

Prof. dr hab. Lucyna Antkiewicz-Michaluk
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
Tel: (+4812) 6623-203
E-mail: antkiew@if-pan.krakow.pl

Kraków, 11.09.2020

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr **Żanety Broniowskiej** (Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum) wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusławy Budziszewskiej

z tytułu

„NIEKTÓRE ASPEKTY TOKSYCZNEGO DZIAŁANIA POCHODNEJ BENZOFENONU (BP-2)“

Pochodne benzofenonu należą do grupy substancji promieniochłonnych zwanych filtrami przeciwsłonecznymi, chroniących przed negatywnym działaniem promieniowania ultrafioletowego (UV). Światowa produkcja i zużycie benzofenonów jest ogromne i ciągle wykazuje tendencję wzrostową w odpowiedzi na zapotrzebowania przemysłu. Benzofenony, w tym BP-2 badany szczegółowo w tej dysertacji jest składnikiem wielu kosmetyków, wykorzystywany jest także jako dodatek do różnego rodzaju tworzyw sztucznych, a dodatkowo występuje w wielu zanieczyszczonych produktach spożywczych. Ekspozycja człowieka na filtry UV zachodzi głównie poprzez wchłanianie z powierzchni skóry, ale także należy brać pod uwagę stosunkowo wysokie stężenia benzofenonów w wodach rzek, ściekach, tkankach roślin i zwierząt. Tak więc, związki te mogą z łatwością przedostawać się do organizmu ludzi i wpływać niekorzystnie na wiele procesów życiowych. Uważano, że filtry UV mogą mieć jedynie niekorzystny wpływ na skórę wywołując reakcje alergiczne prowadzące do kontaktowego zapalenia skóry. Obecnie jednak wiadomo, że toksyczne działanie pochodnych benzofenonu jest związane przede wszystkim z ich istotnym wpływem na układ hormonalny: działanie estrogenne i antyandrogenne, a także niekorzystnym działaniem zakłócającym funkcjonowanie tarczycy. W grupie pochodnych benzofenonu większość analiz dotyczących działań niepożądanych skupiona była na BP-3 jako najczęściej stosowanego filtra UV, którego wysokie stężenia jak na to wskazują dane literatury światowej oznaczano w zarówno w moczu jak i w surowicy krwi kobiet i

mężczyzn, a także małych dzieci. Natomiast efekty działania BP-2, który jest jednym z metabolitów BP-3 na organizm ludzki, a zwłaszcza jego wpływ na komórki nerwowe mózgu, markery apoptozy czy procesy oksydacyjne zachodzące w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) w warunkach *in vivo* nie były do chwili obecnej przedmiotem badań.

Tak więc temat rozprawy uważam za bardzo interesujący, gdyż dotyczy jak dotąd słabo poznanego udziału BP-2 na przeżywalność komórek nerwowych oraz potencjalne działanie cytotoksyczne w badaniach *in vitro* na linii komórkowej ludzkiej neuroblastomy SH-SY5Y, a także w badaniach *ex vivo* po wielokrotnym, 4-tygodniowym naskórnym podawaniu BP-2 samcom szczurów Wistar. Pragnę podkreślić, że Doktorantka postawiła przed sobą kilka ważnych problemów do rozwiązania. Głównym celem podjętych badań było określenie zdolności BP-2 do przechodzenia przez barierę krew-mózg i jego potencjalnego neurotoksycznego działania na komórki nerwowe mózgu. Celem określenia potencjalnego cytotoksycznego działania BP-2 oceniano jego wpływ na markery stresu oksydacyjnego oraz procesu apoptozy w strukturach mózgu szczura, czyli głównych procesów leżących u podstaw chorób neurodegeneracyjnych. Wybrano dwie struktury mózgu: hipokamp i korę czołową, a więc struktury szczególnie wrażliwe na neurotoksyczne działanie ksenobiotyków. Kolejnym ważnym punktem prowadzonych badań było oznaczenie stężenia BP-2 zarówno wolnej frakcji jak i frakcji całkowitej (związek macierzysty + metabolity) metodą chromatografii cieczowej/spektrometrii mas w strukturach mózgu (kora czołowa, hipokamp, mózdzek) oraz tkankach obwodowych: w surowicy krwi, wątrobie, w tkance tłuszczowej i jądrach. Dodatkowo, istotnym celem badań Doktorantki było także pytanie czy BP-2 w opracowanym modelu *ex vivo* wpływa na czynność hormonów płciowych, hormonów tarczycy oraz na funkcję układu immunologicznego.

W tym miejscu pragnę podkreślić, że Doktorantka analizowała wpływ BP-2 na funkcję wielu układów zarówno obwodowych jak i centralnych w bardzo szerokim zakresie co wymagało doskonałego przygotowania metodycznego i czyni recenzowaną rozprawę pod względem metodycznym na wysokim poziomie.

Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich i składa się z 5 głównych rozdziałów: Wstęp, 2. Cel pracy, 3. Materiał i Metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja i spis najnowszych 185 pozycji literaturowych dobrze dobranych i bezbłędnie cytowanych w tekście pracy, a ponadto: Podsumowanie wyników, Wnioski, oraz wymagane Streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca zawiera także bardzo przydatny dla czytelnika Wykaz skrótów oraz Spis tabel (IX) i rycin (27). Doktorantka zamieściła także spis 3 publikacji zawierających wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej. Istotnym jest fakt, że są to publikacje w czasopismach takich jak: *Neurotoxicology*, *Toxicology*, *Neurotoxicity Research* o wysokim współczynniku wpływu (ok. 3,5) w których

Doktorantka jest pierwszym autorem. Tak więc, przeprowadzone przez Panią mgr Broniowską badania zostały już wnikliwie zrecenzowane przed ich opublikowaniem w wyżej wymienionych czasopismach naukowych.

Przechodząc do dalszego omówienia przedstawionej do recenzji dysertacji w obszernym Wstępie Autorka wprowadza czytającego w szeroki zakres problematyki związanej ze szkodliwością promieniowania ultrafioletowego, różnego rodzaju filtrów zarówno chemicznych jak i mineralnych oraz na podstawie literatury światowej bardzo szczegółowo omawia wpływ pochodnych benzofenonu na funkcje wielu układów: endokrynologicznego, rozrodczego, na poziom hormonów tarczycy, a ponadto na komórki centralnego systemu nerwowego zarówno u ludzi jak i zwierząt laboratoryjnych. To kompendium wiedzy poparte najnowszymi danymi literaturowymi przybliży czytelnikowi ważność prowadzonych przez Autorkę badań biorąc pod uwagę powszechność stosowania chemicznych filtrów UV zawierających pochodne benzofenonu, w tym BP-2.

Opisy stosowanych przez Doktorantkę metod są bardzo szczegółowe i jasno przedstawione w postaci schematów i tabel. Należy tu podkreślić nieinwazyjny dla zwierząt, naskórny sposób podawania badanej substancji w postaci maści 2 x dziennie przez 4 tygodnie, co niewątpliwie ma istotne znaczenie dla dobrostanu zwierząt szczególnie w badaniach chronicznych. Z przedstawionego materiału widać, że Doktorantka opanowała szeroki wachlarz technik badawczych – w badaniach *in vitro* prowadzenie hodowli komórek ludzkiej neuroblastomy (SH-SY5Y), w której przeprowadzono badania żywotności neuronów, cytotoksycznego działania BP-2, oznaczanie aktywności kaspazy-3, wizualizację zmian apoptotycznych w barwieniu Hoechst. W badaniach *ex vivo* po naskórnym, wielokrotnym podaniu BP-2 w postaci maści analizowano stężenia BP-2 w strukturach mózgu metodą chromatografii cieczowej, oznaczano markery stresu oksydacyjnego oraz całkowitą aktywność antyoksydacyjną w korze czołowej i hipokampie, ponadto analizowano poziom wielu hormonów w surowicy krwi metodą ELISA (testosteronu, progesteronu, prolaktyny, hormonów tarczycy: tyreotropiny TSH, stężenia fT3 i fT4).

Otrzymane wyniki badań zostały przedstawione w sposób jasny i czytelny na 27 rycinach i w 9 tabelach. Wyniki badań *in vitro* wykazały, że badany związek BP-2 wywierał cytotoksyczne działanie na komórki linii SH-5YSY ludzkiej neuroblastomy i już stężeniach nM indukował proces apoptozy nasilając aktywność kaspazy-3, głównego enzymu wykonawczego w tym procesie, natomiast w stężeniach wyższych μM wykazywał działanie nekrotyczne. W barwieniu Hoechst wizualizacja zmian apoptotycznych potwierdziła proapoptotyczne działanie BP-2 już w niskich stężeniach nM (10^{-8} , 10^{-7}) i wykazała charakterystyczną dla procesu apoptozy kondensację chromatyny i fragmentację jąder w komórkach ludzkiej neuroblastomy. W tym świetle badania *ex vivo* przyniosły zaskakujące wyniki. Paradoksalnie, dłuższa ekspozycja na działanie BP-2 na obwodzie działa

ochronnie na komórki nerwowe w korze czołowej szczura, obniżając poziom reaktywnych form tlenu, poziom peroksydacji lipidów oraz zwiększając całkowitą zdolność antyoksydacyjną komórek nerwowych w tej strukturze.

W tym miejscu chciałabym wrócić do jednego z głównych celów pracy, a mianowicie pytania czy BP-2 przechodzi z obwodu przez barierę krew-mózg do struktur mózgu. Analizując poziomy BP-2 w strukturach mózgu po miesięcznym naskórnym jego podawaniu należy wziąć pod uwagę strukturę związku i obecność w cząsteczce grup hydroksylowych znacznie utrudniających i spowalniających jego penetrację przez barierę krew-mózg. Dlatego brakuje mi w pracy wzorów strukturalnych zarówno BP-3 jak i jego metabolitów BP-1 i badanego BP-2 oraz dyskusji jakie ewentualne znaczenie może mieć struktura związku w oddziaływaniu na komórki mózgu. Doktorantka wielokrotnie we Wstępie pracy oraz w Dyskusji powołuje się na dane literaturowe wskazujące, że BP-3 przechodzi z łatwością przez barierę krew-mózg i jego stężenia po obwodowej aplikacji są w mózgu znacznie wyższe w porównaniu z otrzymanymi w tej pracy stężeniami BP-2. Przedstawiona w dysertacji analiza stężeń BP-2 na obwodzie oraz w strukturach OUN po miesięcznym naskórnym podawaniu wykazała ok. 100-krotną różnicę na korzyść tkanek obwodowych w porównaniu z mózgiem. Tak więc można powiedzieć, że BP-2 bardzo słabo penetruje przez barierę krew-mózg, a jego w pewnym sensie neuroprotektoryjne działanie na komórki nerwowe w mózgu pozostaje niewyjaśnione. Można tylko dywagować, że tak niskie stężenia ksenobiotyków w mózgu mają zdolność hamowania enzymów biorących udział w procesach utleniania (np. MAO), takie badania w przyszłości można przeprowadzić w nieinwazyjnych eksperymentach *in vitro*.

Natomiast, jednoznaczne i ważne wyniki z punktu widzenia praktycznego otrzymano badając wpływ BP-2 na parametry układu neuroendokrynologicznego i immunologicznego. Wykazano, że BP-2 wywołuje nadczynność tarczycy prowadząc do spadków TSH i istotnych wzrostów hormonów tarczycy T3, T4, zaburza poziom hormonów płciowych obniżając poziom testosteronu we krwi i jądrach, zaburzał proces spermatogenezy i obniżał liczbę i ruchliwość plemników, natomiast zwiększał poziom estradiolu. Stwierdzono także nasilenie funkcji układu immunologicznego i brak wpływu na parametry hematologiczne.


Mocną stroną pracy jest sprawnie przeprowadzona dyskusja otrzymanych wyników, która została podzielona na podrozdziały omawiające oddzielnie wpływ BP-2 w badaniach *in vitro* oraz w badaniach *ex vivo* z wyróżnieniem jego wpływu na funkcję tarczycy, funkcję jąder i poziom hormonów płciowych, układ immunologiczny i parametry hematologiczne. Uważam, że tak skonstruowana dyskusja znacznie ułatwia czytelnikowi ogarnięcie bogatej ilości otrzymanych wyników i podkreśla ich znaczenia dla funkcji wielu badanych przez Autorkę układów zarówno obwodowych jak i centralnych.

Mam natomiast zastrzeżenia do formy w jakiej zostały ujęte wnioski z przedstawionych w dysertacji badań (Rozdział 7. Wnioski). Są one krótkim powtórzeniem najważniejszych otrzymanych wyników, natomiast brakuje mi bardziej ogólnych sformułowań, które mogłyby być wskazówkami aplikacyjnymi np. czy stosowanie BP-2 jako filtra UV jest bezpieczniejsze od BP-3 biorąc pod uwagę różnicę w penetracji bariery krew-mózg?

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawione przeze mnie drobne uwagi w żaden sposób nie wpływają na moją wysoką ocenę pracy doktorskiej mgr Żanety Broniowskiej. Co więcej, wartość merytoryczna kompleksowo zaplanowanych i zrealizowanych, a także bardzo starannie opracowanych przez Doktorantkę badań farmakologicznych zasługuje na szczególne podkreślenie.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Żanety Broniowskiej w pełni odpowiada wszystkim wymogom stawianym rozprawom doktorskim sformułowanym w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Żanety Broniowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Lucyna Antkiewicz-Michaluk



Zakład Neurochemii Instytutu Farmakologii
im. Jerzego Maja PAN w Krakowie