



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wydział Lekarski Kształcenia Podyplomowego
Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
Ul. Chałubińskiego 1, 50-368 Wrocław
Tel. +4871/327-09-41 Fax. +4871/327-09-42
e-mail: dermw@um.wroc.pl <http://www.derm.um.wroc.pl>

Wrocław, 2017-06-16

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Katarzyny Anny Niedźwieckiej
pt. „Molecular mechanisms of 3-bromopyruvate activity in multiple myeloma
cells and pathogenic microorganisms of the genus Cryptococcus and
Prototheca” przygotowana na zlecenie Dziekanatu Wydziału Nauk
Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego zgodnie z Uchwałą Rady Wydziału
Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego nr 262/2016
z dnia 27 października 2016 r.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani Katarzyny Niedźwieckiej liczy 146 stron oprawionego wydruku komputerowego oraz dołączony na 1 stronie wykaz dorobku naukowego w postaci spisu publikacji i prezentacji na konferencjach. Tekst rozprawy przygotowany w języku angielskim podzielony jest na klasyczne części tego rodzaju opracowań tj. streszczenia w języku angielskim i polskim, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, perspektywy dalszych badań, piśmiennictwo i wykaz skrótów. Kończąc opisową część recenzji dodam, że:

1. Piśmiennictwo jest bardzo bogate, liczy 285 pozycji, głównie z ostatnich lat.
2. Dysertacja zawiera 41 rycin i 21 tabel, wśród rycin są też fotografie z mikroskopu świetlnego, fluorescencyjnego, elektronowego transmisyjnego i skaningowego.

Zarówno schorzenia nowotworowe jak i zachorowania na grzybice szczególnie narządowe należą do coraz częściej spotykanych obrazów klinicznych. Z uwagi na tą wzrastającą ilość przypadków chorobowych, ich mało poznana etiopatogenezę i trudności lecznicze stanowią one interesujący i bardzo ważki temat badawczy. Również prototekozę wywoływaną głównie przez algi z gatunków *Prototheca zopfi* i *Prototheca wickerhamii* z uwagi na szerokie rozpowszechnienie w przyrodzie staje się patogenem coraz częściej atakującym osoby z obniżoną odpornością. Trudności w terapii mogą inspirować badacza do poszukiwania nowych możliwości leczniczych. We wstępie Autorka przedstawia dane o częstości śmiertelnych zachorowań na nowotwory oraz grzybice narządowe. Główną przyczyną niepowodzeń leczniczych upatruje w dużej oporności komórek nowotworowych i eukariotycznych grzybów na znane i stosowane dotychczas leki. Zwraca również uwagę na narastającą częstość tego zjawiska.

W tej części rozprawy znajduje się też omówienie mechanizmów oporności grzybów na antymykotyki oraz komórek nowotworowych na chemioterapeutyki. Autorka przedstawia też szczegółowo pewne procesy biochemiczne występujące w komórkach nowotworowych czy patogennych grzybów. Omawia znacznie efektu Warburga w komórkach nowotworowych, który poprzez zmiany metabolizmu może warunkować wielolekową oporność. Analizuje też wpływ szoku oksydacyjnego i poziomu glutationu w komórce na oporność na szkodliwe działanie ksenobiotyków w tym preparatów leczniczych. W dalszej części wstępu następuje opis 3-bromopirogronianu (3BP) uzyskiwanego w wyniku bromowania pirogronianu. W 2000

roku stwierdzono jego silne właściwości przeciwnowotworowe. Zaletą okazała się jego wysoka aktywność wobec komórek nowotworowych wykazujących efekt Warburga oraz mała toksyczność dla komórek zdrowych. Oprócz takich aktywności opisano też jego działanie antybakteryjne i przeciwpasożytnicze. W dalszej części wstępu znajduje się opis mikrobiologiczny grzybów z rodzaju *Cryptococcus* wraz z obrazem klinicznym choroby którą wywołują. A po nim podobnie przedstawiono rodzaj *Prothoteca*. Wstęp kończy krótka charakterystyka nowotworu *Myeloma multiplex* oraz larwy *Galleria mellonella* (z rodzaju *Lepidoptera*) jako organizmu modelowego użytego do określenia bezpiecznej dawki leczniczej 3BP.

Celem pracy było dokładniejsze poznanie mechanizmu działania 3-bromopirogronianu na komórki szpiczaka mnogiego oraz grzyba *Cryptococcus neoformans*. Autorka zaplanowała badania nad:

- 1.) Ekspresją genów, których produkty wpływają na odpowiedź komórek

Myeloma multiplex i *Cryptococcus neoformans* na działanie 3BP.

- 2.) Transportem 3-bromopirogronianu do komórek *Cryptococcus neoformans*.

- 3.) Wpływem 3BP na poziom glutationu i tworzenie wolnych rodników w

komórkach *Myeloma multiplex* i badanych drobnoustrojów.

Uważam, że cel pracy został precyzyjnie sformułowany i wynika z dogłębnej analizy danych z literatury. W rozdziale materiał i metody kandydatka szczegółowo przedstawia bardzo rozbudowane badania mikrobiologiczne, genetyczne oraz farmakokinetyczne i biochemiczne, które mają być wykonane. Podaje źródła szczepów drobnoustrojów oraz linii komórek ludzkiego *Myeloma multiplex*. Rozdział poświęcony materiałom i metodyce świadczy o dużym doświadczeniu badawczym Doktorantki.

Wyniki zostały przedstawione szczegółowo na 43 stronach. Rozdział ten zawiera czytelne ryciny, tabele oraz bardzo dobrej jakości zdjęcia. Wyjątkowo cenne są zdjęcia z mikroskopu skaningowego przedstawiające morfologiczne zmiany zachodzące w komórce *Cryptococcus neoformans* pod wpływem 3-bromopirogronianu. Za najcenniejsze uważam następujące spostrzeżenia.

W badaniach wykazano że 3 bromopirogronian indukuje stres oksydacyjny w komórkach *Cryptococcus neoformans* i *Myeloma multiplex*. Kolejnym interesującym wynikiem była obserwacja, że w komórkach *Cryptococcus neoformans* i *Myeloma multiplex* poziom ekspresji genów kodujących cytochrom P450 pomimo działania 3BP pozostał bez zmian. Pod wpływem działania 3BP zaobserwowano spadek stężenia glutationu w komórkach mikroorganizmów *Cryptococcus neoformans* i *Prothoteca spp.* Co ciekawe zjawisko to zaobserwowano przy równoległej stymulacji ekspresji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za jego syntezę. W dyskusji doktorantka wnioskuję, że wiąże się to z tworzeniem kompleksów glutationu z 3BP. Za bardzo interesujący wynik badań uważam wykazanie istotnego nasilenia apoptozy komórek *Myeloma multiplex* po ich inkubacji z 3BP. Badając transport 3BP wskazała na obecność białek transportowych w *Cryptococcus neoformans*. Następne doświadczenia pozwoliły ustalić, że transporter ten należy do rodziny białek MFS (z ang. – major faciliator superfamily). Gen CNAG_04704, którego produktem jest transporter MFS odpowiedzialny za transport kwasów monokarboksylowych został wyizolowany z genomu *Cryptococcus neoformans*. Kandydatka w dalszych eksperymentach potwierdziła, że białko Cn04 jest białkiem transportowym odpowiedzialnym za pobieranie 3BP przez *Cryptococcus neoformans*. Przeprowadzone badania wykazały podobną aktywność 3BP na metabolizm komórek nowotworowych, grzybów czy alg. Uzyskane wyniki w pełni pokrywają założone przez

doktorantkę cele badań.

Dyskusja jest prowadzona wzorowo, bardzo logicznie z dużą ostrożnością co nie przeszkadza jasnemu przedstawieniu przez doktorantkę poglądów co do wyników i wniosków prezentowanych w literaturze. W kluczowej części dyskusji Doktorantka wyraża swoją opinię o fundamentalnym znaczeniu przeprowadzonych badań wyjaśniających rolę 3BP w metabolizmie badanych komórek *Myeloma multiplex* i testowanych drobnoustrojów. Wnioski końcowe zostały przedstawione w rozdziale 6. Oparto je o wykonane badania i sformułowano ostrożnie i odpowiedzialnie. Za najważniejsze z nich uważam:

1. Wykazanie silnej zależności między wrażliwością na 3BP, a stężeniem glutationu w komórkach *Cryptococcus spp.* i *Prototheca spp.*
2. Wykazanie synergistycznego działania 3BP z amfoterycyną B.
3. 3BP wywołuje dehydratację w komórkach *Cryptococcus neoformans* i wzrost cytoplazmatycznych wakuoli.
4. 3BP inicjuje apoptozę i martwicę w komórkach *Myeloma multiplex*.
5. 3BP generuje tworzenie wolnych rodników w komórkach *Cryptococcus neoformans* i *Myeloma multiplex*.
6. Gen CNAG_04704 jest genem kodującym białko odpowiadające za transport 3BP do komórki *Cryptococcus neoformans*.

Całość pracy udowadnia, że Doktorantka posiada umiejętności potrzebne do rozwiązywania problemów badawczych. Należy podkreślić nowoczesną metodykę, bardzo jasne zaplanowanie i doskonałe wykonanie skomplikowanych badań. Zwraca uwagę dogłębna analiza wyników, logiczne wnioskowanie i perspektywiczne widzenie

osiągniętych rezultatów.

Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Katarzyny Anny Niedźwieckiej pt. „Molecular mechanisms of 3-bromopyruvate activity in multiple myeloma cells and pathogenic microorganisms of the genus *Cryptococcus* and *Prototheca*” spełnia wszystkie ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim (określone w artykule 13 Ustawy o Tytułach i Stopniach Naukowych).

Mam więc zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego pozytywną ocenę rozprawy wraz z wnioskiem o dopuszczenie mgr. Katarzyny Anny Niedźwieckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość poznawczą rozprawy oraz wzorowe jej wykonanie wnioskuję o jej wyróżnienie.

dr hab. Wojciech Baran
profesor nadzwyczajny
specjalista dermatolog-wenerolog
Wrocław, ul. Kościelnego 57/2
tel. 000-065-707 8560975

