

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Marii WRÓBEL

Wpływ parabenów na wybrane parametry związane z rozwojem nowotworu piersi

Primum non nocere, ta jedna z naczelných zasad etycznych medycyny, tradycyjnie przypisywana Hipokratesowi, niestety nie znalazła przełożenia w relacji człowiek-środowisko. Skutkiem rozwoju cywilizacyjnego było i jest nie tylko znaczne polepszenie standardu życia, ale również wprowadzenie do codziennego użytku trudno policzalnej liczby związków chemicznych, często o nieznanym do końca mechanizmie działania na organizmy żywe.

Jak wynika z raportu *Narodowego Programu Zwalczania Chorób Nowotworowych* opublikowanego w 2013r., jeszcze w 2011r. rak piersi był pierwszą przyczyną umieralności kobiet chorych na nowotwory w Polsce. Jak wiadomo, etiopatogeneza nowotworu gruczołu piersiowego jest niezwykle złożona. Na jego rozwój wpływ wywierają zarówno czynniki genetyczne i hormonalne jak i środowiskowe. Jako jeden z głównych czynników ryzyka wymieniane są estrogeny, które mogą promować rozwój nowotworu m.in. poprzez stymulację proliferacji oraz zmiany różnicowania i ekspresji genów.

W ostatnich dekadach coraz więcej uwagi zwraca się na ksenoestrogeny zaliczane do grupy *endocrine disruptors*, tj. związków wykazujących zdolność interakcji z układem hormonalnym i modulowania jego czynności w sposób charakterystyczny dla estrogenów. Zastępując endogenne estrogeny mogą one stanowić potencjalną przyczynę rozwoju nowotworów. Do ksenoestrogenów zaliczane są m.in. parabeny (estry alkilowe kwasu p-benzoesowego) stosowane na szeroką skalę od lat 40. ubiegłego wieku w wielu preparatach farmaceutycznych i kosmetycznych a także w produktach spożywczych.

W ostatnich latach w dostępnym piśmiennictwie coraz częściej pojawiają się wyniki badań wskazujące na wykrycie parabenów w różnych obszarach ludzkich gruczołów piersiowych. Mimo, że dotychczas nie udało się ustalić jednoznacznie źródła ich obecności w tkankach piersi kobiecych, to niektórzy autorzy sugerują, że przyczyną tego zjawiska może być przenikanie małych dawek tych ksenobiotyków z preparatów kosmetycznych, np. antyperspirantów, stosowanych regularnie na skórę okolicy piersi.

Estrogenne działanie parabenów zostało opisane po raz pierwszy w 1998r, jednak do dnia dzisiejszego nie ma jednoznacznych informacji na temat wpływu parabenów na rozwój

hormonozależnego nowotworu piersi oraz molekularnych mechanizmów ich działania a szczególnie o skutków ich oddziaływania na komórki gruczołu piersiowego nieobjęte nowotworem. Stąd też postawiona przez Doktorantkę hipoteza, że *parabeny zawarte w kosmetykach mogą mieć wpływ na powstanie i progresję nowotworu piersi* wydaje się być trafna i w pełni uzasadniona.

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest owocem prac eksperymentalnych przeprowadzonych przez mgr Annę M. WRÓBEL w laboratoriach Zakładu Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Wykonana została pod kierunkiem i opieką naukową prof. dr hab. Ewy Ł. GREGORASZCZUK, niekwestionowanego autorytetu w dziedzinie biologii komórki oraz komórkowych i molekularnych mechanizmów kancerogenezy. Jak wynika z informacji zawartych na drugiej stronie rozprawy oraz w każdej z załączonych publikacji badania zrealizowane zostały w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki DEC-2011/01/N/NZ7/00015.

Trzon pracy stanowi cykl czterech oryginalnych publikacji, które ukazały się w druku na przestrzeni ostatnich dwóch lat. Pierwszym autorem każdej z nich jest Doktorantka i we wszystkich przypadkach wskazana jest również jako autor korespondencyjny. Do rozprawy dołączone zostało oświadczenie prof. dr hab. Ewy Ł. GREGORASZCZUK, jedyne współautora wszystkich publikacji, informujące w sposób opisowy (konsultacje w trakcie planowania i przeprowadzania badań, przygotowania publikacji do druku oraz odpowiedzi recenzentom) i procentowy (20%) o Jej udziale w powstaniu w/w prac. Z treści oświadczenia jednoznacznie wynika, że głównym autorem i jedynym wykonawcą części eksperymentalnej prac była Doktorantka a rola Promotora polegała na zagwarantowaniu odpowiedniego poziomu naukowego, zarówno zrealizowanych badań jak i manuskryptów prac wysłanych do redakcji czasopism.

Zawarte w dysertacji prace zostały opublikowane w czasopismach o uznanej renomie naukowej, tj. *Pharmacological Reports* (publikacja I), *Journal of Applied Toxicology* (publikacja II) oraz *Toxicology Letters* (publikacje III i IV). Ich łączny IF, wg informacji zawartych w rozprawie wynosi 12,06. Z niezrozumiałych dla mnie względów wartości IF poszczególnych publikacji nie odpowiadają wartościom IF w roku ich opublikowania (np. dla publikacji III, która ukazała się w 2014 r, podano wartość IF za rok 2013 a nie za rok 2014). Wpłynęło to na nieznaczne zawyżenie przez Doktorantkę sumarycznej wartości IF, która faktycznie wynosi 11.67. Pragnę jednak podkreślić, że ta drobna korekta nie wpływa w żaden sposób na wysoką ocenę dorobku naukowego, będącego efektem realizacji założeń pracy.

Poza publikacjami, do których odniosę się w dalszej części recenzji, w skład rozprawy wchodzi również streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz prac mających stanowić podstawę nadania Doktorantce stopnia naukowego doktora oraz kilkunastostronicowe opracowanie. To

ostatnie miało prawdopodobnie za zadanie wprowadzić czytelnika w genezę pracy oraz wyartykułować cel i hipotezę badawczą. Ta wstępna część pracy zawiera również niezwykle zwarte kompendium informacji na temat materiałów i stosowanych metodyk oraz układu doświadczeń prowadzonych na modelu badawczym linii komórkowych MCF-7 wywodzących się z ludzkiego hormonozależnego nowotworu sutka i nienowotworowej linii komórek nabłonka gruczołu piersiowego MCF-10A. Ostatnia część opracowania to trzystronicowe podsumowanie publikacji stanowiących zasadniczą treść rozprawy oraz moim zdaniem bardzo interesujący siedmiostronicowy rozdział, w którym Autorka przeprowadziła dyskusję wyników badań własnych oraz ustosunkowała się do wyników uzyskanych przez innych badaczy na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat, szczególnie w obszarze oddziaływania parabenów z komórkami linii MCF-7.

Z pewnym rozczarowaniem muszę przyznać, że pewien niedosyt odczułam czytając rozdział zatytułowany *Wstęp*. W klasycznych dysertacjach część doświadczalna pracy poprzedzona była zawsze tzw. częścią teoretyczną, zawierającą przegląd aktualnego stanu wiedzy w zakresie obszaru badawczego wybranego przez doktoranta i promotora rozprawy. To właśnie m.in. na podstawie analizy bibliograficznej wyłaniał się cel rozprawy i założone hipotezy badawcze. Moim zdaniem, kiedy podstawę rozprawy stanowi cykl publikacji oryginalnych, bez żadnej pracy przeglądowej a praca doktorska ma być „*dogłębnym opracowaniem jakiegoś wąskiego zagadnienia*” to informacje przekazane przez Doktorantkę na temat podjętej problematyki badawczej oraz genezy pracy zawarte zaledwie na trzech stronach *Wstępu* wydać się mogą zbyt skromne. Jednocześnie niezrozumiałym dla mnie ewenementem jest brak wykazu piśmiennictwa, cytowanego w rozdziałach *Wstęp* i *Dyskusja*. Podjęłam wprawdzie próbę odnalezienia prac cytowanych autorów w załączonych publikacjach stanowiących zasadniczą część rozprawy, ale po kilku bezowocnych próbach zrezygnowałam z tego czasochłonnego zajęcia.

Na kolejnych stronach Doktorantka określiła cel główny prezentowanej rozprawy, którym miało być, cytuję „*określenie relacji pomiędzy procesami związanymi z powstawaniem i progresją nowotworu piersi a codziennym stosowaniem kosmetyków, głównie antyperspirantów zawierających parabeny*”.

Biorąc pod uwagę, że podstawę rozprawy stanowią publikacje Autorki, w których nie znalazłam konkretnych danych na temat codziennego stosowania antyperspirantów, takich jak np. wielkość dziennego pobrania, biodostępność parabenów aplikowanych na skórę, poziomy parabenów oznaczone w tkankach nowotworowych i nienowotworowych użytkowników codziennie stosujących antyperspiranty, za cel badań uznałabym raczej wymienione *określenie wpływu trzech najczęściej wykorzystywanych parabenów tj. metyl-, n-propyl- i n-butyloparabenu na wybrane parametry związane z powstaniem i rozwojem nowotworu piersi*.

Obowiązująca Ustawa o stopniach i tytule naukowym znowelizowana w 2011 r. dopuszcza przedstawienie spójnego tematycznie cyklu publikacji jako podstawy pracy doktorskiej. Mając na uwadze, że poprawność merytoryczna eksperymentów, uzyskanych wyników i ich interpretacji, przedstawionych w każdej z publikacji I-IV, została zweryfikowana przez niezależnych recenzentów w procesie *peer review*, w mojej ocenie dokonam jedynie analizy zawartości poszczególnych publikacji pod kątem ich spójności tematycznej.

Wnikliwa lektura prowadzi do wniosku, że cykl przedstawionych prac stanowi spójną całość zarówno w obszarze materiału do badań (každorazowo równoległe wykorzystywanie linii komórkowych MCF-7 i MCF-10A) jak i badanych ksenobiotyków (metyl-, propyl- i butylparaben). Każda kolejna publikacja stanowi kontynuację poprzedniej i dostarcza nowych informacji na temat mechanizmu działania parabenów w w/w komórkach docelowych oraz ich potencjalnego udziału w inicjacji i/lub progresji nowotworu piersi. W publikacji I Doktorantka określiła wpływ dawki parabenów i czasu ekspozycji na żywotność komórek, sekrecję estradiolu oraz ekspresję genu i białka aromatazy cytochromu P450 (CYP19A1), publikacja II dostarcza nowych informacji na temat wpływu badanych parabenów na ekspresję genów i wybranych białek bezpośrednio związanych z cyklem komórkowym oraz procesem apoptozy, natomiast w publikacjach III i IV, przedstawione zostały wyniki oceny wpływu poszczególnych ksenobiotyków zarówno na klasyczny (genomowy) szlak działania estrogenów jak i na niegenomowy szlak sygnałowy związany z receptorem GPR-30.

Reasumując, mogę z całym przekonaniem stwierdzić, że Doktorantka w zaprezentowanych publikacjach potwierdziła swoją znajomość zagadnień związanych z przedmiotem badań oraz umiejętność prawidłowej interpretacji wyników, będących efektem przeprowadzonych eksperymentów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że uzyskanie wielokierunkowych, wiarygodnych informacji na temat wpływu parabenów na parametry związane z rozwojem nowotworu wymagało od Doktorantki m.in. pogłębienia umiejętności w zakresie: stosowania metod biologii molekularnej, takich jak: hodowle linii komórkowych nowotworowych i nietransformowanych, metod stosowanych do oceny żywotności komórek (test AlmarBlue), do oceny ekspresji genów CYP19A1, ESR1, ESR2, PGR, GPR30 oraz genów zaangażowanych w cykl komórkowy i proces apoptozy (PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sondy TaqMan), metod oceny ekspresji wybranych białek markerowych (western blot) czy metod ELISA wykorzystanych do oznaczania cAMP - cyklicznego adenozymonofosforanu oraz 17β estradiolu (testy Cell Biolabs Inc oraz DRG Estradiol ELISA Kit). Dodatkowo musiała Ona również opanować lub pogłębić umiejętność obróbki statystycznej uzyskanych wyników z użyciem programów GraphPad Software Inc. oraz Statistica 10 (o tym ostatnim nie wspomniano podczas opisu stosowanych metod).

Do największych osiągnięć Doktorantki, przedstawionych w omawianych publikacjach moim zdaniem zaliczyć należy m.in.:

- wykazanie po raz pierwszy, że niskie dawki parabenów posiadają potencjał do stymulowania proliferacji zarówno komórek MCF-7 jak i MCF-10A,
- stwierdzenie istnienia różnych mechanizmów aktywności proliferacyjnej parabenów w linii komórek nowotworowych MCF-7 i nietransformowanych MCF-10A,
- dostarczenie pierwszych informacji wskazujących na wpływ parabenów na geny cyklu komórkowego oraz geny związane z apoptozą w linii komórkowej MCF-10A,
- stwierdzenie stymulującego działania parabenów na ekspresję receptorów estrogenowych (ESR1 i ERS2) oraz receptora progesteronowego (PGR) w komórkach MCF-7.

Mimo ogólnie pozytywnej oceny „niepublikacyjnej” części rozprawy oraz bardzo pozytywnej oceny części „publikacyjnej”, podczas lektury pracy nasunęły mi się pewne pytania i wątpliwości, które z pewnością zostaną wyjaśnione lub rozwiane podczas publicznej obrony rozprawy, i tak:

- wyjaśnienia wymaga stosowane we wstępie (str. 12) określenie parabenów jako substancji **łatwo** ulegających akumulacji. Czy odnosi się ono również do metylparabenu, który wg ogólnie uznawanych kryteriów nie powinien być zaliczony do związków o wysokim potencjale do bioakumulacji ze względu na wartość jego współczynnika $\log P < 3$,
- niefortunnym wydaje się być stwierdzenie (str.12), że *Dotychczasowe badania wykazały obecność parabenów w większości kosmetyków stosowanych do pielęgnacji ciała* z powołaniem się na nieco nieaktualną publikację z 1998r. Pojawiające się coraz to nowe dane (m.in. również z publikacji zawartych w rozprawie) na temat potencjalnych właściwości nowotworowych parabenów oraz obowiązek podania na opakowaniu składu jakościowego preparatu zmotywowało w ostatnich latach wielu producentów kosmetyków do odejścia od stosowania tych ksenoestrogenów na rzecz bardziej bezpiecznych zamienników,
- nieścisłym wydaje się być stwierdzenie (str. 15), że ilość wykazującego fluorescencję produktu reakcji substratu z enzymem mierzymy spektrofotometrycznie. Teoretycznie byłoby to możliwe przy odpowiednio wysokim stężeniu produktu, jednak generalnie wykorzystywana jest w tym celu metoda spektrofluorymetryczna,
- moim zdaniem schemat doświadczenia określającego działanie chroniczne badanych parabenów (str.18) nie jest czytelny w zakresie liczby strzałek mających odpowiadać kolejnemu dodawaniu związków. W tekście jest mowa o trzykrotnym ich dodaniu podczas trwania eksperymentu a ze schematu nie wynika to jednoznacznie,
- w obu schematach (str. 17 i 18) wkraść się prawdopodobnie błąd drukarski, gdyż zamiast dawki 200 nM podana jest dawka 200 n,
- w publikacji II istnieje rozbieżność pomiędzy danymi w tekście na str. 1044 i w tabeli 3, gdyż statystycznie znamienne wzrost ekspresji wykazywał niewymieniony w tekście a ujęty w tabeli gen BCL2L11 natomiast statystycznego wzrostu ekspresji nie wykazywał wymieniony na str. 1044 gen BCL2L,
- w publikacji III na str. 378 w tytule rozdziału 3.2 miała być z pewnością mowa o metylparabenie a nie o etylparabenie.

Pragnę zwrócić uwagę, że pytania i wątpliwości przedstawione powyżej w żaden sposób nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej recenzowanej pracy. Uważam, że Doktorantka w

pełni zrealizowała zaplanowany program badań a uzyskane przez nią wyniki zawierają elementy nowości, do których zaliczyć należy m.in. dostarczenie nowych dowodów, na to że wszystkie badane parabeny powinny być brane pod uwagę jako potencjalne czynniki kancerogenne mogące wpływać zarówno na inicjację jak i na progresję procesu nowotworowego.

Podsumowanie

W końcowej konkluzji pragnę wyrazić przekonanie, że przedstawiona do oceny rozprawa stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego i jest dowodem nabycia przez Doktorantkę umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Nie mam również żadnych wątpliwości, że rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Annę Marię WRÓBEL spełnia warunki określone w artykule 13 obowiązującej Ustawy i może stanowić podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora w *obszarze nauk przyrodniczych, w dziedzinie nauk biologicznych i dyscyplinie biologii*. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Anny Marii WRÓBEL do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny publikacji stanowiących trzon rozprawy wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Anny Marii WRÓBEL.

Uzasadnienie propozycji wyróżnienia rozprawy

1. Realizując założenia pracy mgr Anna M. WRÓBEL uzyskała szereg wyników istotnych dla zrozumienia mechanizmu działania metyl-, propyl- i butylparabenu nie tylko na komórki nowotworowe MCF-7, ale przede wszystkim na nietransformowane komórki MCF-10A. Oprócz walorów poznawczych, zawarte w rozprawie informacje/sugestie o uznaniu badanych parabenów za potencjalne czynniki kancerogenne, mogą być przydatne również podczas weryfikowania ryzyka związanego z powszechnym narażeniem na te ksenoestrogeny szczególnie populacji krajów wysokorozwiniętych.
2. Godnym wyróżnienia jest również opublikowanie w ciągu zaledwie dwóch lat czterech prac oryginalnych w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym o łącznym IF>11, szczególnie, że w każdej z prac mgr Anna Maria WRÓBEL jest zarówno pierwszym autorem jak i autorem korespondencyjnym.

Prof. dr hab. Janina LULEK