

Łódź, 04 10 2023r.

prof. dr hab. n.med. Agnieszka Piastowska-Ciesielska

Zakład Hodowli Komórkowych i Analiz Genomowych
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
90-752 Łódź, ul. Żeligowskiego 7/9

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Kamili Boszkiewicz pt. **Wpływ wybranych ksenoestrogenów i hiperglikemii na aktywność inhibitorów aromatazy w badaniach modelowych in vitro**, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Piwowar w Zakładzie Toksykologii, Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Podstawa formalna recenzji

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu nr 30/2023 z dnia 6 lipca 2023 roku.

Oryginalność, aktualność i przydatność podjętego problemu naukowego

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem wśród kobiet, rocznie dotka 2,1 miliona kobiet na całym świecie co więcej jest najczęstszą przyczyną zgonów kobiet z powodu choroby nowotworowej. W 2020r. w Polsce raka piersi zdiagnozowano u prawie 18 tys. kobiet, co stanowiło ponad 23% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów u kobiet. Etiopatogeneza raka piersi jest złożona i wieloczynnikowa. Wśród najbardziej istotnych czynników ryzyka wymienia się czynniki genetyczne (nosicielstwo mutacji genowej, głównie *BRCA1* i *BRCA2*), czynniki hormonalne (np. stosowanie hormonalnej terapii zastępczej) jak również wiek, otyłość, nadmierna konsumpcja alkoholu, palenie tytoniu, cukrzyca oraz czynniki środowiskowe w tym

ksenoestrogeny zaliczane do związków endokrynnie czynnych (EDC *ang. endocrine disrupting compounds*).

Nowotwór piersi jest chorobą heterogenną. Trzy główne podtypy raka piersi (hormonozależny (luminalny), HER2-dodatni oraz potrójnie ujemny), różnią się między sobą nie tylko częstotliwością występowania ale również wymagają odmiennego podejścia terapeutycznego. Pierwszy z nich - rak hormonozależny (luminalny), występuje u 70% zdiagnozowanych pacjentek charakteryzuje się obecnością co najmniej 1% komórek nowotworowych wykazujących ekspresję receptorów steroidowych. Drugi podtyp rak piersi - HER2 dodatni, charakteryzuje się nadmierną ekspresją receptora HER2 na komórkach nowotworowych oraz nadmierną amplifikacją genu *HER2* a dotyczy 18-20% wszystkich zachorowań. Ostatni z podtypów - potrójnie ujemny raka piersi nie wykazuje ekspresji receptorów steroidowych, ani nadmiernej ekspresji receptora HER2 i jest diagnozowany w około 15% przypadków. Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem dotychczas uznane czynniki ryzyka zachorowania na raka piersi, odpowiadają jedynie za około 36,8% przypadków, co oznacza, że należy weryfikować udział kolejnych czynników w tym związków endokrynnie czynnych w patogenezie nowotworu piersi.

Grupa związków endokrynnie czynnych (EDC, *ang. endocrine disrupting compounds*), od wielu lat przykuwa uwagę badaczy, liczne publikacje potwierdzają, iż należące do tej grupy ksenoestrogeny mogą pobudzać receptory estrogenowe i tym samym konkurować lub naśladować działanie endogennych hormonów. O ich potencjalnym wpływie na skuteczność leczenia nowotworów w tym hormonozależnych nadal niewiele wiemy. W swoich badaniach doktorantka skupia się na metaloestrogenach do których zaliczamy jony metali, w tym, glinu, chromu. Te metaloestrogeny umykają naszej codziennej uwadze choć są składnikami kosmetyków np. sole glinu, będące jednym z głównych składników dezodorantów i antyperspirantów, czy sole chromu [III], znajdujące się w suplementach diety witaminowo-mineralnych, wspomagających odchudzanie, a także regulujących stężenie glukozy we krwi.

Pomimo tego, że możemy być narażeni na związki glinu z wielu różnych źródeł, to uważa się, iż to właśnie regularne stosowanie dezodorantów i antyperspirantów zawierających chlorek glinu [III] lub chlorowodorek glinu [III] odpowiada za największą ekspozycję na jony tego metalu. Badania z wykorzystaniem nowotworowych linii komórkowych MCF-7 pokazały, że glin zakłóca wiązanie się estradiolu z receptorem estrogenowym i naśladuje jego działanie. Potwierdzono również, że w warunkach *in vitro* długotrwałe narażenie na glin w dawce

10-300 μM może prowadzić do nadmiernej i nieprawidłowej proliferacji komórek nabłonka gruczołu piersiowego, a także zwiększać migrację i inwazyjność komórek raka piersi. –Chrom w środowisku występuje na dwóch głównych stopniach utlenienia jako chrom sześciowartościowy - Cr [VI] (uznany przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem za związek kancerogeny.) oraz trójwartościowy - Cr [III] najczęściej spotykany w suplementach diety. Dotychczasowe wyniki badań nie dają jednoznacznej odpowiedzi o cytotoksyczności oraz genotoksyczności Cr [III].

W obliczu naszej niewielkiej wiedzy o możliwym wpływie związków endokrynnie czynnych na efektywnością stosowanych terapii ma wysokie znaczenie poznawcze i praktyczne.

Szacuje się, że nawet jedna trzecia pacjentek z rakiem piersi, choruje również na cukrzycę. Komórki nowotworowe zużywają znacznie więcej glukozy niż komórki prawidłowe, dzięki takiemu mechanizmowi możliwe jest zaspokojenie ich zwiększonego zapotrzebowanie energetyczne. W odróżnieniu od komórek prawidłowych u których hiperglikemia indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych działa ona jako czynnik antyapoptoyczny, promigracyjny, co prawdopodobnie sprzyja powstawaniu przerzutów. Przypuszcza się również, że 40% wyższe ryzyko zgonu w pacjentek onkologicznych z współistniejącą cukrzycą w porównaniu do pacjentek bez cukrzycy jest mniejsza skuteczność stosowanych leków w warunkach hiperglikemii. U odstawy tego zjawiska może leżeć indukcja stres oksydacyjny i powstawanie powstanie reaktywnych form tlenu (ROS, ang. reactive oxygen species) w warunkach hiperglikemii. Nadmiar ROS w komórce aktywuje jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (NF- κ B, ang. nuclear factor kappa B), który odgrywa kluczową rolę w procesie onkogenezy i progresji nowotworu. Nadmierna ekspresja NF- κ B prowadzi do nasilenia proliferacji komórek nowotworowych, angiogenezy oraz zahamowania apoptozy.

Podsumowując w obliczu naszej obecnej wiedzy realizowane przez Doktorantkę badania mają istotny aspekt poznawczy.

Ogólna charakterystyka przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska przedstawiona do recenzji ma formę cyklu czterech publikacji (jednej przeglądowej i trzech oryginalnych) w których Doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. Praca liczy łącznie 144 strony (wraz z załącznikami), jej zasadnicza część to: wykaz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wprowadzenie (podzielone na 4 podrozdziały),

cele pracy, materiały i metody (podzielone na 2 rozdziały), omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy, porównanie wyników uzyskanych w warunkach normo- i hiperglikemii oraz podsumowanie i wnioski. Poza załącznikami w postaci 4 publikacji do pracy dołączono również informacje o źródłach finansowania, wykaz skrótów dane bibliometryczne oraz oświadczenia współautorów.

Ocena przedstawionego do recenzji manuskryptu

W swoich badaniach Doktorantka próbę oszacowania w jaki sposób otaczające nas związki endokrynnie czynne (EDC), coraz częstsza hiperglikemia mogą wpływać na efektywność działania chemioterapeutyków. Recenzowanie rozpraw doktorskich, które powstających w oparciu o cykl publikacji jest zadaniem szczególnym. Recenzent poddaje analizie prace, które podlegały już wnikliwemu osądowi recenzentów i redaktorów czasopism w których zostały opublikowane. Tym samym wiemy, że merytoryczna jakość ocenianych prac została już potwierdzona, czekom odzwierciedleniem jest cytowanie tych prac przez środowisko naukowe. Niemniej jednak, recenzent nadal może znaleźć kilka punktów do dyskusji z autorem.

W swoich badania Doktorantka wykorzystywała linię komórkową MCF-7, która była hodowana w pełnej pożywce wzrostowej DMEM (ang. Dulbecco's modified eagle's medium). Moje pytanie dotyczy następującej kwestii – czy była to pożywka z czerwienią fenelową jeśli tak to jak Doktorantka ustosunkuje się do faktu, że czerwień fenolowa, jest słabym estrogenem i może wiązać się z receptorami znajdującymi się na komórkach MCF7?

Do oceny zmiany żywotności wykorzystano test XTT, którego zasada metody opiera się na reakcji redukcji soli tetrazolowej do formazanu. Czy w świetle naszej obecnej wiedzy możemy stwierdzać, że reakcja ta zachodzi wyłącznie przy udziale enzymów mitochondrialnych?

Do oceny ilościowej stężenia białek doktorantka wykorzystwała testy immunoenzymatyczne ELISA – poproszę o wyjaśnienie dlaczego zrezygnowano z „klasycznego” testu jakościowego jakim jest Western Blot?

Podsumowując, tworzące cykl prace napisane są w sposób czytelny a koncepcja i sposób zaprojektowania badań, oraz ocena uzyskanych wyników nie budzą wątpliwości. Bardzo wysoko oceniam sposób przedyskutowania uzyskanych wyników na tle szeroko przytaczanego piśmiennictwa. Doktorantka jasno pokazuje w Dyskusji elementy nowatorskiego podejścia do

rozwiązywanego problemu naukowego jak również wskazuje dalsze kierunki badań. Przedstawione wnioski są dobrze skonstruowane i oparte o uzyskane wyniki badań.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Przedstawiona do recenzji rozprawa stoi na wysokim poziomie naukowym. Uzyskane wyniki stanowią cenny wkład do dotychczasowej wiedzy na temat mechanizmów łączących:

- metaloestrogeny, normoglikemię oraz efektywność inhibitorów aromatazy (steroidowego AI – eksemestanu oraz niesteroidowego AI – letrozolu) w modelu komórkowym hormonozależnego raka piersi;
- hiperglikemię i efektywność inhibitorów aromatazy w modelu komórkowym hormonozależnego raka piersi;

Doktorantka wykazała dobre opanowanie warsztatu badawczego i dużą sprawność w prowadzeniu badań i interpretacji rzetelnie udokumentowanych wyników. Zastosowane metody badawcze odpowiadają standardom w tego typu badaniach i nie budzą zastrzeżeń.

Stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668. z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym mam zaszczyt przedłożyć wniosek o dopuszczenie Pani mgr Kamili Boszkiewicz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie wskazując na wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników o wysoką aktywność publikacyjną Doktorantki składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.