

Lublin, 24.07.2019

**Recenzja rozprawy doktorskiej magister Karoliny Olechowskiej  
„Badania wpływu kwasu 2-hydroksyoleinowego na modelowe membrany  
lipidowe w kontekście poszukiwania mechanizmu aktywności antynowotworowej  
tego leku.”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Zespole Fizykochemii Powierzchni w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Pana dr hab. Pawła Wydro, prof. UJ.

Opiniowana dysertacja przedstawia kompleksowe badania dotyczące charakterystyki oddziaływań kwasu 2-hydroksyoleinowego z głównymi lipidowymi składnikami ludzkich błon komórkowych oraz określenie wpływu badanego leku na właściwości modelowych membran, takie jak: stabilność, płynność, przepuszczalność, stopień uporządkowania oraz morfologia, jak również badania dotyczące określenia właściwości potencjalnych liposomowych nośników kwasu 2-hydroksyoleinowego, zawierających lipid kationowy.

Choroby nowotworowe stają się coraz bardziej powszechne i dotyczą ludzi w różnym wieku. Według Polskiej Unii Onkologii szacuje się, że w Polsce choroby nowotworowe są obecnie przyczyną około 20% wszystkich zgonów. Nowotwór jest chorobą spowodowaną przez utratę mechanizmów samokontroli komórek i bez względu na etiologię i rodzaj, powiązany z zaburzeniami metabolizmu lipidów. Rozwój medycyny wiąże się więc z opracowaniem nowych, bezpieczniejszych i bardziej efektywnych metod terapeutycznych, ograniczających ryzyko wystąpienia efektów ubocznych. Lipidowe terapie membranowe (MLT) wykorzystujące substancje wywołujące bezpośrednio zmiany składu i właściwości biomembran stanowią ciekawą alternatywę dla cytostatyków stosowanych w konwencjonalnej chemioterapii. W tym kontekście badania nad wpływem kwasu 2-hydroksyoleinowego jako potencjalnego nowego leku MLT na właściwości membran biologicznych jest aktualny



i perspektywiczny. Ponadto oprócz walorów poznawczych wykazuje również potencjał aplikacyjny.

Opiniowana dysertacja liczy 188 stron i została przygotowana w sposób typowy dla prac eksperymentalnych. Rozpoczyna się spisem treści oraz spisem stosowanych skrótów i symboli. Część teoretyczną liczącą 43 strony poprzedza krótkie wprowadzenie w tematykę podjętych badań oraz jasno sformułowany cel pracy. W przeglądzie literatury opisana została budowa i właściwości błon biologicznych z uwzględnieniem zaburzeń składu związanych z chorobami nowotworowymi. Następnie Autorka scharakteryzowała lipidowe terapie membranowe oraz leki o potencjale antynowotworowym oparte na mechanizmie MLT. W dalszej części scharakteryzowano monowarstwy Langmuira oraz liposomy jako układy modelowe błon biologicznych. Na podkreślenie zasługuje zwięzłe zestawienie technik eksperymentalnych wykorzystywanych do badania tych układów. Techniki stosowane w pracy, tj. mikroskopia kata Brewstera, dynamiczne rozpraszanie światła, pomiar potencjału dzeta oraz spektroskopia fluorescencyjna, zostały szerzej opisane.

Druga część dysertacji zawiera opis stosowanych materiałów, metodyki prowadzonych pomiarów, wyniki uzyskanych badań, ich dyskusję oraz wnioski. Bardzo pomocne w analizie wyników jest przygotowane przez Autorkę zestawienie badanych układów. W rozdziale dotyczącym opisu uzyskanych wyników badań zostały najpierw opisane właściwości monowarstwy kwasu 2-hydroksyoleinowego. Następnie scharakteryzowano właściwości monowarstw dwuskładnikowych zawierających cząsteczki tego kwasu oraz lipidy reprezentujące główne klasy lipidów błon komórkowych ssaków. Kolejne badania dotyczyły wpływu kwasu 2-hydroksyoleinowego na właściwości układów wieloskładnikowych stanowiących modele zewnętrznej warstwy błon komórkowych ssaków i tratw lipidowych, zarówno zdrowych, jak i zmienionych chorobowo. Analizie poddano modele błon komórek fibroblastów i mysich komórek czerniaka (B16) oraz modele błon komórek leukocytów i komórek białaczkowych (K-562 i HL-60). Na podkreślenie zasługuje połączenie badań nad monowarstwami Langmuira oraz modelowymi dwuwarstwami w postaci liposomów.

Ostatni etap badań dotyczył wpływu kwasu 2-hydroksyoleinowego na właściwości układów zawierających lipid kationowy będący składnikiem potencjalnych nośników leku antynowotworowego.

W rozdziale poświęconym dyskusji wyników Autorka dokonuje systematycznej i dogłębnej analizy uzyskanych wyników badań poruszając szeroki wachlarz wątków połączonych razem w spójną i logiczną całość. Na podkreślenie zasługuje wskazanie przez Autorkę kierunku dalszych badań. Świadczy to o Jej dużej dojrzałości naukowej.

Praca zakończona jest syntetycznym ujęciem wniosków wynikających z przeprowadzonych badań, streszczeniem w języku polskim i angielskim, spisem literatury oraz dorobku naukowego Doktorantki. Pani mgr Olechowska przedstawiła podjęty temat w sposób niezwykle spójny i logiczny, dobrze wywarzając proporcje między poszczególnymi rozdziałami rozprawy doktorskiej. Literatura źródłowa, na której opiera się Doktorantka stanowi aż 401 pozycji (w tym 4 źródła internetowe), z czego 37% to prace opublikowane w przeciągu ostatnich pięciu lat. Świadczy to o aktualności podjętego tematu, ale również o znakomitym rozeznaniu Autorki w trendach i problemach badawczych w omawianej dziedzinie.

Z obowiązku recenzenta zamieszczam poniżej drobne komentarze i pytania, które w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy:

- w polskiej terminologii fizykochemicznej stosuje się określenie potencjał dzeta, a nie potencjał zeta.
- rozdział II.2.4. potencjał dzeta jest wielkością wyliczaną na podstawie pomiarów ruchliwości elektroforetycznej, a nie mierzoną bezpośrednio. Proszę podać na podstawie jakiego równania dokonywano obliczeń.
- przedstawiony na stronie 110 opis zmian wartości potencjału dzeta z tabeli 8 „Zgodnie z przewidywaniami, wzrost zawartości kwasu 2-hydroksyoleinowego w dwuwarstwie powoduje stopniowy spadek wartości potencjału zeta” jest niepoprawny. Sugeruje on dążenie wartości potencjału do zera. Ponieważ potencjał elektrokinetyczny może przyjmować wartości zarówno dodatnie, jak i ujemne poprawne byłoby użycie

stwierdzenia, iż wzrasta jego bezwzględna wartość lub przyjmuje on coraz większe wartości ujemne.

- dlaczego w przypadku badań wykonywanych z użyciem liposomów zawartość kwasu 2-hydroksyoleinowego zmienia się od 0 do 33%?

- do opisu budowy podwójnej warstwy elektrycznej, oprócz instrukcji firmy Malvern, dobrze byłoby wykorzystać również inne źródła literaturowe.

- przedstawione na stronie 155 stwierdzenia: „...pozwala na otrzymanie liposomów o wysokim dodatnim ładunku powierzchniowym.” wskazuje, że Autorka stosuje zamiennie wielkości ładunku powierzchniowego i potencjału dzeta.

W mojej ocenie cele rozprawy Pani mgr Karoliny Olechowskiej zostały osiągnięte. Wykazano, że kwas 2-hydroksyoleinowy wykazuje wyraźniejsze właściwości upłynniające i powoduje osłabienie oddziaływań przyciągających w stosunku do monowarstw bardziej skondensowanych. Wbudowując się w strukturę raftów lipidowych wywołuje silną zmianę właściwości mikrodomen, co potwierdza szczególną rolę tych struktur w antynowotworowym mechanizmie działania badanego leku. Została również wykazana selektywność badanego kwasu w kierunku komórek patologicznych oraz możliwość wykorzystania obdarzonych dodatnim ładunkiem liposomów EPOPC/DOPC/2OHOA jako efektywnych nośników kwasu hydroksyoleinowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom merytoryczny, a przedstawione w niej wyniki stanowią wartościowy wkład w rozwój lipidowych terapii membranowych. Doktorantka wykazała się znajomością literatury, opanowaniem warsztatu badawczego i umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wyniki badań ujętych w przedstawionej rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w postaci 3 artykułów w czasopismach z listy JCR o wysokim IF. Ponadto mgr Olechowska jest współautorką czterech innych publikacji (w tym jednej w recenzji) oraz licznych doniesień konferencyjnych prezentowanych w postaci komunikatów i posterów. Uwagi przedstawione w ocenie pracy nie mają wpływu na jej pozytywną merytoryczną ocenę.



Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Olechowskiej spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę aktualność tematyki badawczej, istotny wkład uzyskanych wyników w istniejący stan wiedzy, a także publikację uzyskanych wyników w czasopismach o wysokim IF, składam wniosek o wyróżnienie recenzowanej rozprawy mgr Karoliny Olechowskiej.

Aleksandra Szczes

