



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Samodzielna Pracownia Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

Ocena pracy doktorskiej pt.:

**Metaboliczne uwarunkowania odpowiedzi na oksytiaminę komórek
nowotworowych oraz grzybów drożdżopodobnych**

wykonanej przez

mgr Magdalenę Siemieniuk

w Instytucie Biologii
Wydziału Biologiczno-Chemicznego
Uniwersytetu w Białymstoku



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Samodzielna Pracownia Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

Tiamina jest egzogenną witaminą pełniącą ważną funkcję w metabolizmie drobnoustrojów, zwierząt i człowieka. Dotychczas najlepiej poznano funkcję difosforanu tiaminy, który jest koenzymem istotnych dla bioenergetyki komórek enzymów mitochondrialnych: kompleksu dehydrogenaz pirogronianowej i 2-oksoglutaranowej oraz cytozolowej transketolazy. Funkcje pozostałych pochodnych fosforanowych tiaminy nie zostały w pełni wyjaśnione. Niedobory tiaminy powodują istotne konsekwencje dla komórek, np. u ludzi niedobór tiaminy powoduje zaburzenia układu nerwowego oraz rozwój chorób metabolicznych. Istotna rola tiaminy w metabolizmie komórek pozwoliła na wskazanie tej witaminy jako celu strategii farmakologicznych. Podjęto próby wykorzystania antywitaminowych pochodnych tiaminy takich do zaburzenia zależnych od witaminy B₁ procesów metabolicznych patogenów i komórek nowotworowych. Badania z tego zakresu nie są jednak pełne.

Pani mgr Magdalena Siemieniuk wysunęła hipotezę dotyczącą wpływu syntezy endogennej tiaminy na podatność działania oksytiaminy w komórkach. W tym celu podjęła próbę porównania efektów i mechanizmów działania tej antywitaminy w dwóch modelach komórkowych: modelu komórek syntetyzujących tiaminę *de novo* oraz komórek nie mających takich zdolności. Pierwszy, model stanowiły komórki grzybowe syntetyzujące tiaminę: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* oraz *Malassezia pachydermatis*. Drugi model stanowiły niezdolne do syntezy tiaminy trzy linie komórek nowotworowych: raka szyjki macicy (HeLa-C) oraz raka piersi (MCF-7 i MDA-MB-231). Taki dobór linii komórkowych uważam za uzasadniony do realizacji założonych celów badawczych zaproponowanych przez Doktorantkę.

Podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione z punktu widzenia poznawczego, toksykologicznego jak i farmakoterapeutycznego. Mgr Magdalena Siemieniuk sformułowała oryginalny cel pracy doktorskiej i pod tym względem zgromadziła we wstępie informacje o tiaminie, jej funkcjach biologicznych, zaburzeniach spowodowanych niedoborami tej witaminy oraz przedstawiła rolę antywitamin tiaminy w zaburzeniach metabolizmu komórek. Zagadnienia te stanowią przedmiot intensywnych



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Samodzielna Pracownia Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

badań. Świadczy o tym aktualna literatura zamieszczona w rozprawie doktorskiej. Literatura omawianych zagadnień została starannie dobrana tematycznie i w przeważającej części obejmuje publikacje z ostatnich dziesięciu lat. Kilka cytowanych prac, opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych stanowi dorobek Pracowników Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku. Na podkreślenie zasługuje staranny i bardzo szczegółowy opis metodologii badań wykorzystanych przez Doktorantkę oraz bardzo estetyczna strona edytorska pracy.

Badania przeprowadzone przez mgr Magdalenę Siemieniuk obejmowały szeroki panel nowoczesnych technik z zakresu biologii molekularnej i metod analitycznych. Doktorantka wyznaczyła krzywe wzrostu badanych grzybów poddanych działaniu oksytiaminy, określiła wartości MIC, MFC i GI_{50} . W przypadku komórek nowotworowych oznaczyła cytotoksyczność tej antywitaminy testem MTT. W celu oceny biochemicznych efektów oddziaływania oksytiaminy oznaczyła w badanych komórkach aktywność dehydrogenazy jabłczanowej, lizy izocytrynianowej, dehydrogenazy mleczkowej, dekarboksylazy pirogronianowej. W celu określenia czy zaobserwowane zmiany w aktywności enzymów związane są ze zmianami na poziomie transkrypcji czy translacji Doktorantka wykonała oznaczenia rtPCR. Zawartość tiaminy i jej fosforanowych pochodnych oznaczyła metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Analizę zawartości kwasów tłuszczowych wykonała techniką chromatografii gazowej oraz chromatografii cienkowarstwowej. Zaplanowany przez mgr Siemieniuk cykl badań stanowi przemyślany i starannie zaplanowany panel eksperymentów pozwalających na pełną analizę założonego problemu badawczego.

W wyniku przeprowadzonych oznaczeń Autorka wykazała, że spośród badanych antywitamin jedynie oksytiamina powodowała istotne ograniczenie tempa wzrostu badanych komórek, aczkolwiek znamienność tego efektu była zależna od rodzaju komórek. W modelu komórek grzybowych najwyższą wrażliwość na oksytiaminę wykazała *M. pachydermatis*. Wartości MFC i GI_{50} wynosiły odpowiednio 5000 i 1600 $\mu\text{g/ml}$. Nie stwierdzono u tego gatunku fermentacji alkoholowej ani aktywacji cyklu gliksalanowego. Ponadto znacząco zmniejszył się udział difosforanu tiaminy w ogólnej puli pochodnych



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Samodzielna Pracownia Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

witaminy B₁. Zaobserwowano także spadek zawartości lipidów bez zmian proporcji w poszczególnych grupach kwasów tłuszczowych. Spośród przebadanych 66 środowiskowych szczepów *M. pachydermatis* tylko dla 15 wartość MIC była dwukrotnie wyższa w porównaniu ze szczepem referencyjnym. Stwierdzono także synergistyczne działanie oksytiaminy i ketokonazolu. Wzrost najbardziej opornych szczepów *M. pachydermatis* przy zastosowaniu kombinacji obu czynników całkowicie hamowały stężenia o 4 rzędy wielkości niższe niż substancje działające osobno.

Bardziej odporne na działanie oksytiaminy były *S. cerevisiae* (MFC = 20000 µg/ml, GI₅₀ = 14600 µg/ml). Oksytiamina powodowała u nich aktywację dekarboksylazy pirogronianowej wywołaną wzrostem ekspresji genu kodującego to białko. Całkowita zawartość lipidów pozostała bez zmian, chociaż wzrosła zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, kosztem kwasów jednonienasyconych.

Najbardziej odporne na oksytiaminę wśród drożdżaków była *C. albicans*, która charakteryzowała się GI₅₀ = 16000 µg/ml, a wartość MIC i MFC dla oksytiaminy przekraczała 40000 µg/ml. Na obecność oksytiaminy w pożywce reagowała wzrostem aktywności lizy izocytrynianowej oraz dehydrogenazy jabłczanowej, bez zmiany aktywności dekarboksylazy pirogronianowej. Tylko w tym przypadku udział difosforanu tiaminy w ogólnej puli pochodnych tiaminy obniżył się nieznacznie. Nie odnotowano zmian w całkowitej zawartości lipidów, chociaż wzrosła proporcja jednonienasyconych kwasów tłuszczowych kosztem kwasów nasyconych i wielonienasyconych.

Wśród modelu komórek nowotworowych najbardziej oporną na działanie oksytiaminy była linia MDA-MB-231 (GI₅₀ = 210 µg/ml) w porównaniu z HeLa-C (GI₅₀ = 35 µg/ml) i MCF-7 (GI₅₀ = 41 µg/ml). Oksytiamina nie powodowała w komórkach MDA-MB-231 spadku aktywności dehydrogenazy jabłczanowej i mleczanowej. Wzrosła natomiast ogólna zawartość lipidów, a ich profil zmienił się na korzyść estrów cholesterolu i triacylogliceroli. Najbardziej wrażliwe komórki HeLa-C, jako jedyne zareagowały na oksytiaminę spadkiem aktywności zarówno dehydrogenazy mleczanowej jak i jabłczanowej oraz największym



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Samodzielna Pracownia Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

spadkiem udziału difosforanu tiaminy w ogólnej puli pochodnych witaminy B₁. Natomiast ogólna zawartość lipidów nie uległa zmianie.

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują, że oksytiamina wykazuje właściwości cytotoksyczne w obu badanych modelach. Jednak większą oporność na działanie tej antywitaminy wykazują komórki zdolne do zachowania co najmniej niezmienionego poziomu syntezy lipidów, nawet jeśli zachwiane zostają proporcje pomiędzy poszczególnymi kwasami tłuszczowymi. Oporność komórek na oksytiaminę zależy także od cech metabolizmu. Bardziej wrażliwe są komórki grzybowe preferujące metabolizm tlenowy i niezdolne do fermentacji, co jest szczególnie widoczne wśród poszczególnych gatunków w modelu komórek grzybowych. Podwyższona oporność na oksytiaminę u grzybów w porównaniu z komórkami nowotworowymi warunkowana jest także aktywacją cyklu glioksalanowego, omijającego hamowane oksytiaminą enzymy cyklu Krebsa.

Wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań zostały przedstawione w postaci 19 rycin i 13 tabel. Stanowią one obszerną ilustrację złożonej pracy Doktorantki. Na ich podstawie Mgr Siemieniuk sformułowała 6 wniosków, odzwierciedlających najistotniejsze elementy poznawcze rozprawy.

Wyniki zawarte w niniejszej rozprawie oprócz znaczenia poznawczego mają także aspekt praktyczny. Wskazują, na potencjalne zastosowywanie oksytiaminy jako substancji o działaniu grzybobójczym na środowiskowe szczepy *Malassezia pachydermatis*. W aspekcie narastającej oporności grzybów na istniejące leki grzybobójcze jest to bardzo cenna obserwacja. Szczególne nadzieje można wiązać z wykorzystaniem tej antywitaminy jako czynnika wspomagającego dotychczas stosowane substancje lecznicze. Autorka rozprawy wskazuje także na potencjalne zastosowanie oksytiaminy jako leku przeciwnowotworowego. Jednakże, co bardzo cenne nie podchodzi bezkrytycznie do tego aspektu działania badanej antywitaminy. Wskazuje bowiem, na możliwość wystąpienia poważnych skutków ubocznych i sugeruje konieczność opracowania metod ukierunkowanej terapii, pozwalającej na dostarczenie substancji czynnej do nowotworu z pominięciem prawidłowych komórek organizmu.



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Samodzielna Pracownia Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

Wysoko oceniam umiejętności warsztatowe Doktorantki, zdolność rozwiązywania problemów badawczych, korzystania z literatury stanowiącej przedmiot pracy oraz interpretacji wyników. Uważam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Siemieniuk jest pracą wartościową, starannie przygotowaną warsztatowo i wnosi nowe elementy poznawcze w dziedzinie badań nad mechanizmem działania oraz zastosowaniem antywitamin witaminy B₁. Potwierdzeniem wysokiej wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej jest opublikowanie wyników badań w postaci trzech prac oryginalnych w czasopismach z listy filadelfijskiej, w których Doktorantka jest pierwszym lub drugim autorem.

Lektura niniejszej pracy doktorskiej nasuwa następujące uwagi:

1. Niektóre sformułowania użyte w pracy jak na przykład „rozpipetowałam” (strona 54), „koncentrację oczyszczonego RNA” (strona 66), „worteksomowałam” (strona 77) wymagają doprecyzowania.
2. W celu określenia mechanizmu zmian w aktywności badanych enzymów należałoby rozważyć oznaczenie ich ekspresji metodą Western-immunoblot.

Podsumowując chciałbym podkreślić, że powyższe uwagi dotyczą głównie zagadnień interpretacyjnych i nie obniżają wartości poznawczej wykonanej pracy.

Mgr Magdalena Siemieniuk zrealizowała założone cele badawcze, a przedstawiona mi do oceny praca odpowiada warunkom stawianym na stopień doktora. Upoważnia mnie to do wystąpienia z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie mgr Magdaleny Siemieniuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Wojciech Miłytyk

Białystok, 2016.07.10