



ZAKŁAD BIOCHEMII PORÓWNAWCZEJ I BIOANALITYKI
WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków 14.07.2016

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Magdaleny Siemieniuk

pt. „Metaboliczne uwarunkowania odpowiedzi na oksytiaminę komórek nowotworowych oraz grzybów drożdżopodobnych”

Oceniana praca została zrealizowana pod względem doświadczalnym i redakcyjnym w Instytucie Biologii na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku pod opieką promotora dr hab. Adama Tylickiego.

Tiamina należąca do grupy witamin B jest substancją niezbędną w spełnianiu funkcji życiowych wszystkich organizmów, co wynika z jej udziału w głównych procesach metabolicznych a także pełnienia wciąż badanej, niekofaktorowej roli, związanej z przekazywaniem sygnałów nerwowych czy ochroną przed działaniem stresu środowiskowego na komórki. I mimo, że witamina ta znana jest już od czasów badań Kazimierza Funka, do dziś skrywa swoje tajemnice zarówno pod względem spełnianych funkcji jak i możliwych aplikacji. Taką analizę aplikacyjną przedstawiła w swojej rozprawie doktorskiej Pani mgr Magdalena Siemieniuk, prezentując możliwości wykorzystania pochodnej tiaminy – oksytiaminy w hamowaniu infekcji grzybiczych, zestawiając otrzymane efekty mikrobójcze względem drożdżaków, zdolnych do prowadzenia własnych procesów biosyntezy tiaminy, z odpowiedzią ze strony komórek nowotworowych, uzależnionych wyłącznie od mechanizmów transportu tej witaminy, dostarczanej do organizmu ludzkiego wraz z pożywieniem.

W recenzowanej pracy, autorka skorelowała szczegółowe analizy biochemiczne dotyczące modyfikacji metabolizmu w trakcie podaży oksytiaminy z przeżywalnością wszystkich typów komórek, ze wskazaniem skutecznej dawki antywitaminy, jak również zaproponowała jej aplikację w konkretnych infekcjach skórnych u zwierząt, w terapii skojarzonej z działaniem innych, popularnych w tym zakresie środków.

Praca posiada układ typowy dla tego typu opracowań i zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, wyczerpujący wstęp, drobiazgowo wyprowadzone cele pracy, opisy użytych

materiałów i metod, szczegółowe wyniki badań oraz ich szeroką dyskusję. Pracę kończy wykaz piśmiennictwa, liczący 171 pozycji. W tekście zamieszczone zostały 43 rysunki i 30 tabel.

We wstępie doktorantka przedstawiła podsumowanie opisanych do tej pory pochodnych tiaminy, pełniących zarówno funkcje metaboliczne jak też syntetyzowanych na przestrzeni ostatnich lat w celu analizy funkcjonalności głównych elementów strukturalnych jej cząsteczki lub pełniących własności antywitamin, do których zalicza się między innymi amprolium, pirytiaminę i oksytiaminę. Z kolei, dla funkcjonalnych metabolicznie estrów fosforanowych tiaminy, autorka przedstawiła procesy ich biosyntezy, z uwzględnieniem różnic w zależności od rodzaju prowadzących je organizmów, oraz wskazała i szeroko omówiła procesy, w których mogą uczestniczyć estry fosforanowe tiaminy, czy bardziej skomplikowane strukturalnie ich pochodne. Dla difosforanu tiaminy (TDP) autorka przedstawiła kompletny mechanizm jego funkcjonowania jako koenzymu w centrach aktywnych enzymów, należących do głównych szlaków metabolicznych oraz wzajemne korelacje ich działania. Nakreślony został też problem wciąż nie do końca poznanych pochodnych trifosforanowych tiaminy, odpowiedzialnych za niekofaktorową rolę tiaminy związaną m.in. z przekazem sygnałów nerwowych bądź z udziałem w procesach bioenergetycznych w komórkach ludzkich oraz zaangażowaniem w odpowiedzi mikroorganizmów i roślin na stres środowiskowy. Zabrakło mi tu tylko rozważań nad ewentualną możliwością udziału tiaminy lub jej pochodnych w procesach antyoksydacyjnych, promowaną w ostatnich latach w literaturze. W dalszej części wstępu autorka omówiła problem transportu witaminy w drożdżach i komórkach ssaczych, będących przedmiotem jej dalszych badań oraz przedstawiła obraz konsekwencji niedoborów tiaminy w diecie lub defektów transportu witaminy w obrębie organizmu człowieka. W omówieniu pochodnych tiaminy o roli antywitaminowej, autorka precyzyjnie wskazała miejsca ich konkurencji z endogenną tiaminą, prezentując bardzo przejrzysty schemat i przygotowując grunt do prezentacji celu dalszych swoich działań eksperymentalnych.

Informacje zawarte we Wstępie zostały zaprezentowane w kompetentny sposób, świadczący o bardzo dobrej znajomości literatury w zakresie podejmowanych badań i stanowią doskonale wprowadzenie w dalszą tematykę rozwiązywanych zadań badawczych oraz dobrą podstawę do dalszej, zaawansowanej dyskusji.

Do głównych celów przedstawionej rozprawy doktorskiej należała ocena wrażliwości na oksytiaminę dwóch typów komórek: (i) mikroorganizmów należących do rodzajów *Saccharomyces*, *Candida* i *Malassezia*, posiadających zdolność przeprowadzania własnej biosyntezy tiaminy, oraz (ii) komórek ludzkich, reprezentowanych przez różne typy komórek nowotworowych, których metabolizm uzależniony jest od zewnętrznych źródeł tiaminy i jej obecności w pożywkach

hodowlanych. Następnie zaplanowano skorelowanie wrażliwości na oksytiaminę badanych komórek z wybranymi procesami metabolicznymi, by w końcowym etapie rozważyć możliwości aplikacyjne cytostatycznych właściwości oksytiaminy i jej wykorzystanie w kombinacji ze znanymi farmaceutykami, stosowanymi w drożdżowych infekcjach skórnych.

Do oceny wrażliwości komórek na działanie oksytiaminy doktorantka użyła testów, w których wyznaczała: MIC (minimalne stężenie hamujące wzrost mikroorganizmów) oraz MCF (najniższe grzybobójcze stężenie oksytiaminy), parametry zbliżone pod względem dostarczanej informacji, lecz realizowane odmienną procedurą eksperymentalną, co przydaje wiarygodności wyznaczonym wartościom. Podobne testy przeprowadzono dla komórek nowotworowych, oznaczając żywotność (MTT) oraz wyznaczając GI50 (stężenie antywitaminy ograniczające wzrost komórek do 50% wartości referencyjnej). Uzyskane wyniki wskazały w modelu drożdżowym (biosyntetyzującym tiaminę) na *M. pachydermatis* jako na drożdżaki posiadające największą wrażliwość na działanie oksytiaminy, w przeciwieństwie do *C. albicans*, które okazały się najbardziej odporne na jej działanie, mierzone w zakresie stężeń do 20 mg/ml. W komórkach nowotworowych efekt ten był o wiele bardziej wyrazisty i związany z faktem uzależnienia tych komórek wyłącznie od pobierania i transportu witaminy B1 ze źródeł zewnętrznych.

W tym miejscu rodzi się pytanie jaki efekt miałyby takie samo stężenie tiaminy (20 mg/ml) w pożywce, w której zwykle tiamina występuje w stężeniu w zakresie kilku μM . Jakiego rezultatu spodziewałaby się Doktorantka w takiej sytuacji i czy taka analiza mogłaby dostarczyć nowych czy dodatkowych informacji, nie tyle dotyczących żywotności co ewentualnie metabolizmu różnych typów komórek i w konsekwencji ich oporności na oksytiaminę.

W drugiej grupie eksperymentów, korzystając z technik genetyki molekularnej oraz specjalistycznych analiz chromatograficznych (wysokosprawna chromatografia cieczowa i chromatografia gazowa) autorka skupiła się na analizie wybranych efektów metabolicznych działania oksytiaminy w badanych modelach komórkowych. Dotyczyły one tlenowego i beztlenowego pozyskiwania energii, biosyntezy lipidów oraz wewnątrzkomórkowego metabolizmu tiaminy. W badaniach tych doktorantka dokonała oznaczeń ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w przemianach oksydacyjnych, fermentacyjnych i cyklu kwasu glioksalanowego, oraz pomiaru aktywności tych enzymów w wybranych modelach. Analizie poddana została także zmienność profilu lipidowego oraz poziom i rodzaju kwasów tłuszczowych obecnych w komórkach traktowanych oksytiaminą. W kolejnym kroku autorka oszacowała poziom tiaminy i jej estrów fosforanowych w ekstraktach sporządzonych dla wybranych modeli komórkowych, w obecności oksytiaminy.

Uzyskane w tej części wyniki były dość zróżnicowane i trudne w globalnej interpretacji; tym bardziej na uznanie zasługuje sposób ich podsumowania przedstawiony przez doktorantkę w wyczerpującej dyskusji. Rozważając dla drożdżaków rolę dekarboksylazy pirogronianowej, która może odpowiadać za aktywację metabolizmu fermentacyjnego w odpowiedzi na obecność oksytiaminy, autorka uzasadnia obserwowane efekty oporności *S. cerevisiae* i *C. albicans* na tę antyvitaminę przeciwstawiając im *M. pachydermatis*, niezdolny do beztlenowego pozyskiwania energii i mniej odporny na oksytiaminę. Dane te Autorka umiejętnie skorelowała także z obserwacjami dotyczącymi wyhamowania cyklu Krebsa i niską aktywnością szlaku glioksalanowego w tych warunkach. Jednocześnie dane te wytypowały *M. pachydermatis* jako organizm, który może w infekcjach powierzchniowych stać się podatnym na zewnętrzną aplikację leków zawierających oksytiaminę.

Moje zastrzeżeniu budzi tu jedynie fakt wnioskowania o poziomie występowania dekarboksylazy pirogronianowej w ekstraktach komórkowych na podstawie ich analizy elektroforetycznej i porównania obrazów tych rozdzielów z wynikiem uzyskanym dla preparatu handlowego. Należało tu raczej użyć procedury Western blotting, z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał.

Analiza zmian w poziomie tiaminy i jej estrów fosforanowych mierzonych w ekstraktach komórkowych drożdżaków i komórek nowotworowych wyraźnie zaprezentowała we wszystkich przypadkach obniżenie poziomu TDP, co można tłumaczyć zablokowaniem centrum aktywnego pirofosfokinazy tiaminy, jak słusznie zauważa doktorantka. Niemniej jednak przedstawienie tych zmian jedynie w skali procentowej uniemożliwia wnioskowanie np. o przebiegu transportu tiaminy w tych komórkach, w obecności oksytiaminy. A przecież on również mógł ulec zaburzeniu, zgodnie ze schematem zamieszczonym na rys. 10 i mógł stać się dodatkową przyczyną obniżenia poziomu TDP. Ponadto, zmiany metaboliczne wynikłe z obecności oksytiaminy mogły aktywować fosfatazy, mniej lub bardziej specyficzne, powodując hydrolizę TDP. Taki wzrost poziomu produktu jego hydrolizy obserwujemy w komórkach nowotworowych w obecności oksytiaminy (rys. 31).

Warto rozważyć uzyskane wyniki także i w tym kontekście a moją ciekawość budzą tu szczególnie możliwości wnioskowania o transporcie tiaminy w obecności oksytiaminy w tych komórkach. Czy proces ten mógłby zostać zbadany – może bardziej precyzyjnie, z zastosowaniem innej metodyki?

Gospodarka lipidowa zachowała w obecności antyvitaminy znacznie większą stabilność, aczkolwiek najbardziej wrażliwy z drożdżaków wykazał wyraźny spadek zawartości kwasów tłuszczowych, co może wiązać się z zaburzeniem struktury i stabilności jego ściany komórkowej a stąd

większej podatności na działanie oksytiaminy. Najbardziej odporne komórki nowotworowe wykazały z kolei zwiększenie poziomu kwasów tłuszczowych po zadaniu oksytiaminą, natomiast każdy rodzaj analizowanych komórek prezentował pewną charakterystyczną proporcję ich rodzaju, co doktorantka starała się szczegółowo uzasadniać w części dyskusji stosownymi ich preferencjami metabolicznymi.

Najciekawszym i wciąż rozwojowym aspektem rozprawy doktorskiej jest przedstawienie możliwości aplikacji oksytiaminy w infekcjach grzybiczych w formie leków o działaniu miejscowym, co ogranicza ryzyko ewentualnych skutków ubocznych dla leczonego organizmu. W tej części badań doktorantka wstępnie oszacowała potencjał antymykotyczny oksytiaminy w odniesieniu do imponującej grupy szczepów środowiskowych (66 szczepów!!) i porównała jej skuteczność z działaniem klasycznego leku antygrzybiczego – ketokonazolu, by w końcowym etapie przeanalizować ich skojarzone działanie.

Na podstawie przedstawionych informacji, trudno rozsądzić czy doktorantka korzystała z dostępnej kolekcji Zakładu Cytobiochemii czy, sądząc z pełnego opisu ich pozyskania, sama zgromadziła tę kolekcję, co oznacza ogrom wykonanej pracy przy pozyskiwaniu materiału do badań.

Autorka uzyskała tu imponujący rezultat skuteczności takiej mieszaniny, obniżając o cztery rzędy wielkości ich wydajne stężenie. W ramach prowadzonej współpracy, przy zastosowaniu preparatów hydrożelowych, wzbogaconych o precyzyjnie dobraną mieszaninę obu związków, uzyskano preparat, który jak sędzę ma szansę zostać w przyszłości wprowadzony do stosowania w terapii grzybic zwierzęcych. Otwiera to szeroką drogę dla Doktorantki i Promotora w pozyskiwaniu funduszy na dalsze interesujące badania i daje znanej od dawna cząsteczce tiaminy szansę zaistnienia w zupełnie nowej perspektywie.

Nasuwa się tu pytanie czy obserwowana kooperacja tych dwóch związków może być uzasadniona konkretnym mechanizmem – jeśli tak, proszę o przedstawienie możliwych propozycji.

Skrupulatnie zaplanowane zagadnienia badawcze zostały w części doświadczalnej pracy konsekwentnie zrealizowane, z wykorzystaniem szeregu popularnych metod i technik eksperymentalnych. A uzyskane wyniki autorka dogłębnie przeanalizowała i skorelowała z aktualnymi danymi literaturowymi.

Rolą recenzenta, choć niewdzięczną, jest także wskazywanie błędów. W rozprawie doktorskiej zauważyłam pewne wątpliwe sformułowania oraz drobne uchybienia, czy błędy redakcyjne, które jednak nie wpływają na moją wysoką ocenę merytoryczną całości pracy. Należą do nich:

- brak jednolitego nazewnictwa chemicznego w zestawie skrótów dotyczących HMP-P i HMP-PP w części skrótów na str. 7; lub błędny opis pełnej cząsteczki tiaminy na str. 19 (opisując fragmenty: pirymidynowy i tiazolowy, połączone mostkiem metylenowym, należałoby pominąć podstawnik w pozycji 5'-pirymidyny a w odniesieniu do komponenty tiazolowej, w jej nazwie podstawnik hydroksyetylowy w pozycji 5 został błędnie opisany jako hydroksymetylowy;
- stosowanie nietrafionych terminów czy wręcz „slangu” laboratoryjnego: np. pelet komórkowy, worteksować, inhibować, próba odnośnikowa, hipotonizacja, wariant kontrolny i eksperymentalny, denaturacja inicjalna, wizualizacja prążków metanolem i kwasem octowym;
- brak pewnych cytacji, np. dotyczących transportu tiaminy na str. 32, udziału amprolium w defosforylacji TDP na str. 39, czy informacji o „ znanych z literatury faktów stosowania oksytiaminy” na str. 95;
- błędy w cytowaniu: Thornalley 2015 (2005), brak rozróżnienia dwóch cytacji Zastre i wsp., 2013; Tylicki i wsp., 2005;
- nieadekwatny podpis pod rys. 10, str. 38 - podpis mówi o mechanizmach a wskazane jest miejsce działania oksytiaminy;
- przeciwstawne informacje dotyczące *C. albicans* zamieszczone w tabeli i tekście – s.90, tab.17.

Podsumowując moją ocenę pragnę podkreślić, że praca doktorska Pani magister Magdaleny Siemieniuk prezentuje spójne wyniki zmierzające do określenia możliwości aplikacyjnych wyselekcjonowanej pochodnej tiaminy, po uprzednim przeprowadzeniu wnikliwych badań dotyczących jej wpływu na metabolizm drożdżaków i komórek nowotworowych, co może otworzyć nowy rozdział w badaniach roli tiaminy w ich funkcjonowaniu. Wyniki przedstawione zostały niezwykle rzetelnie, ze skrupulatną analizą statystyczną i przeanalizowane w świetle aktualnych danych prezentowanych w najnowszych artykułach naukowych, wskazując na wysokie kwalifikacje naukowe doktorantki. Podkreślić należy także fakt, że część uzyskanych wyników została już opublikowana w czasopiśmie z listy filadelfijskiej.

W mojej ocenie praca stanowi istotny wkład nie tylko w poznawanie działania tiaminy w różnych typach komórek, ale, co równie ważne, wskazuje możliwości aplikacyjne dla jej analogów strukturalnych w zwalczaniu chorób grzybiczych.

Uważam, że przedłożona do oceny praca doktorska Pani mgr Magdaleny Siemioniuk spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2013 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595, z późn. Zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Biologiczno-

Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie Pani magister Magdaleny Siemieniuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy, zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie.



Dr hab. Maria Rapała-Kozik