



Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie  
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin  
Telefon sekr.( 81) 448 64 50 Kier.( 81) 448 6452,  
e-mail: fdik@umlub.pl

Lublin, 31.08.2020 r.

dr hab. n. med. Zofia Danilczuk

## Recenzja

### rozprawy doktorskiej mgr Żanety Broniowskiej pt.: „Niektóre aspekty toksycznego działania pochodnej benzofenonu (BP-2)”

wykonanej w Katedrze Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusławy Budziszewskiej

Obserwacje ostatnich lat dotyczące narastającego zanieczyszczenia środowiska i jego wpływu na organizmy żywe, jest niezwykle ważnym zagadnieniem. Okazuje się, że nawet „niewinne” związki, których nazwa sugeruje działanie ochronne przed szkodliwymi warunkami środowiska, same mogą powodować zaburzenia funkcji organizmu i wykazywać toksyczność.

Tematem badawczym mgr Żanety Broniowskiej, była ocena toksycznego wpływu benzofenonu-2, środka powszechnie stosowanego jako filtr przed promieniowaniem ultrafioletowym (UV). Doktorantka korzystała z grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w Krakowie oraz z dotacji statutowych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Żanety Broniowskiej oparta jest na wynikach doświadczalnych trzech oryginalnych artykułów, opublikowanych w języku angielskim w indeksowanych czasopismach o bardzo dobrej renomie. We wszystkich pracach, wydanych drukiem w latach 2016-2019, których łączny wskaźnik oddziaływania *impact factor* wynosi 10,121, mgr Żaneta Broniowska jest pierwszym autorem, co jednoznacznie świadczy o Jej wiodącym udziale w powstawaniu tych prac.

Już na wstępie, należy podkreślić, że Autorka, na nowo, uporządkowała wyniki i zredagowała kompletne dzieło, o dużej wartości poznawczej. Nie ma wątpliwości, że tak przedstawiona forma rozprawy wymagała od Doktorantki większego nakładu pracy niż napisanie autoreferatu.

Rozprawa doktorska mgr Żanety Broniowskiej liczy 139 stron i ma charakter typowy dla dysertacji. Składa się z przejrzystego przedstawionego spisu treści, wstępu, metodyki, wyników wraz z włączoną dokumentacją (25 wykresów, 5 tabel), dyskusji, podsumowania, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim, referencji (185 pozycji plus dwa raporty), wykazu

skrótów, spisu tabel i rycin oraz spisu własnych publikacji zawierających wyniki przedstawione w rozprawie.

W obszernym wstępie, Autorka, bardzo wnikliwie i logicznie, przeanalizowała wpływ promieniowania ultrafioletowego (UV) na prawidłowe funkcjonowanie organizmu, konsekwencje jego niewłaściwego korzystania, jak i możliwej naturalnej fotoprotekcji przed jego skutkami. Ponieważ naturalna ochrona przed promieniowaniem UV jest niewystarczająca, istnieje konieczność korzystania ze sposobów sztucznej ochrony przeciwsłonecznej. Niekorzystne działanie promieniowania ultrafioletowego, w szczególności na skórę, powodujące często zmiany o charakterze nowotworowym, wymusza potrzebę stosowania preparatów z filtrami UV co jest rekomendowane przez Polskie Towarzystwo Dermatologiczne. Kolejnym zagadnieniem omawianym we wstępie było zapoznanie czytelnika z obecnie stosowanymi i już nie stosowanymi ze względu na obserwowaną toksyczność, filtrami fizycznymi i chemicznymi. Szczególną uwagę Doktorantka poświęciła grupie związków benzofenonu, a przede wszystkim 2,2',4,4'-tetrahydroksybenzofenonowi (benzofenon-2; BP-2), który był przedmiotem Jej badań. Związek ten jest powszechnie stosowany w kosmetologii czy dodawany do opakowań żywności chroniąc ją przed niszcącym działaniem promieni słonecznych, jak również wykorzystywany w przemyśle samochodowym. W oparciu o piśmiennictwo o zasięgu międzynarodowym, Autorka omawia zagadnienia związane z działaniem benzofenonu-2 na organizm człowieka jak również organizmy zwierząt (np. ryby w wodach jezior, rzek) wskutek zanieczyszczonego środowiska tego typu związkami. Należy podkreślić, że mgr Żaneta Broniowska zgromadziła dostępne piśmiennictwo, dotyczące zarówno farmakokinetyki tego związku, jak również jego wpływu na układ endokrynologiczny, ze szczególnym uwzględnieniem badań w układzie rozrodczym, hormonów tarczycy i jej funkcji a także wpływu na komórki centralnego systemu nerwowego. Ponieważ benzofenon-2, z powodu swej budowy, może wykazywać działanie estrogenne, Autorka przedstawiła również najnowsze dane dotyczące receptorów estrogenowych, androgenowych czy progesteronowych, możliwe oddziaływanie na te struktury związków benzofenonu-2 jak również skutki tego oddziaływania.

Cel pracy postawiony jasno i logicznie, wytycza główne kierunki badań.

Benzofenon-2, jako filtr UV, często jest stosowany na dużą powierzchnię ciała i niekiedy przez cały okres życia. Zatem, głównym zadaniem było określenie zdolności benzofenonu-2 do przechodzenia przez barierę krew-mózg i jego wpływu na przeżywalność komórek nerwowych, szczególnie wrażliwych struktur (hipokamp i kora czołowa) na czynniki stresu oksydacyjnego i procesu apoptozy czyli procesów leżących u podstaw chorób neurodegeneracyjnych. Z przytoczonych danych literaturowych wynika, że benzofenon-2 może zaburzać funkcje endokrynologiczne, kolejnym więc celem Doktorantki, było zbadanie wpływu tego związku na wybrane funkcje układu immunologicznego, hormonów płciowych i tarczycy. Bardzo cennym badaniem w kontekście procesu rozrodczego i zapłodnienia, było określenie wydolności gonad, funkcji spermatogenezy oraz prawidłowości w budowie samych plemników narażonych na działanie benzofenonu-2. Należy podkreślić, że efekty działania benzofenonu-2 są dotychczas słabo zbadane a wpływ tego związku na komórki mózgu, aktywność układu immunologicznego, funkcję gonad czy parametry hematologiczne w warunkach *in vivo* nie były w ogóle przedmiotem badań.

Nowoczesny, imponujący warsztat badawczy, opisane jasno i dokładnie, zaopatrzone w schematy i tabele, procedury doświadczalne, budzą zaufanie do przedstawionych wyników. Bogata metodyka pozwala konsekwentnie zrealizować wytyczone cele. Doktorantka stosowała wiele metod badawczych m.in.: zakładała i prowadziła hodowle tkankowe, oznaczała różne

markery cytotoksyczności, oceniała przeżywalność komórek i apoptozę ale także wykorzystwała metody biologii molekularnej oznaczając ekspresję mRNA receptorów estrogenowych ilościową reakcją łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) czy metody immunochemiczne przy ocenie białek (ELISA, Western Blot, barwienia immunofluorescencyjne). Działanie benzofenonu-2 zostało ocenione w badaniach zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

Wyniki eksperymentów, udokumentowane przejrzystymi, z wizualnie przyjemnymi graficznie wykresami i tabelami, uzupełniają w pełni luki w informacjach zaplanowanych zadań. W pierwszym etapie eksperymentu Doktorantka określiła działania cytotoksyczne i pro-apoptotyczne benzofenonu-2 *in vitro*, w różnych stężeniach ( $10^{-8}$  do  $10^{-4}$  M), po 24 – i 72 godzinach ekspozycji na komórki ludzkiej neuroblastomy (SH-SY5Y). Do oceny cytotoksyczności Doktorantka stosowała pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej w pożywce hodowlanej oraz badanie żywotności komórek metodą redukcji MTT. Natomiast, zmiany proapoptotyczne benzofenonu-2 określała przez ocenę aktywności enzymu wykonawczego apoptozy, jakim jest kaspaza-3 oraz przez ocenę kondensacji jąder i obkurczenia komórek, barwionych metodą Hoescht'a. Wyniki badań *in vitro* wpływu benzofenonu-2 na żywotność komórek nerwowych wykazały, że badany związek już w niskich dawkach wywierał działanie pro-apoptotyczne a w wysokich dawkach nekrotyczne. W celu pełnego obrazu działania neurotoksycznego benzofenonu-2, wobec ograniczeń modelu *in vitro* (nie wszystkie komórki nerwowe w tym modelu są obecne), Doktorantka słusznie zdecydowała o przeprowadzeniu badań *in vivo* w modelu zwierzęcym. Oceniała poziom benzofenonu-2 w poszczególnych tkankach oraz skutki oddziaływania badanego związku na wybrane układy organizmu. Dorosłym samcom szczurzym aplikowała na skórę benzofenon-2 w dawce 100 mg/kg m. c. dwa razy dziennie przez okres 4 tygodni. Wykazała, że benzofenon-2 wchłania się do krwi i najwyższe stężenia osiągał w wątrobie i tkance tłuszczowej (odpowiednio 1,3 i 0,8  $\mu\text{g/g}$  tkanki), mniejsze w jadrach (150,92 ng/g tkanki). Benzofenon-2 przechodzi również przez barierę krew-mózg, chociaż jego stężenia w wybranych strukturach (hipokamp i kora czołowa) były niskie (odpowiednio 5 ng/g i 16 ng/g tkanki). Autorka tłumaczy ten fakt słabą penetracją związku do struktur ośrodkowego układu nerwowego, związaną prawdopodobnie z jego budową. Nie mniej ciekawe, iż w tych stężeniach benzofenon-2 nie indukował procesu apoptozy a przeciwnie w korze czołowej zwiększał aktywność antyoksydacyjną, obniżał poziom reaktywnych form tlenu oraz peroksydację lipidów. Takie korzystne efekty można by uznać za działanie neuroprotektoryjne benzofenonu-2, lecz Autorka bardzo ostrożnie i z wielką rozważą komentuje tę zależność jako zmiany adaptacyjne organizmu indukowane niskimi dawkami związku i nie wyklucza, że kolejne ekspozycje lub wydłużenie czasu ekspozycji spowoduje niewydolność mechanizmów kompensacyjnych prowadząc do inicjacji procesów patologicznych.

Bardzo cennymi badaniami mgr Żanety Broniowskiej była ocena wpływu benzofenonu-2 na układ hormonalny, w szczególności na funkcję tarczycy i jąder, ich wzajemne oddziaływanie ale również ich oddziaływanie w układzie immunologicznym. Przy pomocy wielu nowoczesnych procedur badawczych, Doktorantka wykazała, że benzofenon-2 powodował nadczynność tarczycy, które to zaburzenie mogło mieć swój udział w zwiększonej aktywności układu immunologicznego. Okazało się, że benzofenon-2 nasila aktywność metaboliczną i proliferacyjną splenocytów, zwiększa żywotność tymocytów, uwalnianie NO z komórek grasicy i śledziony. Wobec takiego wyniku działania benzofenonu-2, Autorka sugeruje, że istnieje ryzyko rozwoju chorób alergicznych czy chorób o podłożu autoimmunologicznym i dalsza dokumentacja tego aspektu jest bardzo ważna i wysoce aplikacyjna.

Istotnym kolejnym celem, który został zrealizowany przez Doktorantkę, to wpływ benzofenonu-2 na poziom hormonów płciowych i spermatogenezę. Ciekawe, że badany związek zaburzał funkcję gonad, powodując obniżenie poziomu testosteronu a zwiększał poziom  $17\beta$ -estradiolu. Jednocześnie obserwowano obniżenie stężenia hormonu luteinizującego (LH), co Autorka tłumaczy hamującym mechanizmem sprzężenia zwrotnego u samców silnie obniżającego poziom gonadotropin przez zwiększone stężenie  $17\beta$ -estradiolu. Ponadto, mgr Żaneta Broniowska analizowała również wpływ badanego związku na zaburzenia w spermatogenezie, gdzie obserwowwała zmniejszenie ilości plemników oraz ich zmiany morfologiczne oraz wpływ na ich ruch progresywny, kluczowy dla zapłodnienia. Po raz pierwszy został zbadany wpływ benzofenonu-2 na parametry hematologiczne, które pozostały niezmienione.

Analiza statystyczna wyników została zaplanowana prawidłowo i przeprowadzona dogłębnie.

Dyskusja przeprowadzona w sposób bardzo logiczny i przejrzysty, świadczy o szerokiej wiedzy farmakologicznej dotyczącej aspektów zaplanowanych eksperymentów jak i samych procedur wykonawczych prowadzących do rzetelnej dokumentacji badań. Należy podkreślić, Doktorantka zgromadziła imponującą ilość wyników, odpowiednio je zinterpretowała i skonfrontowała z danymi bibliograficznymi. Dyskusja zawiera osobiste spostrzeżenia i uwagi dotyczące badań własnych i innych badaczy, co świadczy o dużej wiedzy i rozwadze Autorki w wyprowadzaniu prawidłowych wniosków.

Ponadto, należy podkreślić, że bardzo dobrym pomysłem jest zaproponowanie czytelnikowi zwięzłego podsumowania wyników, ułatwiającego prześledzenie najważniejszych osiągnięć badawczych.

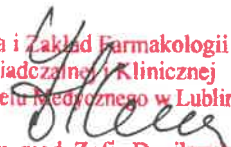
Moim obowiązkiem jako recenzenta była ocena wszystkich aspektów merytorycznych i interpretacyjnych dysertacji mgr Żanety Broniowskiej. Uwagi dotyczą raczej pytań aniżeli krytycznych uwag, gdyż wyniki tej rozprawy były już wcześniej przedmiotem wnikliwych recenzji w publikacjach renomowanych czasopism. Po pierwsze, interesujący jest dla mnie dobór dawki podawanej naskórnice u szczura, czy był to eksperymentalny dobór taki aby otrzymać stężenia toksyczne w badanych tkankach (w tytule : ocena toksyczności), czy zastosowana dawka została zaproponowana na podstawie piśmiennictwa? A jakie ilości (chodzi o uwolnienie jednej porcji, dawki) związków niektórych znanych preparatów z ochronnymi filtrami są aplikowane na skórę podczas kąpieli słonecznych? Czy takie informacje znajdujemy na opakowaniach?

Po drugie, bardzo ciekawe byłyby oznaczenia w osoczu parametrów funkcji wątroby, jako, że w tej tkance znaleziono wyższe stężenia BP-2. Czy były badania oceniające funkcję wątroby po narażeniu na BP-2 i jak długo po kilkukrotnym narażeniu utrzymuje się ich poziom w tkankach?

Powyższe zapytania czy drobne uchybienia literowe nie wpływają w żaden sposób na bardzo pozytywną ocenę powstałego dzieła. Rozprawa doktorska mgr Żanety Broniowskiej została ambitnie zaplanowana, skrupulatnie wykonana a otrzymane wyniki i poprawnie wyciągnięte wnioski aplikują do dalszych badań. Należy podkreślić, że Autorka dołącza istotne komentarze i uwagi co do przyszłości stosowania związków benzofenonu, zarówno u dzieci i dorosłych, szczególnie ze względu na zaburzenia funkcji endokrynologicznych. Praca ma cechy dysertacji nowatorskiej, wnoszącej bardzo praktyczne informacje do życia codziennego i powinna być wykorzystana w propagowaniu powszechnej wiedzy zdrowotnej w społeczeństwie.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Żanety Broniowskiej pt.: "Niektóre aspekty toksycznego działania pochodnej benzofenonu (BP-2)" spełnia wszystkie kryteria ustawowe stawiane dysertacjom naukowym zgodnie z art.13 ust.1 ustawy z dn. 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie

sztuki (Dz. U. Nr 65, poz 595, z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Żanety Broniowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie składam wniosek i proszę o wyróżnienie rozprawy. Uzasadnienie wniosku w załączniku.

  
Katedra i Zakład Farmakologii  
Doświadczalnej i Klinicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
dr hab. n. med. Zofia Danileczuk