



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Toksykologii

Kierownik: prof. dr hab. Agnieszka Piowar

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Habrowskiej-Górczyńskiej
pt. „Mykotoksyny jako czynniki uwrażliwiające komórki nowotworowe na znane
chemioterapeutyki” w postępowaniu o nadanie na stopień doktora w dziedzinie nauk
medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne**

W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej podjęto próbę oceny możliwości wykorzystania jednej z mykotoksyn - deoksyniwalenolu (DON) jako czynnika uwrażliwiającego komórki nowotworowe gruczołu krokowego (Pca) na działanie chemioterapeutyku - TRAIL (ligand indukujący apoptozę związany z TNF) w badaniach modelowych na liniach komórkowych o różnej wrażliwości na androgeny oraz z udziałem zwierząt - na modelu mysim wszczepionym. Pani mgr Dominika Habrowska-Górczyńska połączyła w swoich badaniach dwa ważne aspekty związane ze skutecznością leczenia chorób nowotworowych oraz wykorzystania w tym celu mykotoksyn będących zanieczyszczeniami żywności. Takie ujęcie tematu badawczego jest bardzo interesujące, gdyż rak gruczołu krokowego stanowi ponad 20% wszystkich nowotworów w Polsce, zaś zanieczyszczenia żywności mogą być czynnikiem indukującym proces nowotworzenia jak i mogą wpływać na skuteczność stosowanego leczenia. Potwierdza to aktualność i ważność podjętego tematu badawczego, który wpisuje się bardzo dobrze w aktualne trendy badań naukowych, skupiających się na poszukiwaniu nowych związków lub wykorzystaniu już znanych dla zwiększenia skuteczności leczenia chorób nowotworowych. Praca została wykonana w Zakładzie Hodowli Komórkowych i Analiz Genomowych Wydziału Lekarskiego, Oddział Nauk Biomedycznych, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. med. Agnieszki Piastowskiej-Ciesielskiej, promotorem pomocniczym jest Pani dr n. med. Karolina Kowalska.

Podstawą ubiegania się przez Panią mgr Dominikę Habrowską-Górczyńską o nadanie stopnia dr n. med. jest monotematyczny cykl 3 publikacji, w skład którego wchodzi 1 praca przeglądowa i 2 doświadczalne, opublikowanych w latach 2018, 2019 i 2023 w czasopiśmie z listy MEiN oraz Journal Citation Reports. Zgodnie z załączonym wykazem bibliometrycznym sumaryczny współczynnik wpływu (IF) tych prac wynosi 10,396, a punktacja MEiN to 270 punktów. W pracach doświadczalnych Doktorantka jest pierwszym autorem, natomiast w

pracy przeglądowej wskazany jest równoważny udział dwóch pierwszych autorów. Wszystkie przedstawione prace posiadają IF powyżej 3, pierwsza z prac, o charakterze pogładowym (z 2018 roku) posiada 30 punktów i 3,065 IF, druga praca (z 2019 roku) oryginalna – 100 punktów i 3,531 IF, trzecia (z 2023 roku) – 140 punktów i 3,800 IF. W rozdziale „Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej” wskazanym byłoby podanie pod każdą z tych publikacji właściwego dla nich współczynnika wpływu oraz punktacji MEIN. Całkowita punktacja dorobku doktorantki (od 2016 roku), za 21 publikacji, wynosi 1845 punktów, a IF 93,042, co jest znaczącym i wartym podkreślenia osiągnięciem znakomicie obrazującym Jej rozwój naukowy. Liczba cytowań to 369 cytowań (335 bez autocytowań) wg. Web of Science Core Collection, a Indeks Hirsha wynosi 10. Mając te dane na uwadze brakuje mi choćby krótkiego opisu sylwetki Doktorantki, co byłoby dobrym uzupełnieniem rozprawy.

Przedłożona do oceny rozprawa oparta jest na obszernym przeglądzie piśmiennictwa (publikacja nr 1) oraz rozległych i kompleksowych badaniach i ich wynikach przedstawionych w publikacjach eksperymentalnych (publikacja nr 2 i 3). Posiada typowy układ charakterystyczny dla tego rodzaju opracowań opierających się na monotematycznym cyklu prac i wg. spisu treści składa się z 10 rozdziałów ułożonych w logiczny sposób. Oprócz wykazu publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień dr n. med., oraz kopi tych publikacji i oświadczeń wszystkich współautorów określających indywidualny ich wkład w powstawanie tych prac, rozprawa zawiera również informacje o pozostałych publikacjach w dorobku Pani mgr oraz Jej udział w konferencjach i projektach naukowych. Zawiera również wykaz zastosowanych skrótów, piśmiennictwo zacytowane w przedłożonym opracowaniu, streszczenie w języku polskim i angielskim. Ponadto w pracy zamieszczono opinię komisji etycznej, którą Doktorantka uzyskała dla przeprowadzenia badań z udziałem zwierząt. Najważniejszymi elementami rozprawy doktorskiej są rozdziały: „Wprowadzenie i uzasadnienie wyboru tematu”, „Cele”, „Omówienie publikacji stanowiących rozprawę doktorską” oraz „Wnioski”. W tej części pracy dobrym uzupełnieniem byłoby dołączenie rozdziału z syntetycznym wskazaniem jakie materiały (linie komórkowe i zwierzęta doświadczalne) oraz metody do badań zostały zastosowane.

Rozdział pt. „Wprowadzenie i uzasadnienie wyboru tematu” w sposób bardzo syntetyczny wprowadza w podjęty przez Panią mgr temat badawczy, a cele (nadrzędny i 3 szczegółowe) są dobrze sformułowane, choć użyte określenie „zweryfikowanie” nie wydaje się być najbardziej trafnym. Ponadto wskazanym byłoby bardziej znaczące zaakcentowanie, zgodnie z tytułem rozdziału, uzasadnienia połączenia wskazanych publikacji w monotematyczny cykl.

Kolejny rozdział stanowi „Omówienie publikacji stanowiących rozprawę doktorską” i jest równie bardzo syntetycznym opisem dokonanego przeglądu piśmiennictwa (publikacja 1) oraz wyników przeprowadzonych badań, które zostały przedstawione w publikacjach nr 2 i 3.

Publikacja nr 1 jest obszernym opracowaniem liczącym 10 stron i zawierającym 4 tabele i 4 rysunki, opartym na 87 pozycjach piśmiennictwa. Doktorantka dokonała przeglądu dostępnych danych na temat klasyfikacji mykotoksyn i narażenia na nie organizmu ludzkiego, a następnie przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat mykotoksyny będącej obiektem jej

zainteresowań naukowych, czyli deoksynivalenolu, który jest jedną z najczęściej występujących mykotoksyn w produktach zbożowych. Jest to istotne w aspekcie podjętych przez Panią mgr badań oraz w świetle danych mówiących o jego wpływie na steroidogenezę. W tej części rozprawy Doktorantka użyła sformułowania „sprawdziłam czy DON może wpływać na proces steroidogenezы w komórkach ludzkich”, w opinii Recenzenta należałoby to określić przereklamować lub doprecyzować w jaki sposób to zostało dokonane. Najważniejszą częścią pracy jest omówienie molekularnego działania DON na poziomie komórkowym, co ściśle wiąże się z przeprowadzonymi badaniami, przedstawionymi w pracach nr 2 i 3, stanowiąc bardzo dobre podłoże teoretyczne i uzasadnienie dla podjętych badań. Doktorantka wskazuje na dwutorowość działania DON na komórki, poprzez dwa przeciwstawne szlaki sygnałowe, z jednej strony sprzyjające apoptozie komórki (poprzez p38), a z drugiej sprzyjające jej przeżywalności (poprzez ERK1/2 i ekspresję cytokin promujących stan zapalny), i jak podkreśla, ostateczny efekt komórkowy zależy jest od stężenia i czasu ekspozycji na DON. Szczegółowo opisuje i analizuje mechanizmy odpowiedzi komórkowej na działanie DON w odniesieniu do procesu steroidogenezы, a jako kluczowe wskazuje modulację przez DON procesu ekspresji i translacji w eksponowanych komórkach. Informacje te były przyczynkiem do przeprowadzenia własnych badań eksperymentalnych przez Doktorantkę na liniach komórkowych oraz z udziałem zwierząt laboratoryjnych.

W publikacji nr 2 z uwagi na brak danych w piśmiennictwie naukowym na temat działania DON na komórki nowotworowe gruczołu krokowego, Doktorantka zbadała wpływ tej mykotoksyny na podstawowe parametry molekularne procesów życiowych tych komórek, tj. żywotność, stres oksydacyjny, apoptozę i cykl komórkowy wykorzystując do badań aż 4 modele komórek PCa, o różnej wrażliwości na androgeny. Stanowi to o dużej wartości naukowej przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników, wskazując na kompleksowe podejście Pani mgr do tematu badawczego oraz umiejętność planowania badań, co z pewnością jest zasługą znakomitych promotorów. Działając różnymi dawkami DON, Doktorantka zaobserwowała, że zmniejsza on żywotność komórek PCa, poprzez indukowanie stresu oksydacyjnego i apoptozę w sposób zależny od stężenia, jednak nie dla wszystkich badanych linii komórkowych, co jest ważną obserwacją. Podobnie wpływ na potencjał mitochondrialny nie był jednakowy i jedynie w komórkach linii DU-145 dochodziło do naruszenia integralności błony mitochondrialnej. Również zatrzymanie cyklu komórkowego w różnych fazach było zależnie od badanej linii komórkowej, natomiast uszkodzenie DNA występowało we wszystkich badanych liniach. Dobrym punktem odniesienia do dalszych badań było stwierdzenie przez Panią mgr, iż działanie DON na komórki PCa zachodziło głównie poprzez szlak kinaz MAPK oraz czynniki NFκB i HIF1α. Jak konkluduje Doktorantka, tak zróżnicowana odpowiedź komórek na działanie DON, może być czynnikiem warunkującym indukcję apoptozy w komórkach PCa, a w opinii Recenzenta może wskazać dalsze kierunki badań nad poprawą skuteczności stosowanej terapii przeciwnowotworowej. Jedną z uwag do tej części rozprawy dotyczy użycia przez Doktorantkę sformułowania „Poprzednie badania”, co sugeruje, iż były to wcześniejsze badania własne Doktorantki i zespołu którego jest członkiem, a faktycznie dane pochodzą z piśmiennictwa.

Publikacja nr 3 w naturalny sposób wypływa z poprzedniej pracy i wskazuje na umiejętność wykorzystania uzyskanych wyników do zaplanowania dalszych badań dla realizacji założonych celów naukowych. Doktorantka przeprowadziła badania dwutorowo, w pierwszej części wykorzystwała te same 4 modele linii komórkowych, a w drugiej przeprowadziła badania z udziałem zwierząt laboratoryjnych dla uzyskania odpowiedzi na pytanie czy zaobserwowane działanie DON na komórki PCa może być wykorzystane w terapii łączonej z TRIAL, chemioterapeutyką obniżającą poziom androgenów, dla uwrażliwienia komórek nowotworowych na jego działanie. Doktorantka oceniała takie parametry jak: cytotoksyczność, nasilenie stresu oksydacyjnego i indukcję apoptozy przez użyte kombinacje DAN i TRAIL w różnych stężeniach, uzyskując jedynie dla komórek linii PC3 istotny statystyczny efekt (spadek żywotności). Dla pozostałych linii komórkowych obniżenie żywotności było zauważalne ale nieistotne statystycznie. Co interesujące, w przypadku linii 22Rv1 zaobserwowany efekt był skutkiem działania samego DON, a nie jego właściwości uwrażliwiających na TRAIL. Jako istotny w przebiegu tych odpowiedzi, w przypadku komórek androgenozależnych, Pani mgr wskazała zmiany ekspresji czynnika transkrypcyjny FOXO3a. W kolejnym kroku Pani mgr podjęła próbę zweryfikowania otrzymanych wyników *in vitro*, w zakresie uwrażliwiania przez DON komórek PCa na proapoptotyczne działanie TRAIL, ale nie udało się tego potwierdzić w badaniach z udziałem zwierząt, gdzie zastosowano model myszy wszczepienny (myszy SCID, którym wszczepiono komórkami PC3). Badane związki podawano zwierzętom dwoma drogami (dożylnie i dootrzewnowo). Mimo, iż podawanie myszom kombinacji DON i TRIAL nie spowodowało istotnego zmniejszenia masy guza, to jednak ważną obserwacją było stwierdzenie jego zmniejszenia w porównaniu do myszy kontrolnych przez podanie samego DON. Ponadto Doktorantka zaobserwowała, iż czynnikiem powodującym widoczną utratę masy ciała myszy, również tych z grupy kontrolnej, nie traktowanych żadnym z badanych związków, był sam model wszczepienny, co również jest ważną informacją dla prowadzenia dalszych badań w tym obszarze. Uzyskane przez Panią mgr wyniki wskazują, iż DON może bezpośrednio wpływać zarówno na procesy komórkowe związane z nowotworzeniem, jak i modulować wielkość guzów w modelu wszczepiennym, co czyni je ważnymi naukowo i obiecującymi w aspekcie poszukiwania i opracowywania nowych strategii terapeutycznych.

Niezależnie od faktu poddania manuskryptów prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wymagającemu procesowi recenzji przed ich opublikowaniem, pozwolę sobie na pewne uwagi i komentarze. Proszę o doszczegółowienie informacji o zastosowanych testach statystycznych do oceny różnic istotnych statystycznie między badanymi grupami. Proszę również o wyjaśnienie użytych stężeń, zwłaszcza dla DON, oraz podanych jednostek. W przypadku zdjęć z mikroskopu wskazane jest podanie skali lub powiększenia zrobionych fotografii. W publikacji nr 1 na rysunku 1 należałoby wskazać źródło z którego zostały zaczerpnięte wzory prezentowanych związków.

Uzyskane wyniki i poczynione obserwacje zostały przez Doktorantkę podsumowane w rozdziale 4 pt. „Wnioski” w postaci zwięzłe sformułowanych 3 punktów,

które wskazują najistotniejsze obserwacje poczynione w oparciu o uzyskane wyniki. We wniosku 2 brakuje mi informacji o zależnym od stężenia działaniu DON na komórki PCa. Dobrym uzupełnieniem byłoby także dodanie informacji, być może w postaci podsumowania lub jednego dodatkowego „wniosku” z przeprowadzonej dogłębnej analizy piśmiennictwa w pracy przeglądowej, na której doktorantka oparła kierunek badań, a także wskazanie dalszych, możliwych kierunków badań w tym obszarze.

Podsumowując, Pani mgr Dominika Habrowska-Górczyńska w sposób prawidłowy zaprojektowała i przeprowadziła badania, dokonując uprzednio dogłębnej analizy teoretycznej opartej o przegląd dostępnych danych z piśmiennictwa światowego. Wyniki badań z powodzeniem zostały opublikowane w impaktowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, co pozwoliło na ich zaprezentowanie w postaci monotematycznego cyklu 3 publikacji składających się na recenzowaną rozprawę doktorską. Ich wartość naukowa nie budzi żadnych zastrzeżeń, a wybrana tematyka, zaplanowanie badań oraz ich realizacja w oparciu o bogaty warsztat badawczy, wskazuje na dojrzałość i doświadczenie naukowe Doktorantki. Poczynione obserwacje i uzyskane wyniki mają dużą wartość naukową i silny aspekt poznawczy. Z uwagi na ważność tematu, wpisującego się w trendy poszukiwania nowych lub wykorzystania znanych już związków w terapii chorób nowotworowych, w tym raka gruczołu krokowego, zachęcam Panią mgr do kontynuowania badań, gdyż rola składników żywności, zarówno w indukowaniu procesów nowotworowych jak i wykorzystaniu ich potencjału prewencyjnego lub terapeutycznego jest nie do przecenienia i jest obiektem stałych badań i dociekań naukowych.

W oparciu o powyższe, z przyjemnością mogę stwierdzić, iż przedłożona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ww. Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym z 20 lipca 2018 roku (Dz.U. z 2018r. poz. 1668 z późn. zmianami) i wnoszę do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, o dopuszczenie Pani mgr Dominiki Habrowskiej-Górczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Dominiki Habrowskiej-Górczyńskiej zatytułowanej „Mykotoksyny jako czynniki uwrażliwiające komórki nowotworowe na znane chemioterapeutyki” stosowną nagrodą z uwagi na wysoką wartość naukową, zastosowany szeroki warsztat badawczy oraz duży potencjał poznawczy uzyskanych wyników.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
kierownik

prof. dr hab. Agnieszka Piwowar

Wrocław, 01.09.2023r.