

prof. dr hab. Piotr Jedziniak  
Zakład Farmakologii i Toksykologii  
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy  
W Puławach

## RECENZJA

### Rozprawy doktorskiej

mgr Kingi Anny Urbanek

### „Mykotoksyny jako modulatory szlaków syntezy hormonów steroidowych”

Mykotoksyny, z racji swojego powszechnego występowania i różnorodnej toksyczności w kierunku praktycznie wszystkich organizmów stanowią jeden z najbardziej fascynujących obiektów zainteresowania szeroko rozumianych nauk o życiu. Znajdziemy wśród nich zarówno związki estrogenne, genotoksyczne jak i kancerogenne. Dzięki wysoko rozwiniętej analizie tych związków w żywności, wiemy, że w praktyce nie ma zbóż pozbawionych śladowych ilości mykotoksyn. W konsekwencji powoduje to skażenie zarówno pasz dla zwierząt, jak i żywności dla ludzi toksynami wytwarzanymi przez m.in. pleśnie *Fusarium spp.* Dodatkowo, niewłaściwe przechowywanie żywności (np. zbóż w silosach) może prowadzić do powstawania np. mykotoksyn pleśni z rodzaju *Aspergillus spp.* W konsekwencji zwierzę i człowiek narażeni są na kilka mykotoksyn o różnym mechanizmie toksyczności jednocześnie, co dodatkowo utrudnia ocenę ich wpływu na organizm. Wiedza na temat tych mechanizmów jest dalece niewystarczająca i badania prowadzone w tym zakresie są ze wszech miar pożądane.

W tym właśnie nurcie badań mieści się oceniana praca doktorska, w której Doktorantka podjęła się próby wyjaśnienia wpływu wybranych mykotoksyn (deoksywniwalenolu i alternariolu) na rozwój nowotworu gruczołu krokowego poprzez ich wpływ na steroidogenezę. Deoksywniwalenol (DON) jest uważany za najczęściej występującą mykotoksynę w żywności, mającą istotne działania teratogenne, cytotoksyczne, genotoksyczne i immunotoksyczne. Z kolei alternariol (AOH) jest mniej poznaną mykotoksyną i wśród innych działań niepożądanych wpływa m.in. na produkcję hormonów w organizmie poprzez wiązanie z receptorami estrogenowymi. Interesujące jest połączenie wpływu tych związków (nie postrzeganych jako kancerogeny) z procesem nowotworzenia poprzez ich zaburzenie wytwarzania steroidów. Poza aspektami *stricte* poznawczymi związanymi z rozszerzeniem

wiedzy na temat wpływu mykotoksyn na procesy biochemiczne w obrębie komórek nowotworowych, podjęty temat może mieć istotne znaczenia dla prowadzenia skutecznych terapii onkologicznych raka prostaty. Z tych powodów oceniam decyzję o podjęciu się tym ambitnym tematem naukowym bardzo wysoko. Jest ona konsekwencją doświadczeń naukowych zespołu w jakim pracuje Doktorantka, jak również dobrego rozeznania w aktualnym piśmiennictwie dotyczącym mechanizmów toksyczności mykotoksyn na poziomie komórkowym.

Przedstawiona do oceny praca doktorska to cykl trzech publikacji, z których jedna stanowi pracę przeglądową wprowadzającą czytelnika w zagadnienie, natomiast pozostałe to prace doświadczalne. We wszystkich tych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem i, zgodnie z załączonymi deklaracjami autorów, miała dominujący wkład w ich powstanie.

W pracy przeglądowej „*Deoxynivalenol as potential modulator of human steroidogenesis*” (Urbanek KA, et al. *J Appl Toxicol.* 2018 Dec;38(12):1450-1459), Doktorantka przedstawia najważniejsze informacje na temat powstawania i występowania deoksyniwalenolu w przyrodzie a następnie szeroko opisuje jego toksyczność dla zwierząt i ludzi skupiając się na jego wpływie na steroidogenezę. Dokonując szerokiego przeglądu piśmiennictwa naukowego zestawia dane dotyczące zwiększania lub zmniejszania wytwarzania estradiolu, progesteronu, testosteronu, kortyzolu i hormonu folikulotropowego w zależności od stężenia i używanego modelu doświadczalnego in-vitro. Konkluzja pracy jasno wskazuje, że DON może mieć istotny wpływ na wytwarzanie hormonów i konieczne jest prowadzenie dalszych badań na zrozumieniem mechanizmów i konsekwencji tego działania. Praca przeglądowa stanowi dobry wstęp do dalszych badań, chociaż już na tym etapie zabrakło w mojej ocenie podobnego opracowania dla działania altenariolu, drugiej badanej w pracy doktorskiej mykotoksyny.

W pracy doświadczalnej “*In Vitro Analysis of Deoxynivalenol Influence on Steroidogenesis in Prostate*” (Urbanek KA, et al. *Toxins (Basel).* 2021 Sep 26;13(10):685), Doktorantka przedstawia wyniki badań in-vitro nad wpływem DON na komórki gruczołu krokowego (prawidłowe i nowotworowe), pojedynczo jak również w obecności hormonu dehydroepiandrosteronu (DHEA). Autorka dobiera do swoich badań 4 różne linie komórkowe w tym trzy linie nowotworowe o różnej wrażliwości na androgeny, co świadczy o dociekliwości naukowej i dobrym opanowaniu warsztatu metodycznego. Niewątpliwą zaletą prowadzonych badań jest szeroki zakres stosowanych metod i technik. Doktorantka stosuje je w celu lepszego zrozumienia mechanizmów działania DON i DON/DHEA na komórki m.in. bada żywotność



komórek (test MTT), poziom estradiolu, testosteronu i progesteronu (technika ELISA), ekspresja genów związanych ze steroidogenezą (technika RT-qPCR i Western Blot), prowadzi badania wpływu DON i DON/DHEA na cykl komórkowy (cytometria przepływowa). Wyniki wszystkich doświadczeń jednoznacznie wskazują na wpływ DON lub mieszaniny DON/DHEA na modulację steroidogenezы w przypadku wybranych linii komórkowych a dodatkowo wykazuje ich wpływ na progresję cyklu komórkowego i apoptozę. Przeprowadzone badania stanowią podstawę do podjęcia bardziej pogłębionych studiów w celu zrozumienia mechanizmów działania DON. Pracę tę oceniam bardzo wysoko pod względem naukowym, widać w niej dużą dojrzałość badawczą Doktorantki.

W drugiej pracy doświadczalnej *"Revealing the Role of Alternariol in the Local Steroidogenesis in Human Prostate Normal and Cancer Cells"*, Urbanek KA, et al., *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 9513), Doktorantka badała wpływ alternariolu (AOH) na steroidogenezę komórek w prawidłowych i nowotworowych komórkach gruczołu krokowego. Po ustaleniu dawek oraz czasu inkubacji w doświadczeniu określającym żywotność komórek, Autorka bada wpływ AOH i AOH/DHEA na wydzielanie trzech hormonów: estradiolu, testosteronu i progesteronu. O ile sam AOH nie wpływa znacząco na ich sekrecję o tyle już w mieszaninie z DHEA w istotny sposób modyfikuje wytwarzanie testosteronu i w niewielkim stopniu progesteronu. Wyniki kolejnych badań wskazują, że większy wpływ AOH i AOH/DHEA wydaje się mieć na ekspresję genów kodujących enzymy związane z steroidogenezą (*CYP11A1*, *STAR*, *CYP17A1*, *HSD3B2*, *AR*, *ESR2*), chociaż jest on zależy od stężenia badanych związków. Interesujące są wyniki badań wpływu AOH i AOH/DHEA na ekspresję genów i białka kaweolinu-1. Wskazują one na istotną interakcje badanych związków z procesem wytwarzania białka uczestniczącego w procesie steroidogenezы jak i w innych istotnych procesach komórkowych. W tych badaniach warto podkreślić skuteczne zastosowanie przez Doktorantkę kolejnych technik (poza stosowanymi już w pierwszej pracy doświadczalnej) : barwienia immunohistochemicznego i mikroskopii konfokalnej. Badania obejmowały również wpływ AOH i AOH/DHEA na proces indukcji apoptozy i modulację cyklu komórkowego. Wyniki opisanych w publikacji badań są dość trudne w interpretacji a sama Doktorantka podkreśla, że steroidogenezа jest w niewielkim stopniu modulowana przez AOH i jej efekt jest widoczny raczej w interakcji z dodatkowym czynnikiem modulującym jakim jest DHEA.

Wszystkie prace zostały opublikowane w uznanych czasopismach międzynarodowych a ich sumaryczny współczynnik wpływu (*impact factor*) wynosi 14,348. Praca przeglądowa uzyskała już uznanie w świecie naukowym, o czym świadczy znaczącą liczbą 29 cytowań



(wg Web of Science). Powyższe fakty wskazują na wysoką wartość zarówno prac przeglądowych jak i jakość przeprowadzonych badań opisanych w pracach doświadczalnych. Na uznanie zasługuje logiczny dobór prac do rozprawy doktorskiej. Całość stanowią przemyślane, dobrze zrealizowane badania, które wskazują nowe kierunki przyszłych doświadczeń.

Praca doktorska rozpoczyna się od streszczenia w języku polskim i angielskim, w którym Doktorantka przedstawia w zwięzły sposób cele, wyniki i wnioski z badań. Następnie zamieszcza „Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej” z podaniem danych bibliograficznych oraz wartości współczynnika *impact factor*. Kolejną częścią pracy doktorskiej jest 5-stronicowy wstęp, który w przystępny sposób wprowadza czytelnika w tematykę badań i logicznie argumentuje podjęcie tematu wpływu mykotoksyn na steroidogenezę w kontekście rozwoju raka prostaty. Następnie Doktorantka formułuje cztery cele pracy, dwa dotyczące badań nad deoksyniwalenolem, dwa dotyczące alternariolu. W kolejnej części znajdujemy trzy oddzielne opisy poszczególnych publikacji, które w prosty sposób tłumaczą najważniejsze informacje i wyniki badań zawarte w publikacjach. W czwartej części pracy Doktoranta zawarła cztery poprawnie sformułowane wnioski. Pracę doktorską zamyka obszerna bibliografia (82 pozycje), w której zdecydowana większość cytowanych publikacji została opublikowana po 2010 roku. W pracy doktorskiej znajdujemy również załączone prace stanowiące cykl, oświadczenia współautorów określających ich wkład w powstanie poszczególnych publikacji. Pracę doktorską zamyka część wskazująca na bogaty całociowy dorobek naukowy Doktorantki.

Z perspektywy recenzenta stwierdzam, że nie jestem entuzjastą przyjętego przez Doktorantkę schematu pracy doktorskiej. Zdaję sobie sprawę z tego, że praca doktorska stanowiąca cykl prac daje Doktorantowi dużą dowolność w strukturze samej rozprawy, pozwalając założyć, że czytelnik szczegółowe informacje znajdzie w zamieszczonych publikacjach. W omawianym przypadku Doktorantka, w mojej ocenie, zbyt pochopnie odstąpiła od bardziej szczegółowego opisu stosowanej metodyki, opisu wyników a w szczególności całociowej dyskusji otrzymanych wyników. Przez to recenzowana praca doktorska wydaje się niestety bardziej sumą trzech publikacji niż ich spójnym cyklem. Wrażenie to pogłębia oddzielny opis każdej publikacji, w których praktycznie nie ma odniesień do pozostałych prac z cyklu. Zabieg ten jest o tyle niezrozumiały, że badania nad DON i AOH były prowadzone w stosunkowo podobnym schemacie metodycznym i przynajmniej niektóre wyniki (np. dotyczące wpływu badanych mykotoksyn na wydzielanie hormonów) mogły

i powinny być omówione razem. Dodatkowym argumentem za bardziej szczegółowym opisem treści w pracy doktorskiej jest wspomnianie już wcześniej włączenie do cyklu pracy przeglądowej na temat deoksyniwalenolu, podczas gdy alternariol nie był przedmiotem takiej publikacji.

Ponadto, zarówno w celach jak i we wnioskach Doktorantka nie wspomina o roli jaką w badaniach pełnił dehydroepiandrosteron (DHEA), naturalny hormon steroidowy produkowany z cholesterolu w nadnerczach. W publikacjach doświadczanych Autorka wyraźnie wskazuje, że bada działanie danej mykotoksyny (DON lub AOH) i mieszaniny: mykotoksyna –hormon (DON/DHEA i AOH/DHEA) czyli *de facto* bada wpływ interakcji tych związków na steroidogenezę.

Pozostając pod dużym wrażeniem rozległości metodycznej przeprowadzonych badań, w których widać chęć całościowego zbadania zagadnienia wpływu DON i AOH na steroidogenezę, uważam, że wyniki analizy hormonów (estradiolu, testosteronu i progesteronu) zyskałyby na wiarygodności, gdyby były przeprowadzone techniką chromatografii cieczowej połączonej np. z tandemowym detektorem mas (LC-MS/MS). Wyniki badań prowadzonych testami ELISA (skądinąd szybkie i ekonomiczne), są obarczone stosunkowo dużym rozrzutem, co w przypadku małych różnic w poziomach hormonów (np. w badaniach AOH) może mieć istotne znaczenie dla interpretacji wyników.

Powyższe uwagi krytyczne nie obniżają jednak w żadnym stopniu wysokiej oceny przeprowadzonych badań, które na każdym etapie: planowania, wykonania, opracowania i przedstawienia wyników a także wnioskowania charakteryzują się wysoką jakością i wnoszą istotną wartość do światowej nauki.

Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego oraz wskazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki a także umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Zakładu Farmakologii i Toksykologii  
*Piotr Jedziński*  
Prof. dr hab. Piotr Jedziński

2023 -11- 0 6

