



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

RN-BF 4000.2.2019
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO RP/18396/2023
RADY DYSCIPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE
Podpis *J. Joraleste*
13.10.2023

Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej | Zakład Chemii Leków
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 54 50
www.famacja.cm-uj.krakow.pl

Kraków, 08.10.2023

Prof. dr hab. Krzysztof Kamiński
E-mail: k.kaminski@uj.edu.pl
Tel. 12 620 54 59
Kom. 602441759

Ocena

rozprawy doktorskiej pt. *„Wpływ wybranych ksenoestrogenów i hiperglikemii na aktywność inhibitorów aromatazy w badaniach modelowych in vitro”* wykonanej przez mgr Kamilę Boszkiewicz w Katedrze i Zakładzie Toksykologii UMW pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Piwowar.

Recenzja została przygotowana na podstawie uchwały nr 30/2023 Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z dnia 6 lipca 2020 r.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o monotematyczny cykl czterech prac, w tym trzech oryginalnych i jednej przeglądowej, opublikowanych w latach 2020–2023 w czasopismach specjalistycznych o uznanej renomie w środowisku naukowym. Łączny współczynnik IF wspomnianych publikacji jest wysoki i wynosi 13,571, a liczba punktów MEiN to 480. Warto podkreślić, iż w każdym z wymienionych manuskryptów Doktorantka jest autorem pierwszym i korespondencyjnym, co potwierdza jej kluczową rolę w prowadzonych badaniach, a także w redagowaniu poszczególnych manuskryptów. Stwierdzenie to potwierdzają oświadczenia pozostałych współautorów, które zostały dołączone do rozprawy doktorskiej. W mojej ocenie, poruszona przez Doktorantkę tematyka badawcza, dotycząca wpływu wybranych i powszechnie występujących ksenoestrogenów (jony Cr^{3+} i Al^{3+}) w warunkach normo- i hiperglikemii na skuteczność inhibitorów aromatazy (letrozolu i eksemestanu) jest aktualna i szczególnie istotna z punktu widzenia badań podstawowych; natomiast może mieć również wymiar praktyczny, tj. optymalizowanie farmakoterapii hormonozależnego raka piersi u pacjentek po menopauzie. Rangę problemu naukowego wzmacnia również fakt, iż rak piersi należy od wielu lat do najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych u kobiet, u których jednym z istotnych czynników ryzyka jest cukrzyca, a ponadto Doktorantka skupia swoje zainteresowania badawcze na najważniejszej grupie leków wykorzystywanych w tym wskazaniu, tj. inhibitorach aromatazy.

Rozprawa doktorska ma formę zwięzłego autoreferatu przygotowanego w języku polskim podsumowującego najważniejsze osiągnięcia, na który składają się wprowadzenie, cel pracy, opis zastosowanych materiałów i metod badawczych, dyskusja wyników badań opisanych w poszczególnych publikacjach tworzących cykl oraz danych uzyskanych

w warunkach normo- i hiperglikemii, podsumowanie i wnioski. Rozprawę uzupełnia wykaz zastosowanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz trafnie dobrana i aktualna bibliografia obejmująca 81 pozycji (niestety spis ten został przygotowany trochę niedbale, brakuje m.in. zakresu stron w poz. 22, a dodatkowo Doktorantka niekonsekwentnie uwzględnia w danych bibliograficznych wolumeny, numery, a także pełne i skrócone nazwy czasopism). W dysertacji znajduje się również charakterystyka dorobku naukowego Doktorantki, uwzględniająca inne publikacje i doniesienia konferencyjne, a także informacja dotycząca źródła finansowania badań – dwa projekty subsydiowane ze środków Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, których kierownikiem była Pani mgr Kamila Boszkiewicz. Opracowanie uzupełniono o kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów poszczególnych manuskryptów. **Oświadczenia te pozwalają na precyzyjną ocenę wkładu twórczego Kandydatki, który w przypadku wszystkich artykułów tworzących cykl był bez wątpienia najbardziej znaczący i obejmował badania *in vitro*, analizę otrzymanych danych, a także prace edytorskie związane z przygotowaniem publikacji.** Tego typu konstrukcja opracowania, tj. forma autoreferatu z dołączonymi publikacjami, jest w pełni uzasadniona, ponieważ uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały opublikowane. **Według mojej opinii, rozprawa została napisana w sposób logiczny, poprawnie pod względem językowym, a krótki wstęp, precyzyjne określenie proponowanego do rozwiązania problemu badawczego oraz zwięzłe omówienie uzyskanych wyników, ułatwiają podążanie za tokiem myślowym Autorki w odniesieniu do planowania kolejnych eksperymentów, interpretacji wyników i wyciągania wniosków końcowych.**

Informacje zamieszczone we wstępie rozprawy w zwięzły, ale satysfakcjonujący i wyczerpujący sposób podsumowują aktualną wiedzę na temat raka piersi, jego epidemiologii, patofizjologii, klasyfikacji, sposobów leczenia z uwzględnieniem farmakoterapii i szczególnym naciskiem na hormonoterapię. Ponadto, Doktorantka charakteryzuje również ksenoestrogeny (w tym metaloestrogeny będące przedmiotem badań), jako potencjalne czynniki środowiskowe kancerogenezy, a także na podstawie danych literaturowych wskazuje na podwyższone ryzyko wystąpienia raka piersi u kobiet cierpiących na hiperglikemię lub cukrzycę. **W mojej opinii wprowadzenie przedstawiono w sposób przejrzysty i doskonale koresponduje ono z problemem naukowym, który został zdefiniowany i rozwiązany w oparciu o prawidłowo dobrane techniki badawcze w dalszej części rozprawy.**

Zasadnicze cele badań opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały określone precyzyjnie i obejmowały ocenę wpływu metaloestrogenów (Cr^{3+} i Al^{3+}) na skuteczność wybranych inhibitorów aromatazy – eksemestanu i letrozolu w modelu komórkowym hormonozależnego raka piersi. Na uwagę zasługuje również fakt, iż przeprowadzone eksperymenty rozszerzono o dodatkową zmienną tj. określenie tej interakcji w warunkach normo- i hiperglikemii. Podejście to jest w pełni uzasadnione, uwzględniając fakt, iż ryzyko wystąpienia raka piersi oraz cukrzycy zwiększa się istotnie wraz z wiekiem kobiet. **Dyskusyjne wydaje się natomiast określenie przeglądu literatury jako pierwszego celu rozprawy, ponieważ jest to czynność oczywista, która zawsze poprzedza badania eksperymentalne, i na podstawie której buduje się problem lub hipotezę badawczą.**

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę obejmowały szeroki i zróżnicowany panel testów *in vitro*, które umożliwiły szczegółowe i wyczerpujące podejście do postawionego problemu naukowego. W pracach laboratoryjnych wykorzystano linię hormonozależnego raka

piersi (MCF-7) oraz linię oporną na dokсорubicynę (MCF-7/DOX), które poddano ekspozycji na wybrane metaloestrogeny, inhibitory aromatazy oraz ich kombinacje, zarówno w warunkach normoglikemii, jak i hiperglikemii. Efektywność badanych leków bez lub w kombinacji z metaloestrogenami oceniono w oparciu o test żywotności komórek (XTT), cytometryczną ocenę apoptozy/nekrozy, analizę cyklu komórkowego, a także ilościową analizę stężeń białek zaangażowanych w proces apoptozy (Bcl-2, BAX) lub angiogenezy (VEGF-A). Dodatkowo, w oparciu o przeprowadzoną metaanalizę dotyczącą działań niepożądanych raportowanych w badaniach klinicznych, przeanalizowany i przedyskutowany został profil bezpieczeństwa inhibitorów aromatazy (z uwzględnieniem preparatów będących przedmiotem rozprawy), w odniesieniu do zaburzeń ze strony układu krążenia (m.in. nadciśnienia tętniczego, zaburzeń rytmu serca, niedokrwienia mięśnia sercowego i innych) oraz efektów metabolicznych (hiperglikemia, wzrost masy ciała lub dyslipidemia). Chociaż zadanie to nie koresponduje bezpośrednio z zasadniczymi celami rozprawy, w mojej ocenie stanowi bardzo ciekawy dodatek do części teoretycznej dysertacji i może być cennym uzupełnieniem wiedzy dla szerszego grona czytelników.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki dowiodły, iż w warunkach normoglikemii, metaloestrogeny w kombinacji z inhibitorami aromatazy prowadziły do obniżenia skuteczności leków w obu liniach komórkowych (MCF-7 i MCF-7/DOX), natomiast efektu tego nie obserwowano w przypadku hiperglikemii (warto podkreślić w tym miejscu, iż siła tego efektu była uzależniona od badanego preparatu i stosowanego stężenia). Jednocześnie w eksperymencie bez obecności ksenoestrogenów aktywność badanych leków ulegała osłabieniu przy wysokim stężeniu glukozy, co sugeruje zdaniem Doktorantki, iż poziom glukozy posiada istotnie silniejszy wpływ na skuteczność inhibitorów aromatazy niż ich kombinacja z metaloestrogenami. Również w tym przypadku obserwowany efekt zależał od badanego układu lek/stężenie, i był m.in. wyraźniejszy dla eksemestanu i dla wyższego stężenia letrozolu na linii MCF-7. Warto podkreślić, że silniejszy wpływ hiperglikemii na efektywność testowanych inhibitorów aromatazy obserwowano również w ilości komórek ulegających nekrozie i apoptozie (Ryc. S3), a także na podstawie stosunku Bcl-2/BAX (Ryc. S5) w szczególności na linii MCF-7. **W moim przekonaniu dane te są interesujące, natomiast wyciągnięty wniosek mógłby zostać dodatkowo wzmocniony poprzez przetestowanie aktywności ww. leków w układach z różnym stężeniem cukru w celu wykazania, czy efekt ten jest zależny od poziomu glukozy.** Ponadto w ramach prac statystyczno-obliczeniowych, na podstawie przeprowadzonej metaanalizy, Doktorantka dowiodła, iż stosowanie inhibitorów aromatazy stwarza podwyższone ryzyko wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych oraz zaburzeń gospodarki węglowodanowej (w tym cukrzycy). Reasumując, wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* sugerują, iż w warunkach normoglikemii metaloestrogeny mogą obniżać skuteczność hormonoterapii przy zastosowaniu inhibitorów aromatazy. Ponadto, hiperglikemia może sama w sobie obniżać efektywność wspomnianej grupy leków, co w efekcie może przekładać się na niższą skuteczność farmakoterapii u kobiet cierpiących na cukrzycę. **W rezultacie, uzyskane w prezentowanych badaniach wyniki, poparte dalszymi obserwacjami przedklinicznymi *in vivo*, a w szczególności klinicznymi, mogą przyczynić się do opracowania nowych wytycznych hormonoterapii lub modyfikacji sposobu dawkowania inhibitorów aromatazy u pacjentek z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej (hiperglikemia lub cukrzyca).**

W moim przekonaniu jedną z mocnych stron badań jest wybór inhibitorów aromatazy reprezentujących pod względem strukturalnym dwie odmienne klasy, tj. związki o budowie niesteroidowej (letrozol) oraz steroidy (eksemestan). Takie podejście pozwala na zredukowanie ryzyka związanego z wpływem struktury na potencjalną interakcję danego leku z badanymi metaloestrogenami, tj. jonami Al^{3+} i Cr^{3+} , a przez to uzyskane wyniki mają lub mogą mieć charakter uniwersalny i spójny dla całej grupy inhibitorów aromatazy. W przypadku analizy wyników zdecydowanie brakuje natomiast krótkiej dyskusji zakończonej hipotezą badawczą, która sugerowałaby możliwe przyczyny braku wpływu metaloestrogenów na żywotność komórek w eksperymencie z hiperglikemią. Warto również nadmienić, iż otrzymane dane w warunkach normo- i hiperglikemii w kombinacji z jonami Al^{3+} i Cr^{3+} lub w przypadku jej braku sugerują raczej efekt synergistyczny w układzie metaloestrogen-hiperglikemia.

Metodyka badań *in vitro*, które stanowią podstawę ubiegania się Kandydatki o stopień doktora, została opisana zarówno w rozprawie, jak i publikacjach oryginalnych w sposób przejrzysty, szczegółowy i wyczerpujący. W mojej ocenie zakres badań został skonstruowany prawidłowo i kompleksowo, co umożliwiło rozwiązanie postawionego problemu naukowego, a w efekcie uzyskane wyniki mogą posłużyć w przyszłości do optymalizowania hormonoterapii raka piersi u pacjentek po menopauzie, a w szczególności u kobiet chorujących równocześnie na cukrzycę. Oceniana rozprawa doktorska mimo że posiada głównie charakter eksperymentalny, charakteryzuje się również bardzo mocną podbudową teoretyczną w tym przeprowadzoną metaanalizą (patrz publikacja 2), co zdecydowanie wzmacnia jej walor poznaczy, a taką kombinację danych eksperymentalnych i literaturowych uważam za niezwykle cenną dla tego typu opracowań.

Podsumowując, uzyskane wyniki uważam z całym przekonaniem za oryginalne i wartościowe dla rozwoju dyscypliny nauki farmaceutycznej, a formę ich dyskusowania za satysfakcjonującą i wyczerpującą na podstawie uzyskanych danych. Doktorantka w sposób jasny formułuje zakładane cele, umiejętnie dobiera odpowiednie narzędzia badawcze służące do rozwiązania problemu naukowego, planuje logicznie kolejne i wielokierunkowe eksperymenty oraz prawidłowo analizuje i interpretuje uzyskane wyniki, co dowodzi jej biegłości w obszarze badawczym, który reprezentuje i co wskazuje zarazem na jej dojrzałość naukową, wymaganą od Kandydatów do stopnia doktora.

Wywiązując się z roli recenzenta, chciałbym zwrócić uwagę na drobne niedociągnięcia i pewne wątpliwości, które pojawiają się po lekturze tytułowej rozprawy. Chciałbym jednak zaznaczyć, że uwagi te nie mają charakteru merytorycznego, a wybrane punkty mogą posłużyć w przyszłości do precyzyjniejszego planowania badań oraz wnikliwszej dyskusji wyników, a w rezultacie do opracowania kolejnych wartościowych publikacji:

- Wykaz stosowanych skrótów wydaje się być niepełny, brakuje w nim m.in. skrótu PI (patrz strona 23), który odnosi się do jodku propidyny. Ponadto, z punktu widzenia czytelnika, korzystniejsze byłoby zamieszczenie go na początku opracowania, a nie jego końcu,
- Dyskusyjne wydaje się „wyrzucenie” nadciśnienia tętniczego z grupy zaburzeń sercowo-naczyniowych, które zostały wylistowane jako punkty końcowe publikacji nr 2 na stronie 28. W istocie nadciśnienie tętnicze klasyfikowane jest jako najczęstsza choroba sercowo-naczyniowa. Ponadto, w mojej ocenie stwierdzenie na stronie 29, dotyczące podwyż-

szego ryzyka incydentów sercowo-naczyniowych w grupie leczonych inhibitorami aromatazy w oparciu o porównanie z grupą leczoną tamoksyfenem jest dość ryzykowane, a wnioskowanie to powinno wynikać raczej z konfrontacji z grupą *placebo*,

- Zgodnie z prezentowanymi wynikami, linia MCF-7/DOX z nadekspresją glikoproteiny P (P-gp) jest mniej wrażliwa na działanie zarówno inhibitorów aromatazy, jak i metaloestrogenów. Czy na tej podstawie można twierdzić, że za efekt ten odpowiada P-gp?
- Należy uzasadnić dobór stężeń zarówno inhibitorów aromatazy, jak i metaloenzymów w kombinacjach badanych *in vitro* (np. wartość 100 μM zarówno dla leków jak i jonów metali wydaje się bardzo wysoka i niemożliwa do osiągnięcia w warunkach fizjologicznych). Czy są przesłanki literaturowe, np. dane farmakokinetyczne, które potwierdzają zastosowanie eksemestanu w stężeniu 200 μM ?
- Z jakiego powodu w badaniach nie przewidziano podobnego zakresu analiz tamoksyfenu (antagonisty receptorów estrogenowych), który ze względu na powszechność stosowania, wydaje się być równie ciekawym do analizy lekiem,
- Jakie jest ryzyko wchłonięcia jonów Al^{3+} przez skórę po ich zastosowaniu powierzchniowym (np. antyperspiranty) i czy wchłanianie to może być na tyle efektywne, żeby wpłynąć na skuteczność inhibitorów aromatazy?
- Pewną trudnością jest uwzględnienie w numeracji stron opracowania publikacji będących załącznikami 1–4, przez co załącznik 5 – Całkowity dorobek naukowy i 6 – Oświadczenia współautorów, posiadają odpowiednio stronę 136 i 139, jednak numery te nie zostały wydrukowane. W mojej ocenie korzystniej byłoby zamieścić ww. publikacje jako ostatnie załączniki rozprawy, a kolejne strony rozprawy konsekwentnie ponumerować.

Reasumując, pod względem merytorycznym i formalnym przedłożona do oceny rozprawa doktorska, autorstwa mgr Kamili Boszkiewicz spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), zatem wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Kamili Boszkiewicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Mając na uwadze kompleksowość i wysoki poziom naukowy przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej, a także fakt, że opisane w niej wyniki są przedmiotem trzech prac oryginalnych i jednej przeglądowej o sumarycznym IF = 13,571, w których Doktorantka jest głównym autorem, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Kraków, 08.10.2023

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
Zakład Chemii Leków



prof. dr hab. Krzysztof Kamiński

Uniwersytet Jagielloński-Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9
tel./fax 12 62-05-450