sprzyjających zdrowiu zewnątrzpochodnych czynników antyoksydacyjnych. Budowa chemiczna gwarantuje ich właściwości jako tak zwanych zmiataczy rodników, a ponadto wpływają na absorpcję i metabolizm ustroju. W wielu badaniach epidemiologicznych wykazywano, że dieta bogata w polifenole zmniejsza ryzyko miażdżycy i jej następstw, chorób nowotworowych oraz ogólną umieralność.

Szczegółowe badania tak zwanej diety śródziemnomorskiej, a zwłaszcza opublikowane kilka miesięcy temu wyniki badań brytyjskich wskazują, że istoty dobroczynnych właściwości tego typu odżywiania należy doszukiwać się nie tyle w szczególnym składzie lipidowym, ile właśnie w zawartości polifenoli. Z drugiej jednak strony podawanie sztucznie wytworzonych polifenoli w wysokich dawkach całkowicie zawiodło. Oczekiwany efekt prozdrowotny był znacznie gorszy niż efekt placebo i polegał na zwiększonej zachorowalności na chorobę wieńcową, w tym najcięższe epizody krążeniowe oraz na nowotwory. W pewnych warunkach tak zwane antyoksydanty mogą zatem wykazywać właściwości prooksydacyjne *in vitro*, co tłumaczy obserwowane niekorzystane zjawiska zdrowotne.

Mechanizmy antyoksydacyjne oparte o systemy enzymatyczne i nieenzymatyczne zostały dobrze poznane. Od pewnego czasu wiadomo natomiast, że tak powszechnie dobrze oceniane substancje jak kwas askorbinowy lub tokoferol tworzą długożyjące wolne rodniki. Ponadto uwalniane w toku reakcji Fentona i Habera - Weissa wolne rodniki powstają także w ustroju. Właśnie kwas askorbinowy uczestniczy w reakcji Fentona, co jest zapewne w ustroju przyczyną produkcji wolnych rodników hydroksylowych.

Lekarz medycyny Jeffrey E. de Graft – Johnson podjął się próby oceny stanu równowagi pomiędzy anty i prooksydacyjnymi właściwościami polifenoli, a zatem wybrany temat rozprawy jest nowoczesny, uzasadniony i doskonale wywiedziony. Obszerny wstęp zawierający przejrzyste tabele i ryciny jest logicznym, szczegółowym i wyczerpującym wywodem celu pracy.

Jako model oksydacyjno-redukcyjny zastosowano zdolność utleniania deoksyrybozy przez nadtlenek wodoru w obecności jonów Fe^{2+} (system generujący rodnik hydroksylowy) oraz test FRAP (Ferric Reducing Ability Power) – mierzący aktywność danego związku do redukcji jonów Fe^{3+} do Fe^{2+} . Autor postawił sobie także za cel analizę właściwości pro i antyoksydacyjnych w zależności od budowy chemicznej poszczególnych polifenoli. Oceniono 17 związków tego typu.

Zwracam także uwagę na bezcenny element oceny naturalnie występujących polifenoli, jakimi było zastosowanie wyciągu z jabłek oraz oczyszczonej kwercetyny jabłkowej. Wykazano, że polifenole korygują FRAP oceniany jako redukcja Fe^{3+} na zasadzie reakcji dawka – odpowiedź. Przy zastosowaniu stężeń mierzonych w $\mu\text{mol/l}$ najwyższe wartości pod tym względem wykazywał kwas askorbinowy. Bardzo ciekawe wyniki, o podobnych właściwościach dawka – odpowiedź daje ocena wpływu na FRAP wyciągu jabłkowego oraz oczyszczonych glikozydów kwercetynowych. Spośród 7 polifenoli użytych do oceny FRAP osocza żaden nie wpływał na redukcję żelaza w zastosowanych stężeniach 0.1. do 0.2 $\mu\text{mol/l}$. Jednakże mieszanina tych czynników w stężeniu 0.2 $\mu\text{mol/l}$ znacząco podniosła wartość FRAP. Warto zwrócić uwagę, że kwas askorbinowy w stężeniach 0.5 $\mu\text{mol/l}$ znacząco podnosi wartość FRAP.

Hamowanie utlenienia deoksyrybozy w tym modelu wskazuje na zdolność danego związku do zmiatania rodnika hydroksylowego lub hamowanie jego tworzenia w reakcji Fentona. W tym eksperymencie tylko 5 spośród 17 testowanych (w stężeniu bardzo wysokim, bo wynoszącym 10 $\mu\text{mol/l}$) polifenoli i ich metabolitów wykazywało właściwości antyoksydacyjne – hamowało utlenienie deoksyrybozy. W tych warunkach najwyższe prooksydacyjne działanie cechowało kwas askorbinowy.

Autor przeprowadził ciekawą analizę pro i antyoksydacyjnych właściwości polifenoli na tle hamowania lub zwiększania utlenienia deoksyrybozy stwierdzając, że decyduje o tym liczba

grup OH, obecność pierścienia katecholowego oraz grup karboksylowych przy pierścieniu katecholowym, a także liczba podwójnych wiązań. Korelacja z liczbą grup OH a natężeniem hamowania utleniania była ewidentna. W modelu wielowariantowym regresji wielkość FRAP korelowała z obecnością pierścienia katecholowego.

W ciekawej dyskusji Autor próbuje dokonać analizy znaczenia biologicznego polifenoli wskazując na ich, z jednej strony wysoce prawdopodobny wpływ prozdrowotny, z drugiej na niepełną zależność wpływu na FRAP w warunkach *in vivo*.

Spośród zastosowanych czynników tylko 5 polifenoli lub ich metabolitów wykazało hamujący wpływ na utlenianie deoksyrybozy, reszta działała pro-oksydacyjnie.

Analiza chemiczna ukazuje, że im wyższa liczba grup OH tym wyższe właściwości antyoksydacyjne. Elementy strukturalne polifenoli odpowiadają za dekompozycję nadtlenu wodoru w reakcji Fentona. Grupy OH są odpowiedzialne za efekt zmiatania rodnika hydroksylowego. Można założyć, że właściwości prooksydacyjne (podwyższenie utleniania deoksyrybozy) korelują z wysokim FRAP, a zatem kwas askorbinowy z punktu widzenia zdrowia wykazuje w wyższych stężeniach cechy najbardziej podejrzane o szkodliwość. Jednak innych 7 czynników, w tym kwercetyna i katechina nie wpłynęły na FRAP.

Trudno ocenić całkowity bilans anty i prooksydacyjnych polifenoli *in vivo*, gdyż stężenia tych czynników w surowicy są wielokrotnie niższe niż w przewodzie pokarmowym. Z drugiej jednak strony właściwości buforujące tak zwanych soków trawiennych w bieżącym badaniu nie zostały ocenione. Zwracam także uwagę na możliwość współdziałania wielu polifenoli, zarówno w przewodzie pokarmowym oraz wzajemnych interakcji podczas przechodzenia przez jelito, jak i w surowicy. To jest także moje pytanie do doktoranta, gdyż jako klinicysta jestem przede wszystkim zainteresowany sumarycznym efektem biologicznym polifenoli. Pragnę zatem jeszcze raz podkreślić, że zastosowanie wyciągu owocowego w bieżącym doświadczeniu uważam za wyjątkowo cenne.

Wnioski z pracy są wyczerpujące i przedstawione jasno.

Przedstawioną mi do recenzji dysertację oceniam jako wywiedzioną w samo sedno, perfekcyjną od strony merytorycznej i doskonale udokumentowaną.

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów postępowania o nadanie tytułu doktora nauk medycznych oraz o wyróżnienie tej wybitnej pracy.

Kl. H. Piśmiński
Kliniki Pneumologii i Alergologii
i Katedry Chorób Infekcyjnych
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi


Prof. dr hab. n. med. Paweł Gąscki