

Poznań, dnia 24 lipca 2019 r.

prof. dr hab. inż. Krystyna Prochaska
Politechnika Poznańska
Wydział Technologii Chemicznej
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 POZNAŃ
tel. (61) 665-3601, fax (61) 665-3649
e-mail : krystyna.prochaska@put.poznan.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Olechowskiej zatytułowanej
„Badanie wpływu kwasu 2-hydroksyoleinowego na modelowe membrany lipidowe
w kontekście poszukiwania mechanizmu aktywności antynowotworowej tego leku”
wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
pod kierunkiem dra hab. Pawła Wydro, prof. UJ

Celowość podjęcia tematu

Według najnowszych prognoz Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), w 2030 r. na raka chorować będzie 22,2 milionów ludzi. Eksperti przewidują, że największy wzrost zachorowań, bo aż o 90%, nastąpi w krajach rozwijających się. W najbliższym dziesięcioleciu w USA nowotwory będą główną przyczyną zgonów, a w Polsce, według prognoz, w 2025 r. zachorowalność na raka ma się zwiększyć aż o 40%. Powyższe dane potwierdzają, że schorzenie to jest i będzie wyzwaniem dla współczesnej cywilizacji, gdzie tryb życia, chemizacja rolnictwa, niewłaściwy stosunek do ekologii, a przede wszystkim zanieczyszczenie środowiska mają bezpośrednie przełożenie na rozwój choroby. Pocięszającym dla tych niepokojących statystyk może być fakt, że z roku na rok, dzięki wysiłkom naukowców i postępowi współczesnej nauki w obszarze medycyny, chemii, farmacji, biologii molekularnej poprawia się skuteczność leczenia raka. Na całym świecie prowadzone są zaawansowane badania (zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*) przynoszące zdumiewające efekty. Z drugiej strony niezadawalająca skuteczność tradycyjnych metod leczenia nowotworów, skłania do ciągłego poszukiwania nowych rozwiązań, w tym terapii na poziomie molekularnym. Konieczne są intensywne badania interdyscyplinarne, pozwalające na opracowanie skutecznych, ale i bezpiecznych metod leczenia nowotworów. Innowacyjną metodą walki z nowotworami stała się terapia celowana, stosunkowo nowy sposób leczenia (znany od ok. 25 lat) polegający na specyficznym oddziaływaniu na białka sygnałowe komórek nowotworowych. Do tej grupy rozwiązań należy metoda terapeutyczna określana jako lipidowa terapia membranowa (MLT), polegająca na modyfikacji składu oraz struktury błon biologicznych indukujących zmiany lokalizacji i aktywności białek błonowych odpowiedzialnych za regulację szlaków sygnałowych komórek.

Tematyka recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Olechowskiej dotyczy powyższej problematyki, a dokładniej badań nad nowym lekiem typu MLT. Tak więc problematyka badawcza podjęta w ramach doktoratu jest jak najbardziej aktualna i w pełni uzasadniona zarówno w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym. Należy podkreślić, że dysertacja Pani mgr Karoliny Olechowskiej wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu

Jagiellońskiego w Krakowie, w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii, w Zespole Fizykochemii Powierzchni, pod kierunkiem Pana dra hab. Pawła Wydro, prof. UJ, jest pracą o charakterze interdyscyplinarnym z pogranicza chemii oraz biologii molekularnej. Dla młodego naukowca niewątpliwie stanowi to ogromne wyzwanie, gdyż musi posiadać wiedzę nie tylko w obszarze dziedziny, w której ma uzyskać stopień naukowy, ale także w dziedzinach pokrewnych, niezbędnych z punktu widzenia realizowanej tematyki badawczej.

Charakterystyka i ocena pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Olechowskiej stanowi obszerne, jednolite opracowanie obejmujące 188 stron maszynopisu. Struktura recenzowanej rozprawy jest właściwa dla prac o charakterze doświadczalnym. Pracę doktorską rozpoczyna rozdział *Wprowadzenie i cel pracy*, po którym następuje część teoretyczna (zatytułowana *Część literaturowa*), część doświadczalna (nazwana *Część eksperymentalna*) oraz wyniki badań i ich omówienie w rozdziale zatytułowanym *Dyskusja wyników*. Dalej przedstawione zostały wnioski, spis cytowanej literatury, a także wykaz dorobku naukowego Autorki. Proporcje pomiędzy zagadnieniami o charakterze podstawowym i opisem badań własnych zostały właściwie wyważone. Praca została poprawnie zaplanowana, poszczególne rozdziały logicznie następują po sobie. Recenzowana rozprawa ma bardzo staranną, ciekawą szatę graficzną, napisana jest poprawnie pod względem językowym. W tekście znajdują się jedynie pojedyncze błędy interpunkcyjne oraz nieliczne usterki o charakterze edytorskim.

W części pierwszej rozprawy *Wprowadzenie i cel pracy* Autorka pokrótce zarysowała tematykę badań oraz motywację podjęcia problematyki badawczej, a także sformułowała cel swojej rozprawy doktorskiej. Głównym celem naukowym recenzowanej dysertacji było przeprowadzenie kompleksowych badań dotyczących charakterystyki oddziaływań kwasu 2-hydroksyoleinowego (2OHOA) z głównymi lipidowymi składnikami błon komórkowych oraz określenie wpływu badanego leku typu MLT (Minerval) na stabilność, płynność, przepuszczalność, stopień uporządkowania, a także morfologię modelowych membran biologicznych.

Część teoretyczna (licząca 54 strony maszynopisu, w tym 25 rycin) podzielona została na pięć podrozdziałów. W podrozdziale pierwszym *Części literaturowej* Autorka zdefiniowała błony biologiczne, a następnie szczegółowo opisała główne składniki biomembran: lipidy błonowe oraz rafty lipidowe. W dalszej części omówione zostały zmiany błon biologicznych, związane z procesami nowotworzenia, wywołane zaburzeniem składu lipidów błonowych. W drugim podrozdziale, poświęconym omówieniu lipidowych terapii membranowych (MLT) Autorka scharakteryzowała pięć opisanych w przedmiotowej literaturze mechanizmów działania leków typu MLT, natomiast w kolejnym, trzecim podrozdziale scharakteryzowała leki typu MLT wykazujące potencjał antynowotworowy: syntetyczne lipidy antynowotworowe, nienasycone kwasy tłuszczowe oraz kwas 2-hydroksyoleinowy (syntetyczny analog kwasu oleinowego, charakteryzujący się dłuższym okresem półtrwania w organizmie niż jego prekursor). Ostatni, bardzo obszerny, piąty podrozdział dotyczy metod otrzymywania oraz technik badania trzech typów najbardziej znanych i powszechnie stosowanych modelowych błon komórkowych, umożliwiających śledzenie procesów zachodzących w naturalnych membranach: monowarstw Langmuira, liposomów oraz błon lipidowych osadzonych na podłożu stałym.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że *Część literaturowa* rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Olechowskiej oparta jest na ogromnej ilości doniesień literaturowych. **Autorka**

w całej dysertacji cytuje 401 prac dotyczących omawianej problematyki, spośród których zdecydowana większość została opublikowana w ostatnich dwóch dekadach. Dobór cytowań oraz sposób wykorzystania materiałów źródłowych jest w mojej ocenie jak najbardziej poprawny i świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Pani mgr Karoliny Olechowskiej zarówno do prowadzenia wielowątkowych badań eksperymentalnych, jak i dyskusji otrzymanych wyników.

Przegląd literaturowy ma charakter interdyscyplinarny, porusza bowiem zagadnienia z kilku obszarów tematycznych (biologii molekularnej, medycyny, farmacji, chemii i fizykochemii powierzchni). Napisany jest w bardzo zwartej, czytelnej formule. Informacje zawarte w *Części literaturowej*, właściwie dobrane i poprawnie opracowane, umiejętnie przybliżają problematykę recenzowanej rozprawy, a także stanowią dobrą podbudowę teoretyczną do części doświadczalnej.

W *Części eksperymentalnej* (liczącej 7 stron maszynopisu) Autorka szczegółowo opisała: 1) materiały i odczynniki stosowane w badaniach; 2) wykorzystaną aparaturę wraz z opisem procedur eksperymentalnych, a także 3) skład badanych układów jedno-, dwu- i wieloskładnikowych jedno- i dwuwarstwowych modelowych błon komórkowych.

Zarówno dobór, jak i opis stosowanych metod badawczych jest poprawny. Wybrane techniki eksperymentalne umożliwiły Autorce realizację poszczególnych zadań badawczych i założonych celów pracy.

Zasadniczą częścią rozprawy są *Wyniki badań* oraz ich omówienie przedstawione w rozdziale zatytułowanym *Dyskusja wyników* (18 stron, 7 rysunków). Wyniki badań zebrane na 65 stronach Autorka zilustrowała w formie 49 bardzo starannie opracowanych rysunków.

Recenzowana rozprawa zawiera bardzo obszerny, wielowątkowy materiał badawczy obejmujący badania dla: 1) jednoskładnikowej monowarstwy kwasu 2-hydroksyoleinowego, 2) 10 monowarstw dwuskładnikowych zawierających jeden z glicerofosfolipidów najbardziej rozpowszechnionych w błonach komórek eukariotycznych oraz różny udział molowy kwasu 2OHOA, a także 3) dla kilkunastu różnych wieloskładnikowych układów lipidowych, których skład dobrano w sposób pozwalający na analizę wpływu struktury fosfolipidów (polarnej głowy oraz hydrofobowego łańcucha lipidu) na oddziaływanie z kwasem 2OHOA oraz na analizę wpływu kwasu 2-hydroksyoleinowego na: a) model zarówno zdrowej, jak i zmienionej nowotworowo zewnętrznej warstwy błon komórkowych ssaków i raftu lipidowego; b) właściwości modelowych membran w kontekście antynowotworowej aktywności badanego leku; c) właściwości jedno- i dwuwarstwowych układów zawierających lipid kationowy będący składnikiem potencjalnych nośników leku antynowotworowego.

Doktorantka przeprowadziła bardzo szczegółową charakterystykę modeli jednowarstwowych w oparciu o analizę zarejestrowanych izoterm ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę. Przeanalizowała stabilność, stany fizyczne oraz ściśliwość wytworzonych monowarstw, a także ich morfologię na podstawie obrazów uzyskanych techniką mikroskopii kąta Brewstera. W przypadku układów wieloskładnikowych oszacowała oddziaływanie międzycząsteczkowe oraz mieszalność składników. Ponadto dla wybranych modelowych membran dwuwarstwowych Autorka przedstawiła opis fizykochemicznych właściwości liposomów, stworzony na podstawie wyników pomiarów dynamicznego rozpraszania światła, potencjału zeta, anizotropii fluorescencji znacznika fluorescencyjnego oraz miareczkowania spektrofluorymetrycznego. Doktorantka wykazała, że rezultaty eksperymentów przeprowadzonych na modelach jednowarstwowych i dwuwarstwowych charakteryzowały się dużą zgodnością.

Przedstawione w rozprawie wyniki badań, obliczeń, a także ich dyskusja pokazują, że założony cel pracy został w pełni osiągnięty. Zarówno dobrze zaplanowane badania, jak i prawidłowo przeprowadzone eksperymenty pozwoliły Doktorantce uzyskać szereg wartościowych interesujących wyników, które następnie zostały wnikliwie i poprawnie zinterpretowane w oparciu o właściwie dobrane, aktualne doniesienia literaturowe, a także wiedzę i doświadczenie Autorki.

Wyniki otrzymane przez Panią mgr Karolinę Olechowską oraz ich merytoryczna dyskusja w znacznym stopniu poszerzają wiedzę dotyczącą lipidowej terapii membranowej. Autorka w efekcie bardzo szczegółowych, usystematyzowanych, kompleksowych badań gruntownie przeanalizowała wpływ kwasu 2-hydroksyoleinowego zarówno na morfologię, jak i fizykochemiczne oraz termodynamiczne właściwości błon biologicznych, a także określiła właściwości potencjalnych liposomowych nośników kwasu 2-hydroksyoleinowego zawierających lipid kationowy EPOPC/DOPC. Za najbardziej znaczące osiągnięcia Doktorantki uważam:

- 1) Wykazanie dużego powinowactwa kwasu 2OHOA w stosunku do modelowych raftów lipidowych, które ulegają znaczącemu upłynnieniu i dezorganizacji pod wpływem cząsteczek 2OHOA, co potwierdza szczególną rolę tych mikrodomen w antynowotworowym mechanizmie działania badanego leku.
- 2) Wskazanie na selektywne działanie kwasu 2OHOA w stosunku do komórek patologicznych na podstawie analizy oddziaływań 2OHOA z modelowymi błonami fibroblastów i komórek czerniaka.
- 3) Przebadanie modelowych membran komórek leukocytów i dwóch linii komórek białaczkowych, które pozwoliły stwierdzić, iż cząsteczki kwasu 2OHOA wywierają silniejszy efekt upłynniający i dezorganizujący na modelowy układ HL-60 oraz wykazują większą tendencję do wbudowywania się w strukturę tych membran.
- 4) Wykazanie, że liposomy typu EPOPC/DOPC/2OHOA dzięki dodatniemu ładunkowi i posiadanym właściwościom fizykochemicznym mogą poprawić efektywność dostarczenia kwasu 2OHOA do komórek patologicznych.

Lektura recenzowanej dysertacji nasunęła mi następujące spostrzeżenia:

- 1) Wprawdzie w pracy przedstawiono bardzo obszerny materiał eksperymentalny jednakże moim zdaniem, aby w pełni wnioskować o wpływie kwasu 2-hydroksyoleinowego na właściwości błon komórkowych oraz oddziaływania międzycząsteczkowe w rozważanych membranach należałoby dodatkowo przeprowadzić badania uzupełniające w temperaturze fizjologicznej. Tak jak Autorka zaznaczyła w *Części literaturowej* każdy z lipidów ma inną temperaturę przejścia fazowego co oznacza, że temperatura w sposób istotny wpływa na ich stan fizyczny oraz wzajemne oddziaływania.
- 2) Zastanawiającym jest dlaczego Doktorantka w przypadku wszystkich badanych monowarstw stosowała wodę jako subfazę, a nie roztwór wodny o fizjologicznym pH, charakterystycznym dla różnych komórek ustrojowych. Użycie subfazy o zadanym pH dostarczyłoby cennych informacji o wpływie warunków środowiskowych na oddziaływanie kwasu 2-hydroksyoleinowego z lipidowymi składnikami ludzkich błon komórkowych (*Barceló F. i inn., Molecular Membrane Biology, 21, 261-268 (2004)*). Ciekawe byłyby eksperymenty, w których jako subfaza zostałby użyty roztwór o danym pH lub inny typ badań, w których woda pierwotnie zastosowana jako subfaza zostałaby wymieniona (np. przy użyciu pompy) na wodny roztwór o zadanym pH (i temperaturze fizjologicznej).

W toku takich eksperymentów możliwe byłoby przeanalizowanie oddziaływań międzycząsteczkowych w rozważanych wieloskładnikowych modelowych błonach biologicznych z uwzględnieniem wpływu fizjologicznego otoczenia błon rzeczywistych.

Uważam, że na podkreślenie zasługuje nie tylko wysoki poziom merytoryczny pracy, ale również estetyka, jakość i staranność edycyjna recenzowanej rozprawy doktorskiej. Jedynie nieliczne zapisy wymagają korekty, np.:

- 1) Autorka stosuje błędny zapis nazwiska Blodgett,
- 2) W wielu miejscach w pracy (str. 42, 73, 74, 76- 79, 81, 86, 87, 93, 94, 97, 98, 101, 104, 114, 122, 128, 134, 139-141, 144, 145 i 147) zamiast poprawnego zwrotu *ciśnienie powierzchniowe* zastosowano nieprawidłowe skrótowe określenie *ciśnienie*.
- 3) Zarówno w części *Wyniki*, jak i *Dyskusja wyników oraz Wnioski* wielokrotnie czytamy o „korzystnych” lub „niekorzystnych oddziaływaniach międzycząsteczkowych” co nie jest w pełni jednoznacznym określeniem. Zapewne Autorka miała na myśli „termodynamicznie korzystne” lub „termodynamicznie niekorzystne oddziaływania międzycząsteczkowe”. Stosowanie takiej skróconej formy zapisu nie jest poprawne.
- 4) Na str. 155 Autorka pisze o *wysokim ładunku powierzchniowym*. Bardziej poprawne byłoby określenie *duży ładunek powierzchniowy*.
- 5) Z kolei na str. 155 i 156 czytamy o „najbardziej optymalnym” rozmiarze, składzie. Zwrot „najbardziej optymalny”, choć często używany, nie jest poprawny. Słowo “optymalny” pochodzi z łaciny – *optimus*, a oznacza: ‘najlepszy’. Jest przymiotnikiem niestopniowalnym – jego pierwotne znaczenie jest już właściwie w stopniu najwyższym – nie potrzebuje zatem przysłówka “najbardziej”.
- 6) Na str. 67 podano szybkość zsuwania barierek podczas sprężania monowarstwy jedynie w cm^2/min . Należało również podać wartość liniowej szybkości przesuwu barier, tj. w przeliczeniu na cm/min lub mm/min .
- 7) W pracy brak informacji dotyczącej charakterystyki wody stosowanej jako subfaza (pH, przewodnictwo elektrolityczne).

Wyżej wymienione usterki w żaden sposób nie wpływają na wartość merytoryczną dysertacji, ani na moją pozytywną ocenę recenzowanej pracy. Rozprawę doktorską Pani mgr Karoliny Olechowskiej uważam za bardzo wartościową i interesującą. Dysertacja ta jest dowodem doskonałej znajomości podjętej problematyki. Autorka wykazała się szeroką wiedzą i umiejętnością samodzielnego prowadzenia interdyscyplinarnych badań z pogranicza chemii oraz biologii molekularnej. Przedstawiona w pracy tematyka badawcza jest nowatorska, interesująca i aktualna, a zastosowane metody badawcze zostały dobrane w sposób właściwy, co umożliwiło skuteczną realizację wytyczonych celów.

Podsumowanie

Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Karoliny Olechowskiej została właściwie zaplanowana oraz poprawnie zrealizowana. Praca posiada dużą wartość poznawczą, reprezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, a uzyskane przez Autorkę wyniki mają cechy nowości naukowej i znacznie poszerzają wiedzę dotyczącą lipidowej terapii membranowej w zakresie badań nad efektami inkorporacji kwasu 2OHOA do membran stanowiących modele zewnętrznej warstwy ludzkich błon komórkowych oraz raftu lipidowego, a także wpływem 2OHOA na modelowe błony komórek zdrowych i pato-

logicznych. Doktorantka przeprowadziła szereg interesujących eksperymentów, uzyskała wiele oryginalnych wyników o charakterze nowości naukowej, z których znaczna część została już opublikowana w dobrych czasopismach naukowych o obiegu międzynarodowym, a także w bardzo licznych materiałach konferencyjnych. Na dotychczasowy dorobek naukowy Autorki składają się 3 prace dotyczące wyników zamieszczonych w dysertacji, a także 4 inne współautorskie publikacje, jak również 43 wystąpienia konferencyjne w postaci 41 posterów i 2 komunikatów. Dorobek ten jednoznacznie stanowi o znaczeniu tematyki i wartości badań realizowanych przez Panią mgr Karolinę Olechowską, ale także o ogromnej pracowitości i aktywności naukowej Doktorantki.

Reasumując pragnę podkreślić, że biorąc pod uwagę wartość poznawczą pracy oraz zawarte w niej elementy nowości naukowej, a także sposób interpretacji uzyskanych wyników stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa Pani mgr **Karoliny Olechowskiej** odpowiada wymogom ustawowym określonym w art. 13. ustawy z dnia 14.03.2003 r. **Wnioskuje do Rady Wydziału Chemii UJ o dopuszczenie pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Olechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz do publicznej obrony.**

Jednocześnie biorąc pod uwagę wartość poznawczą przedstawionych w dysertacji wyników, które Autorka uzyskała w efekcie poprawnie przeprowadzonych interdyscyplinarnych badań z pogranicza chemii oraz biologii molekularnej **wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.**

Prof. Jaska