

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

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

mgr Dominiki Ewy Habrowskiej-Górczyńskiej

„Mykotoksyny jako czynniki uwrażliwiające komórki nowotworowe na znane chemioterapeutyki”

Wśród związków chemicznych pochodzenia naturalnego mykotoksyny zajmują szczególne miejsce. Ich powszechne występowanie, różnorodna toksyczność oraz brak skutecznych sposobów ograniczenia ich negatywnego wpływu na organizmy powoduje, że badania nad tą grupą związków mają istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i praktyczne. Z perspektywy zdrowia człowieka największe znaczenie mają toksyny pleśni obecne w żywności, w szczególności te wytwarzane przez *Fusarium spp.* (m.in. deoksyniwalenol, zearalenon), jak również *Aspergillus spp.* (w szczególności kancerogenne aflatoksyny). O ile wiedza na temat występowania mykotoksyn jest dość szeroka to nadal brakuje pełnego poznania mechanizmów oddziaływania tych związków na poszczególne procesy biochemiczne w organizmach żywych. Badania mające na celu poznanie tych procesów mają bardzo istotne znaczenie dla szeroko pojętych nauk o życiu. Na świecie jest szereg zespołów naukowych podejmujących tę tematykę badań, a ich obszar zainteresowań w szczególności dotyczy poznania i zrozumienia mechanizmów negatywnego wpływu mykotoksyn na organizmy.

Okazuje się jednak, że mechanizmy działania DON można (prawdopodobnie) wykorzystać w terapii nowotworowej. Na ten niezwykle oryginalny kierunek badań zdecydowała się Doktorantka w ramach swojej pracy doktorskiej. Wykorzystała ona potwierdzone w jej zespole naukowym wyniki badań świadczące o istotnym wpływie deoksyniwalenolu (DON) na proces steroidogenezy komórek raka prostaty i postawiła śmiałą hipotezę: mykotoksyna ta może w określonych dawkach uwrażliwiać komórki gruczołu

krokowego na znany chemioterapeutyk TRAIL. Innymi słowy, badania podjęte przez Doktorantkę miały za cel weryfikację czy DON może zostać być kandydatem do wykorzystania w chemioterapii przeciwnowotworowej raka prostaty jako związek poprawiający skuteczność TRAIL poprzez zwiększenie podatności komórek na indukowaną przez ten związek apoptozę. Podejmując się tego tematu Doktorantka, zdecydowała się pójść wymagającą i ryzykowną drogą badań, które do tej pory nie były prowadzone. Poza aspektami *stricte* poznawczymi związanymi z rozszerzeniem wiedzy na temat wpływu deoksyniwalenolu na procesy biochemiczne w obrębie komórek nowotworowych, podjęty temat może mieć istotne znaczenia dla prowadzenia skutecznych terapii onkologicznych raka prostaty. Reasumując tę część recenzji, bardzo wysoko oceniam decyzję o realizacji tego ambitnego tematu. Wynika ona z dobrego rozeznania w aktualnym piśmiennictwie dotyczącym mechanizmów toksyczności mykotoksyn na poziomie komórkowym a jednocześnie świadczy o odwadze podejmowania nowych naukowych wyzwań.

O ile tytuł pracy doktorskiej sugeruje, że Doktorantka będzie badała kilka związków z grupy mykotoksyn, to przedstawione wyniki i wnioski dotyczą wyłącznie deoksyniwalenolu. Dla porządku zatem zaznaczę, że tytuł pracy powinien raczej obejmować jedynie jeden związek i brzmieć np. „Deoksyniwalenol jak czynnik uwrażliwiający komórki nowotworowe na znane chemioterapeutyki”, tym bardziej, że w tytułach wszystkich trzech publikacji jest on wymieniony z nazwy.

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 dwustronicowy wstęp, który w przystępny sposób wprowadza czytelnika w tematykę badań i logicznie argumentuje podjęcie tematu badań. W tej części Doktorantka nie uniknęła drobnych nieścisłości. W streszczeniu jak i we wstępie znajdujemy trudne do udowodnienia stwierdzenie, że DON jest mykotoksyną znacząco akumulującą się w tkankach zwierzęcych. Dodatkowo Doktorantka nieopatrznie podaje wartości limitów dla DON w pokarmach i paszy w jednostkach „µg/kg masy ciała” zamiast „µg/kg”.

Następnie Doktorantka formułuje główny cel pracy, którym jest weryfikacja czy DON może uwrażliwiać komórki nowotworowe na chemioterapeutyk TRAIL. Cel główny ma być zrealizowany w praktyce poprzez nakreślenie trzech szczegółowych celów, obejmujących ocenę wpływu działania DON i TRAIL na procesy biochemiczne (stres oksydacyjny

i apoptozę) w liniach komórek rakowych oraz modelu wszczepionym u myszy. Moje uznanie budzi chęć całościowej weryfikacji postawionej hipotezy, zarówno na drodze rozbudowanych badań *in-vitro* jak i *in-vivo*.

Zasadniczą część rozprawy doktorskiej stanowi cykl trzech publikacji, z których jedna jest pracą przeglądową wprowadzającą czytelnika w zagadnienie, natomiast dwie pozostałe to prace doświadczalne. W tej części rozprawy znajdujemy trzy oddzielne opisy poszczególnych publikacji, które w prosty sposób tłumaczą najważniejsze informacje i wyniki badań.

W pracy przeglądowej „*Deoxynivalenol as potential modulator of human steroidogenesis*” (Urbanek, Habrowska-Górczyńska, et al. *J Appl Toxicol.* 2018 Dec;38(12):1450-1459), Doktorantka przedstawia aktualne informacje na temat powstawania i występowania deoksyniwalenolu w żywności a następnie szeroko opisuje jego losy w organizmach skupiając się na toksyczności dla zwierząt i ludzi. Autorka szczegółowo tłumaczy mechanizm działania toksycznego na poziomie komórkowym 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 zrozumienie mechanizmów i konsekwencji tego działania. Praca przeglądowa stanowi dobry wstęp do dalszych badań jednocześnie stanowiąc dowód na szeroką wiedzę Doktorantki w podejmowanej tematyce. Warto również podkreślić, że praca przeglądowa cytuje ponad 80 pozycji aktualnego piśmiennictwa naukowego i stanowi wartościową pozycję dla czytelników zainteresowanych molekularnymi podstawami toksyczności DON.

W pracy doświadczalnej “*Deoxynivalenol modulates the viability, ROS production and apoptosis in prostate cancer cells*” (Habrowska-Górczyńska et al., *Toxins (Basel)*, 2019, 11(5):265, Doktorantka opisuje wyniki badań wpływu pojedynczej ekspozycji DON na żywotność komórek, stres oksydacyjny, apoptozę i cykl komórkowy. Autorka prowadzi swoje doświadczenia na czterech różnych modelach *in-vitro* obejmujących linie komórkowe o różnej wrażliwości na androgeny: modele androgenno niezależne (PC3 i DU-145) i modele androgenno zależne (LNCaP i 22Rv1). Doktorantka prowadzi swoje badania stosując imponującą gamę nowoczesnych metod m.in. bada żywotność komórek (test MTT), ocenia morfologię komórek techniką mikroskopową, analizuje wpływ DONu na cykl komórkowy (cytometria przepływowa), bada ekspresję genów (technika RT-qPCR) i białek (Western Blot)

związanych ze steriodogenezą. W badaniach nad wpływem DON na apoptozę komórek bada intensywność produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), ekspresję wybranych enzymów przeciwutleniających (SOD i GPx), depolaryzację błony mitochondrialnej oraz uszkodzenia DNA. W prowadzonych badaniach wyraźnie widać chęć szerokiego spojrzenia na mechanizmy działania mikotoksyny na procesy biochemiczne w komórkach nowotworowych. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują na istotny wpływ DON na żywotność komórek raka prostaty poprzez indukcję stresu oksydacyjnego i apoptozy. Praca ta stanowi doskonały przykład dobrze zaplanowanych, zrealizowanych i opisanych badań naukowych. Widać w niej jednocześnie dużą swobodę i dojrzałość badawczą Doktorantki, która z wyników dużej liczby testów potrafi wyciągać wyważone wnioski.

W drugiej pracy doświadczalnej "*Effect of the mycotoxin deoxynivalenol in combinational therapy with TRAIL on prostate cancer cells*", Habrowska-Górczyńska et al., *Toxicol Appl Pharmacol.* 2023, 461:116390), Doktorantka kontynuuje opisane wcześniej badania nad wpływem DON na komórki nowotworowe gruczołu krokowego, tym razem w kontekście możliwości włączenia mikotoksyny w terapię łączoną z TRAIL. Autorka tym razem rozszerza metodykę prowadzonych badań i do pokaznego zestawu badań *in-vitro* (modele komórkowo androgenno niezależne (PC3 i DU-145) i modele androgenno zależne (LNCaP i 22Rv1 wykorzystywane w pierwszej pracy doświadczalnej) dodaje również badania na *in-vivo* (myszy SCID ze wszczepionymi komórkami PC3). Wyniki badań *in-vitro* wskazują na różnorodne działanie DON na komórki nowotworowe i częściowo potwierdzają uwrażliwiające działanie mykotoksyny w kombinacji z czynnikiem TRAIL (komórki PC3). Wyniki badań *in-vivo* nie potwierdzają niestety badań na liniach komórkowych; zastosowanie kombinacji DON+TRAIL nie zmniejszyło istotnie masy guza u myszy w porównaniu z grupą kontrolną. Badania te z pewnością zasługują na kontynuowanie i być może bardziej szczegółową weryfikację wpływu kombinacji DON+TRAIL na procesy nowotworzenia.

Wszystkie prace zostały opublikowane w uznanych czasopismach międzynarodowych a ich sumaryczny współczynnik wpływu (*impact factor*) wynosi 10,396. Doktorantka jest ich pierwszym (lub równorzędnym) autorem i, zgodnie z załączonymi deklaracjami autorów, miała dominujący wkład w ich powstanie. Zarówno praca przeglądowa „*Deoxynivalenol as potential modulator of human steroidogenesis*” jak i publikacja doświadczalna „*Deoxynivalenol modulates the viability, ROS production and apoptosis in prostate cancer cells*” uzyskały już uznanie w świecie naukowym, o czym świadczy znacząca liczba kilkudziesięciu cytowań (wg Web of Science). Dobór prac jest logiczny a praca doktorska jako całość stanowi

przemyślane, dobrze zrealizowane badania, które wskazują nowe kierunki przyszłych doświadczeń.

W tym miejscu pracy doktorskiej zabrakło mi części pod tytułem: „Dyskusja” lub „Podsumowanie”, w którym Doktorantka zebrałaby w syntetyczny sposób całość wyników przeprowadzonych badań i porównała z aktualną piśmiennictwem naukowym.

W czwartej części pracy Doktorantka zawarła trzy wnioski. O ile pierwsze dwa wnioski nie budzą moich zastrzeżeń i są dobrze zakorzenione w uzyskanych wynikach o tyle wniosek trzeci w zakresie stwierdzenia: „wyniki (...) potwierdziły, że DON wpływa na zmniejszenie guza” wydaje się w mojej ocenie w świetle uzyskanych wyników dość jednoznaczny. Obserwacja ta dotyczyła okresowego zmniejszania guza (w porównaniu z grupą kontrolną) u myszy w dwóch spośród dziewięciu pomiarów (13 i 15 dnia) w doświadczeniu trwającym 28 dni w grupie myszy otrzymującej DON w dawce 1 µg/kg masy ciała. Zgadając się, że jest to bardzo interesująca obserwacja uważam, że wysnuwanie z tego faktu daleko idących wniosków na tym etapie wiedzy jest nieco przedwczesne, a tak sformułowany wniosek ten byłby uzasadniony po przeprowadzeniu dodatkowych badań.

Pracę doktorską zamyka bibliografia (15 pozycji), w której zdecydowana większość cytowanych publikacji została opublikowana po 2010 roku. W dalszych częściach znajdujemy również załączone prace stanowiące cykl i oświadczenia współautorów określających ich wkład w powstanie poszczególnych publikacji. Pracę doktorską zamyka część wskazująca na bogaty całościowy dorobek naukowy Doktorantki.

Powyższe, nieliczne 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. Jestem pod dużym wrażeniem rozległości metodycznej przeprowadzonych badań oraz dojrzałości Doktorantki w wyciąganiu wniosków z bardzo szerokiego materiału eksperymentalnego. Warta szczególnego podkreślenia jest umiejętność opisanie i dyskusowania wyników, które nie potwierdziły działania DON+TRAIL w modelu *in-vivo*. Jest to dobry przykład odwagi i uczciwości naukowej Doktorantki, która nie uległa pokusie „schowania tych wyników do szuflady”, i mimo braku sukcesu naukowego w tej części badań włączyła je do publikacji.

Podsumowując 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.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę istotność przeprowadzonych badań i jakość publikacji stanowiących niniejszą rozprawę wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej.

KIEROWNIK
Zakładu Farmakologii i Toksykologii
Prof. dr hab. Piotr Jedziniak

