



Uniwersytet Medyczny
w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Katedra i Zakład Biochemii i Biotechnologii
ul. Chodźki 1 20-093 Lublin

biochemia.farm@umlub.pl

tel. 81 448 70 27

Dr hab. Anna Belcarz

Lublin, 29.04.2019 r.

Katedra i Zakład Biochemii i Biotechnologii

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Dawida Stefaniuka**

zatytułowanej:

**„Izolacja i charakterystyka nowych niskocząsteczkowych substancji biologicznie
czynnych z sekretomu grzyba *Cerrena unicolor*”**

wykonanej w Zakładzie Biochemii

Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

pod kierunkiem Pani dr hab. Magdaleny Jaszek, prof. UMCS (promotor)

i Pani dr hab. Anny Matuszewskiej (promotor pomocniczy)

Ogólny opis problematyki badawczej poruszanej w rozprawie doktorskiej

XXI wiek przyniósł ze sobą ogromny wzrost zachorowań na choroby nowotworowe, cukrzycę, choroby układu naczyniowego będące pochodnymi hiperlipidemii oraz choroby układu odpornościowego spowodowane zanieczyszczeniem środowiska i permanentnym stresem. Niepokój budzi również rosnąca oporność mikroorganizmów patogennych na obecnie stosowane leki. W świetle tych zjawisk potrzeba poszukiwania nowych leków i suplementów hamujących występowanie i osłabiających efekty uboczne tych chorób staje się



paląca. Jednym ze źródeł tego typu substancji są grzyby. Liczba gatunków grzybów stosowanych w celach biomedycznych stale rośnie, co jest efektem intensyfikacji badań w tej dziedzinie nauki. Tradycyjnie stosowane preparaty grzybowe są ekstraktami pozyskiwanymi z całych owocników grzybowych lub stanowią owocniki w formie sproszkowanej. Stosowanie takiej postaci wyrobów medycznych sprawia, że mechanizm ich działań terapeutycznych jest stosunkowo słabo poznany, zwłaszcza w odniesieniu do związków niskocząsteczkowych. Trwają zatem badania związane z selekcją nowych gatunków grzybów użytecznych dla zastosowań biomedycznych, oczyszczaniem ich składników aktywnych i zdefiniowaniem ich aktywności biologicznej. W ten trend wpisuje się rozprawa mgr Dawida Stefaniuka. Trafną decyzją jest w mojej opinii wybranie grzyba *Cerrena unicolor* na obiekt tych poszukiwań, ze względu na jego wysoki potencjał w zastosowaniach przemysłowych, a także w leczeniu nowotworów i podnoszeniu poziomu układu odpornościowego, sugerowanego w dostępnych doniesieniach literaturowych.

Formalna ocena rozprawy

Rozprawa doktorska Pana mgr Dawida Stefaniuka, obejmująca 212 stron tekstu, ma układ typowy dla pracy o charakterze eksperymentalnym: Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Bibliografia, a dodatkowo spisy rycin i tabel oraz wykaz pozycji w dorobku naukowym doktoranta. Doktorant zadbał o zachowanie odpowiednich proporcji pomiędzy poszczególnymi rozdziałami rozprawy. 46 rysunków i 39 tabel zawartych w rozprawie przyczynia się do dokładnego zilustrowania i uporządkowania wiedzy i wyników uzyskanych w trakcie przeprowadzanych eksperymentów.

Merytoryczna ocena rozprawy

Czterdziestostronicowe **Wprowadzenie** zawiera zestaw aktualnych informacji dotyczących problematyki pracy. Autor dokonuje w nim przeglądu właściwości aktualnie dostępnych i przebadanych preparatów grzybowych, koncentrując się na ich właściwościach terapeutycznych. Wśród nich należy wymienić właściwości przeciwtleniające, przeciwzapalne, immunomodulujące, antybiotyczne (przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze),



przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, przeciwcukrzycowe, hepatoprotekcyjne, przeciwingiogenne, hipocholesterolomiczne i modulujące hemostazę. We Wprowadzeniu dokonano także przeglądu wiedzy dotyczącej wysoko- i niskocząsteczkowych związków pochodzenia grzybowego, którym przypisuje się wymienione aktywności (polisacharydy, peptydy i białka oraz związki sterolowe, terpenowe i fenolowe, dzięki czemu biomedyczny potencjał grzybów staje się jasny z punktu widzenia procesów biochemicznych. Informacje te są zgrabnie przedstawione w postaci tabel, ułatwiających uporządkowane zebranej wiedzy. Charakterystyka organizmu grzybowego *Cerrena unicolor*, z wyraźnie podkreślonymi przykładami praktycznego zastosowania tego grzyba w bioremediacji, przemyśle tekstylnym, a zwłaszcza medycynie, uzasadniają jego wybór do dalszych badań. Dodatkowo Autor opisuje wybrane metody ekstrakcji oraz oczyszczania związków biologicznie czynnych w odniesieniu do źródeł grzybowych, wraz z ich zaletami i ograniczeniami. Z punktu widzenia czytelnika zauważam, że pomiędzy rozdziałami 2.2. a 2.3. brak jest płynnego przejścia tłumaczącego potrzebę omówienia metod izolacji i oczyszczania związków biologicznie czynnych. Nie zmienia to jednak faktu, że sens wprowadzenia podrozdziału 2.3. staje się jasny w miarę dalszego czytania rozprawy.

Cel pracy, wpisujący się w trend poszukiwań nowych substancji czynnych dla zastosowań medycznych, sformułowany został czytelnie i jasno. Zakład Biochemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej od wielu lat specjalizuje się w badaniach nad wykorzystaniem metabolitów grzybowych do zastosowań przemysłowych i medycznych. Izolacja i charakterystyka substancji niskocząsteczkowych z całkowitej frakcji metabolitów zewnątrzkomórkowych grzyba białej zgnilizny drewna *Cerrena unicolor* wpisuje się w ten kierunek badań.

Rozdział **Materiały i Metody** został przygotowany starannie i drobiazgowo, w sposób umożliwiający powtórzenie wszystkich w zasadzie doświadczeń. Obejmuje on 31 stron druku, łącznie z wykazem stosowanych skrótów. Autor umieścił w nich opis pozyskiwania materiału wyjściowego w hodowlach fermentorowych, izolacji badanych frakcji związków niskocząsteczkowych, a także szczegółowej charakterystyki otrzymanych frakcji i subfrakcji.



Niektóre doświadczenia zostały wykonane we współpracy z innymi ośrodkami badawczymi (np. Zakładem Anatomii Porównawczej i Antropologii UMCS), co zapewnia wiarygodność i rzetelność wyników oraz świadczy o umiejętności mgr Dawida Stefaniuka do pracy w zespołach interdyscyplinarnych. Do tej części pracy mam jednak następujące uwagi:

- w sekcji 4.4.2.2. Autor zawarł opis etapów frakcjonowania niskocząsteczkowych preparatów grzybowych na drodze sączenia molekularnego, który według informacji w pierwszym akapicie ma obejmować trzy etapy. Tymczasem Autor przedstawia w opisie tylko dwa etapy, co jest mylące dla czytelnika.
- w tabeli 15 Autor przedstawił warunki hodowli poszczególnych linii komórkowych, uwzględniając rodzaje pożywek, a dla niektórych linii także temperaturę hodowli i stężenie dwutlenku węgla. Sposób przedstawiania tych danych, dla większej przejrzystości metodyki, powinien być ujednolicony.
- numer barwnika Hoechst wymaga weryfikacji
- w sekcji 4.4.3.4. (test rysy) Autor nie podał nazwy aparatury używanej do przeprowadzenia tej analizy oraz miejsca przeprowadzenia badania.
- w kilku sekcjach rozprawy pojawia się termin „equolizyna” używany zamiennie z „eqolizyna”. Recenzent zwraca uwagę, że ta nazwa enzymu nie funkcjonuje w ogólnodostępnej terminologii.

Omawianie **Wyników** Autor rozpoczął analizą rozdziału preparatu pozyskanego z płynu pohodowlanego *Cerrena unicolor*. Rozdział zewnątrzkomórkowych metabolitów grzybowych zaowocował uzyskaniem frakcji związków o większej masie cząsteczkowej (dodatkowo rozdzielonych na 4 subfrakcje) oraz związków o mniejszej masie cząsteczkowej (dodatkowo rozdzielonych na 6 subfrakcji). Wśród tych ostatnich subfrakcja piąta została dodatkowo rozdzielona na 20 preparatów pochodnych. W mojej opinii brakuje w tym miejscu wytłumaczenia, dlaczego ta właśnie subfrakcja jako jedyna została poddana dalszemu rozdziałowi. Szczegółowa charakterystyka biochemiczna badanych frakcji wskazuje na zawartość różnych grup związków biologicznych, mogących decydować o ich aktywności biologicznej. Ponadto frakcje LMS-s1-6 (oraz częściowo również LMS-s5-1-20) i LMS-b1-4 zostały poddane drobiazgowej analizie metodami FT-IR, HPLC-UV-VIS i LC-MS, co



pozwoiliło na identyfikację grup chemicznych oraz określiło prawdopodobieństwo występowania konkretnych związków w tych frakcjach. Chociaż jakość zdjęcia przedstawionego na Rysunku 14B nie pozwala na wizualne zweryfikowanie twierdzenia podanego przez Autora rozprawy, a dotyczącego zawartości aminokwasów i amin, to współczynniki retencji tych substancji podane w tabelach 24-25 umożliwiają tę analizę. Po wyczerpującej analizie składu chemicznego uzyskanych frakcji metabolitów grzybowych, Autor rozprawy przechodzi do określania ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych i przeciwnowotworowych, wpływu na aktywność wybranych enzymów proteolitycznych, na proces koagulacji osocza, a także na opóźnienie czasu i szybkości krzepnięcia osocza bogato- i ubogopłytkowego. Ogromna ilość danych uzyskanych w trakcie tak obszernej analizy, przedstawiona na blisko 80-ciu stronach druku, może być trudna do interpretacji. Zatem fakt, że Autor załącza odrębne podsumowania wyników uzyskanych w poszczególnych częściach prac eksperymentalnych, zasługuje na pochwałę. Zwraca uwagę wyraźny potencjał badanych frakcji związków niskocząsteczkowych w odniesieniu do hamowania proliferacji, indukcji procesu apoptozy i aktywność wybranych metaloproteinaz komórek linii nowotworowej raka jelita grubego w porównaniu z komórkami linii prawidłowych fibroblastów. Obserwacja ta jest niezmiernie istotna w kontekście poszukiwań nowych substancji przydatnych w terapii przeciwnowotworowej. Autor zaznacza również potencjał uzyskanych frakcji ex-LMS oraz subfrakcji LMS-s i LMS-b wobec komórek linii nowotworowych raka piersi, szyjki macicy oraz prostaty, choć w tym fragmencie pracy rzuca się w oczy pewna niekonsekwencja – działanie frakcji ex-LMS zostało zweryfikowane wobec komórek linii nowotworowych raka szyjki macicy i jelita grubego, zaś subfrakcji LMS-s i LMS-b wobec komórek linii nowotworowych raka piersi i prostaty. Jednak te badania należy traktować jako pilotażowe, zaś potencjał badanych frakcji wobec wymienionych linii nowotworowych z pewnością zostanie przebadany bardziej szczegółowo w przyszłych badaniach mgr Stefaniuka. Mgr Dawid Stefaniuk podjął również próbę określenia mechanizmu działania testowanych subfrakcji związków niskocząsteczkowych, określając ich wpływ na aktywność metaloproteinaz w preparatach nowotworowych i prawidłowych linii komórkowych. W kolejnym etapie badań mgr Dawid Stefaniuk analizował wpływ otrzymanych preparatów niskocząsteczkowych na aktywność proteaz należących do czterech rodzin katalitycznych i



jasno wykazał, że niektóre z otrzymanych subfrakcji oddziaływały silnie hamująco, w sposób ilościowo zależny, na aktywność modelowych przedstawicieli badanych grup enzymów proteolitycznych. W analizie wpływu badanych frakcji związków niskocząsteczkowych uwzględniono ponadto ich wpływ na parametry krzepnięcia osocza ubogo-i bogatopłytkowego, wykazując tu aktywność głównie subfrakcji LMS-s1 i LMS-s6. Zwraca uwagę staranność doboru większości eksperymentów przeprowadzonych przez Autora pod kątem potencjalnych zastosowań otrzymanych preparatów grzybowych w medycynie, a zwłaszcza w terapii nowotworowej. W kontekście tej obserwacji należy podkreślić umiejętności Autora w długofalowym projektowaniu badań, co sprawia, że rokuje on ogromnie pozytywnie jako przyszły samodzielny badacz.

W tej części pracy moją uwagę zwróciły następujące błędy i nieścisłości:

- Pomiedzy ilościami preparatu po ultrafiltracji membranowej i po odwróconej osmozie deklarowanymi w tabeli 17 na stronie 82 (odpowiednio 6014 ± 386 ml oraz 507 ± 195 ml) a tymi podanymi w Metodocy na stronach 59-60 (odpowiednio około 5500 ml oraz 600 ml) istnieje rozbieżność.
- według informacji w sekcji 5.1.2., frakcja LMS-b ma masę cząsteczkową od ok. 10 kDa do 1,51 kDa, zaś według informacji w sekcji 5.1.4.: od ok. 30 kDa do 10 kDa. Skąd się wzięła ta nieścisłość?

W kolejnej części rozprawy, czyli **Dyskusji**, Autor podejmuje próbę usystematyzowania ogromnej ilości uzyskanych wyników i połączenia właściwości biologicznych wyizolowanych preparatów z ich składem chemicznym. Łączy ją też zgrabnie z informacjami dostępnymi w doniesieniach naukowych dotyczących tego tematu. Zwraca uwagę fakt, że planowanie toku eksperymentów przeprowadzonych przez mgr Stefaniuka już na początkowych etapach uwzględniało przyszłe potencjalne zastosowanie wyizolowanych frakcji. Znalazło to odzwierciedlenie już w trakcie wyboru metod izolacji i oczyszczania finalnie otrzymanych subfrakcji pod kątem zminimalizowania rozkładu i utraty funkcji biologicznych związków aktywnych wchodzących w ich skład. Potencjalne działanie przeciwnowotworowe subfrakcji z sekretomu *Cerrena unicolor* okazały się dominujące w definiowaniu aktywności biologicznej tych subfrakcji. Ten rodzaj aktywności wybranych



subfrakcji Autor usiłuje tłumaczyć na poziomie mechanizmu ich działania, łącząc własne obserwacje dotyczące ich właściwości antyproliferacyjnych i antymetastatycznych z rezultatami opisanymi w doniesieniach innych zespołów badawczych. Jednak Autor rozprawy podjął też wysiłki w celu określenia innych właściwości biologicznych uzyskanych preparatów, takich jak aktywność przeciwdrobnoustrojowa. Zwraca też uwagę na potencjał subfrakcji wynikający z ich zdolności modulacyjnych w odniesieniu do proteaz serynowych, co może w przyszłości okazać się użyteczne w leczeniu takich procesów patologicznych jak reumatoidalne zapalenie stawów, miażdżyca, stany zapalne czy zaburzenia autoimmunologiczne. Istotne potencjalne znaczenie niektórych wyizolowanych subfrakcji Autor dostrzega również w ich zdolności do regulacji procesów hemostatycznych. W celu zwiększenia przejrzystości Autor zebrał najważniejsze informacje w formie 3 tabel (37-39) podsumowujących wyniki eksperymentów i ułatwiających ich zbiorczą analizę, a dotyczących składu wyizolowanych frakcji, ich właściwości antyoksydacyjnych, przeciwdrobnoustrojowych, przeciwnowotworowych, hamujących aktywność proteaz oraz wpływających na przebieg hemostazy. Na szczególne uznanie zasługują uwagi Autora związane ze zdefiniowaniem przyszłych celów badań kontynuujących i rozwijających dokonania zaprezentowane w omawianej rozprawie doktorskiej. Autor zdaje sobie sprawę z ograniczeń swoich dotychczasowych osiągnięć i umie na własne wyniki spojrzeć krytycznie, co czyni go już teraz oraz w dalszej perspektywie niezmiernie wartościowym naukowcem. Ostatni fragment Dyskusji stanowi podsumowanie zaprezentowanych badań, które pełni rolę wniosków, nie ujętych w przyjętej przez Autora formie rozprawy.

Streszczenie w języku polskim i angielskim w zwięzłej formie wprowadza czytelnika w tematykę pracy i jasno definiuje uzyskane wyniki oraz sformułowane wnioski.

Bibliografia obejmuje 242 pozycje literaturowe, prawie w całości angielskojęzyczne i w zdecydowanej większości z ostatnich 15 lat. W danych dotyczących pozycji 63 brakuje numeru wolumenu oraz stron artykułu. Poza tym nie dostrzegłam uchybień w sposobie cytowania pozycji piśmiennictwa. Nie mam też zastrzeżeń do wyboru cytowanych w rozprawie pozycji literaturowych.



Ocena strony edytorskiej rozprawy

Rozprawa jest napisana jasnym, poprawnym i zrozumiałym językiem. W pracy zanotowano niezbyt liczne błędy wynikające z usterek edytorskich i innych drobnych pomyłek. Ich przykłady to:

- nazwy niektórych producentów odczynników i aparatury podano mylnie: Merk zamiast Merck, Tekan zamiast Tecan, CellSans zamiast CellSens.
- nazwa „eqolizyna”, która była używana zamiennie z terminem „equolizyna”
- w podpisie do rysunku 13 niepotrzebnie wzięto w nawias nazwy witamin z grupy A i D
- w rozprawie oznaczenia i nazwy figurują zamiennie, na przykład 0,2 μm i 0,22 μm dla odcięcia membrany sączka, a także Muellera-Hintona lub Mueller-Hinton dla podłoża hodowlanego. Autor powinien zwrócić uwagę na utrzymywanie jednolitego stylu podawania tego typu oznaczeń.

Wymienione uwagi nie wpływają na merytoryczną i ogólną ocenę rozprawy, którą oceniam bardzo wysoko.

Wnioski końcowe

Zaprezentowana do oceny rozprawa Pana mgr Dawida Stefaniuka stanowi oryginalne osiągnięcie badawcze o wysokim poziomie badawczym i dużym potencjale aplikacyjnym. Świadczy ona o dojrzałości Autora, umiejętności dalekowzrocznego planowania eksperymentów, zastosowania odpowiednich metod eksperymentalnych i tworzenia interdyscyplinarnych zespołów badawczych. Autor wykazuje się również umiejętnością wysnuwania wniosków i krytycznej analizy wyników badań własnych w odniesieniu do rezultatów uzyskanych przez innych autorów. Bardzo mocno pragnę podkreślić imponujący całkowity współczynnik oddziaływania dotychczasowych osiągnięć publikacyjnych mgr Dawida Stefaniuka (łączna liczba punktów indeksu IF = 31,202 oraz liczba punktów KBN/MNiSzW = 380), co sprawia, że Jego dorobek lokuje się bardzo wysoko w rankingu osiągnięć kandydatów do stopnia doktora. Dostrzegam również ogromny potencjał aplikacyjny osiągnięć przedstawionych w rozprawie doktorskiej mgr Dawida Stefaniuka.



Uniwersytet Medyczny
w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Katedra i Zakład Biochemii i Biotechnologii
ul. Chodźki 1 20-093 Lublin

biochemia.farm@umlub.pl

tel. 81 448 70 27

Reasumując, uznaję, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Uprzejmie przedstawiam Dziekanowi Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, wniosek o dopuszczenie mgr Dawida Stefaniuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego i o wyróżnienie go stosowną nagrodą.

Anne Belcar