

OCENA

rozprawy doktorskiej magistra Tomasza Janka

pt. „ Izolacja, identyfikacja oraz charakterystyka właściwości biomedycznych
biosurfaktantów”

W pracy przeglądowej „Biomedyczna aktywność biosurfaktantów” pochodzącej z Zakładu Biotransformacji Uniwersytetu Wrocławskiego, opracowanej wyłącznie o prace zewnętrznych autorów spoza Polski z lat 1996-2006, opublikowanej w Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2010; 64: 310-313, mamy podane szereg stwierdzeń, które mogą służyć jako merytoryczne i bardzo obszerne motto do pracy doktorskiej Pana Tomasza Janka z 2013 roku, którą otrzymałem w celu dokonania jej recenzji.

„Biosurfaktanty ze względu na swoją zdolność obniżania napięcia powierzchniowego na granicy faz, mogą chronić różnego rodzaju powierzchnie przed przyleganiem do nich mikroorganizmów i dlatego są obiecującymi związkami, które mogą znaleźć zastosowanie w medycynie” [Banat I.M. i wsp. 2000; Neu T.R. 1996; Rodrigues L. i wsp. 2006]. „Adhezja mikroorganizmów do np. protez wewnętrznych jest często przyczyną rozwinięcia się w takich miejscach biofilmu, powodującego zakażenia i bardzo trudnego do usunięcia.” „Zaobserwowano, że biosurfaktanty wydzielane przez probiotyczny szczep *Streptococcus thermophilus* hamują adhezję grzyba *Candida albicans* do silikonowych powierzchni [Busscher H.J. i wsp. 1997], a biosurfaktant wytwarzany przez *Lactobacillus acidophilus* hamuje adhezję do silikonu nie tylko *Candida albicans*, ale również bakterii uropatogennych” [Velraeds M.M. i wsp. 1996]. „Ponadto stwierdzono hamowanie formowania biofilmu *Salmonella enterica* pod wpływem surfaktyny na ściankach płytki mikrotitracyjnej wykonanej z polichlorku winylu oraz na cewnikach urologicznych. Podobne wyniki uzyskano z użyciem innych surfaktantów pochodzenia chemicznego i biologicznego. Surfaktyna (podobnie jak syntetyczny surfaktant Tween 80) ma działanie rozpraszające wstępnie uformowany biofilm bez wpływu na wzrost komórek, dzięki czemu zabezpiecza przed

formowaniem się biofilmu na cewnikach urologicznych przez organizmy, takie jak *S. enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas mirabilis*” [Mireles R.J. II i wsp. 2001].

W podsumowaniu stwierdzono: „Mimo że na świecie znanych i stosowanych jest wiele związków, wykazujących aktywności przeciwdrobnoustrojowe i/lub przeciwnowotworowe, wciąż poszukiwane są nowe substancje wytwarzane m.in. przez drobnoustroje. Biosurfaktanty mogą być dobrymi, potencjalnymi związkami, nie tylko dezynfekującymi, ale również – po odpowiednich testach klinicznych – lekami wspomagającymi leczenie nowotworów”.

Ta myśl, jak sądzę dominująca od szeregu lat w Zakładzie Biotransformacji na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego skłoniła Pana Tomasza Janka do wykonywania pracy doktorskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Marcina Łukaszewicza.

Temat, którym zajął się Doktorant – Izolacja, identyfikacja oraz charakterystyka właściwości biomedycznych biosurfaktantów” - należy uznać za jak najbardziej trafny i aktualny. Praca dotyczy biosurfaktantów, czyli związków powierzchniowo czynnych produkowanych przez mikroorganizmy, które poza zdolnościami adsorbowania się na granicach faz wykazują potencjał do tworzenia układów micelarnych. Są ważnymi biotechnologicznymi produktami, dla których rośnie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu spożywczego, kosmetycznego czy petrochemicznego oraz w medycynie z powodu ich potencjalnie biomedycznego działania i niskiej toksyczności. Są stosunkowo łatwe do otrzymywania, ale oczywiście ich cena jest zdecydowanie za duża, aby były stosowane jako podstawowe surfaktanty dla przemysłowo produkowanych na dużą skalę detergentów dla gospodarstw domowych i dla przemysłu.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Tomasza Janka obejmuje 194 strony oprawionego wydruku komputerowego, w tym 27 zestawień tabelarycznych, 61 rycin (w tym barwne wysokiej jakości fotografie) oraz 223 pozycji piśmiennictwa, bardzo aktualnych w większości pochodzącego z ostatnich lat. Praca jest ważnym etapem dochodzenia do praktycznych zastosowań biosurfaktantów, w najważniejszym – jak się wydaje – nurcie nauki służącej bezpośrednio zdrowiu człowieka. Nie jest to częsty przypadek by podstawowe badania naukowe określonego doktoranta miały tak wyraźnie ukierunkowany cel badań, zgodny z celami całego Zakładu. Formalnym potwierdzeniem tego faktu są informacje o dwu grantach Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz grantie z Narodowego Centrum Nauki na pokrywanie kosztów większości wykonanych badań. Więcej szczegółów na ten temat na końcu Opinii.

Wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej magistra Tomasza Janka są między innymi zawarte w czterech publikacjach zamieszczonych w czasopismach z listy filadelfijskiej z lat 2010-2013, gdzie doktorant jest pierwszym autorem, oraz siedmiu komunikatów konferencyjnych.

Układ recenzowanej pracy jest typowy dla rozprawy doktorskiej; zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody badawcze, wyniki przeprowadzonych badań, dyskusję, wnioski oraz bibliografię. Na końcu rozprawy zamieszczono aneks zawierający spisy tabel, rysunków i wykresów. Szczególnie godnym uwagi jest zebranie na początku rozprawy licznie używanych skrótów, co w znaczny sposób ułatwia czytelnikowi śledzenie poszczególnych części rozprawy doktorskiej.

Wstęp rozprawy doktorskiej składa się z kilku podrozdziałów. Po krótkim wprowadzeniu dotyczącym charakterystyki typowych grup surfaktantów syntetycznych i biosurfaktantów Doktorant przedstawił takie zagadnienia dotyczące biosurfaktantów jak: ich synteza i czynniki wpływające na ten proces, metody izolacji i oczyszczania oraz metody oznaczania struktury chemicznej biosurfaktantów. Ta część wstępu jak widać obejmuje pierwszą część tematu rozprawy doktorskiej, tj. „Izolacja, identyfikacjabiosurfaktantów”. Druga część rozprawy, czyli „charakterystyka właściwości biomedycznych biosurfaktantów” we wstępie jest opisana jako Fizjologiczna rola biosurfaktantów, ich właściwości powierzchniowe oraz zastosowanie. Ten obszerny dział rozprawy, łącznie z mocno podkreśloną fizjologiczną rolą apoptozy i właściwościami proapoptotycznymi biosurfaktantów obejmuje aż 200 pozycji literaturowych z całkowitej liczby prac cytowanych wynoszącej 223. Lektura wstępu pokazuje dużą swobodę i wnikliwość analizowania dobrze wyselekcjonowanego piśmiennictwa. Zacytowana literatura stworzyła podstawy do lepszego rozumienia uzyskiwanych wyników i pozwoliła na ich pełniejszą interpretację.

W rozdziale Cel pracy nawiązano do badań prowadzonych w macierzystym Zakładzie, gdzie po wykonaniu odpowiednich testów biochemicznych, z posiadanych 132 kolonii mikroorganizmów, wytypowano 5 grup mikroorganizmów do dalszych badań. Ta grupa 5 kolonii była dodatkowo wyselekcjonowana pod względem wydzielania związków powierzchniowo czynnych z 35 przebadanych kolonii. Autor nie podał w pracy czy ta ostatnia selekcja miała za kryterium przyjętą zdolność do maksymalnego obniżania napięcia

powierzchniowego czy tylko ilości produkowanych biosurfaktantów. Pokazuje to jednak potencjał badawczy jaki kryje się w już posiadanych koloniach mikroorganizmów wiele lat temu pozyskanych z gleby i wody arktycznej podczas XVIII ekspedycji polarnej Uniwersytetu Wrocławskiego.

Bezpośrednio w opiniowanej pracy zajmowano się trzema z pięciu grup mikroorganizmów, stąd można sądzić, iż pozostałe 2 kolonie są nadal w kręgu zainteresowań Zakładu. Podkreślam ten fakt, ponieważ zbyt często prowadzimy oderwane od większej grupy badawczej prace doktorskie, co jest niedobrym rozpraszaniem środków finansowych. Nie stać nas na utratę dobrze przygotowanych warsztatowo i koncepcyjne tematów badawczych i komercyjnych, jeśli dotychczasowe wyniki rokują tak wiele jak w recenzowanym przypadku.

Zasadniczym celem pracy było opracowanie metod otrzymywania, izolacji oraz identyfikacji biosurfaktantów syntezowanych przez mikroorganizmy arktyczne *Pseudomonas fluorescens* BD5, *Pseudomonas putida* BD2 i *Rhodococcus fascians* BD8. Dla wszystkich otrzymanych biosurfaktantów o oznaczonej strukturze celem było określenie ich właściwości biomedycznych. Celem końcowym była analiza zależności pomiędzy strukturą chemiczną a badanymi właściwościami. Ten ostatni cel końcowy wydaje się być podany emocjonalnie i na wyrost, bo on sam w sobie wykracza poza zakres rozprawy doktorskiej o tak bogatych planach przedstawionych w głównych celach pracy. Ale nie należy tłumić ambicji na wstępie do realizacji rozpraw doktorskich. Zrealizowanie głównych celów jest i tak ogromnie ambitne i wymagające dużego doświadczenia badawczego.

Metodologię badań opisano bardzo szczegółowo, nie budzi ona żadnych zastrzeżeń. Uderza mnogość nowoczesnych technik badawczych zastosowanych poprawnie do realizacji założonych celów rozprawy. Magister Tomasz Janek posiadał umiejętność wykonywania nie tylko rutynowych procedur mikrobiologicznych, ale również posługiwania między innymi się ultrasprawną chromatografią cieczową, chromatografią preparatywną, hodowlą komórkową czy też techniką Real-time PCR. Niewątpliwie szczególną zaletą pracy doktorskiej magistra Tomasza Janka jest jej kompleksowość i mnogość przeprowadzonych doświadczeń. Cały ten dział obrazuje ogrom pracy, którą Doktorant włożył w wykonanie badań i przygotowanie rozprawy. Osobiście zabrakło mi danych odnoszących się do metod analizy statycznej. Odnoszę także wrażenie, że wyniki własne Doktoranta mogłyby być poddane analizie statystycznej, co znacznie by je uwiarygodniło i jeszcze bardziej podkreśliło wartość

poczynionych przez Doktoranta obserwacji. Brak jest informacji na temat czy uzyskane wyniki są pojedynczymi wynikami, czy też są średnią z kilku wyników.

Wyniki pracy zostały opracowane niezwykle starannie i zebrane w postaci tabelarycznej oraz na rysunkach. Zobrazowanie głównych wyników w formie graficznej wraz z ich słownym opisem ułatwia czytelnikowi zrozumienie podstawowych przesłanek pracy doktorskiej. Jak wspomniałem wcześniej uderza mnogość wyników i dokonanych analiz, przekraczająca nawet, w mojej ocenie, ramy standardowej rozprawy doktorskiej.

Typowym mankamentem w wielu pracach doktorskich jest brak porównania uzyskanych właściwości związków z surfaktantami referencyjnymi. A jeśli już takie porównania są zamieszczone, to nie powinny one dotyczyć, np. porównywania biosurfaktantu anionowego z syntetycznym niejonowym, np. Tritonem 100. Kolejną sprawą jest nie tylko porównywanie surfaktantów anionowy-anionowy, czy niejonowy-niejonowy, ale surfaktantów o takich samych lub zbliżonych wielkościach fragmentów hydrofobowych (np. długościach łańcuchów węglowodorowych), aby uwidocznić wpływ na właściwości grup polarnych syntetycznego i pochodzącego od mikroorganizmów surfaktantu. W kilku miejscach autor rozprawy nie ustrzegł się tego przypadku.

Należy podkreślić, że Doktorant dokonał szereg nowych obserwacji wzbogacających istotnie współczesną wiedzę o biosurfaktantach. Przede wszystkim wyizolował i oznaczył strukturę chemiczną nowych związków (pseudofaktyny I oraz II) oraz wykazał przeciwnowotworowe działanie pseudofaktyny II.

Doktorant wykazał, trafny dobór cytowanego piśmiennictwa i potrafił krytycznie ustosunkować się do uzyskanych rezultatów w świetle dostępnej literatury. Omówienie jest wyczerpujące i dowodzi dużej dojrzałości naukowej mgr Tomasza Janka.

Rozprawę wieńczy trzynaście ważnych wniosków przedstawionych w formie opisowej, które odzwierciedlają w pełni przeprowadzone przez Doktoranta badania.

Ogromnym plusem recenzowanej pracy poza dużymi osiągnięciami w zakresie nauk podstawowych zajmujących się zagadnieniami biosurfaktantów, jest doprowadzenie ścieżki realizowanych badań do punktu przedwdrożeniowego. Jest to o tyle istotne, że został osiągnięty autentyczny sukces. Dokonano syntezy, wydzielenia, charakterystyki chemicznej oraz szeroko zakrojonej charakterystyki fizykochemicznej a także pomiarów bioaktywności natrafiając na pseudofaktynę, która być może będzie nową bronią w walce z czerniakiem. Dotychczasowe wyniki badań wskazują na to, że obrona droga pozyskania wielu szczepów

bakterii arktycznych doprowadziła do odkrycia biosurfaktantu zdolnego do naruszania selektywnie integralności błon komórek czerniaka.

Oczyszczono dwa cykliczne lipopeptydy ze szczepu *Pseudomonas fluorescens* BD5 - pseudofaktynę I (PFI) i pseudofaktynę II (PFII). Udowodniono, że PFII osłabia adhezję komórek i utrudnia tworzenie tzw. biofilmu przez pięć gatunków bakterii i jeden grzyb. Autor prezentuje w jaki sposób PFII wywołuje apoptozę komórek czerniaka na przykładzie linii A375. W testach wykazano, że PFII w największych dawkach praktycznie całkowicie eliminuje komórki czerniaka, podczas gdy proliferacja komórek kontrolnych zostaje zahamowana jedynie w 50%. PFII wywoływała w komórkach czerniaka podobne skutki (m.in. pofragmentowane jądra komórkowe, o charakterystycznym półksiężycowatym kształcie) do staurosporyny, związku o znanej aktywności proapoptotycznej. W komórkach linii A375 zaobserwowano także szereg innych symptomów typowych dla apoptozy – fragmentację DNA, napływ do komórki jonów wapnia (Ca^{2+}), reorganizację cytoszkieletu (kondensację aktyny), naruszenie struktury błon komórkowych i aktywację kaspazy 3, enzymu uczestniczącego w kaskadzie sygnałowej szlaku apoptozy. Niezależnie wykazano, że mechanizm wywoływania apoptozy komórek czerniaka przez PFII ma ścisły związek z tworzeniem miceli – kulistych, tworów złożonych z cząsteczek o właściwościach amfifilowych. Z takich właśnie związków są zbudowane wszystkie błony komórkowe. Średnica miceli tworzonych przez PFII w wodzie mieściła się w zakresie ok. 40-60 nm. Mechanizm apoptozy wywoływanej przez PFII polega na zaburzeniu integralności błon komórkowych poprzez ich interakcję z micelami. Wyraźnie wskazuje na to nie tylko zachwianie równowagi wapnia w komórkach, ale również obecność w pożywce dehydrogenazy mleczanowej (ang. lactate dehydrogenase, LDH), uwalnianej z hodowanych komórek przez półprzepuszczalne błony. Przyczyną mogą być różnice w składzie błony komórkowej. W błonie otaczającej komórki czerniaka A375 stwierdzono m.in. niższą zawartość steroli. W dobie coraz częstszych zachorowań na ten groźny nowotwór, temat ten z pewnością wart jest pogłębienia w badaniach podstawowych na układach liposomowych.

Przedstawione przez Doktoranta cele badawcze zostały w pełni zrealizowane, co świadczy z jednej strony o dobrze zdefiniowanych celach, a także o dużej umiejętności planowania i aktualizacji planów badań naukowych przez magistra Tomasza Janka.

Reasumując, oceniam rozprawę mgr Tomasza Janka bardzo wysoko, zarówno pod względem poznawczym, jak i praktycznym. Układ rozprawy jest przejrzysty. Temat pracy

jest bardzo aktualny a jego omówienie w pełni wyczerpujące. Przedstawiona w pracy prezentacja wyników jest logiczna, zaś na podkreślenie zasługuje staranność redakcyjna i interesująca szata graficzna. Rozprawa napisana jest poprawną polszczyzną. Drobne uwagi redakcyjne przekazałem osobiście doktorantowi. Są one na tyle drobne, że z jednej strony nie mają wpływu na przedstawioną w recenzji ocenę. Na podstawie przedstawionej do recenzji pracy uważam, że Doktorant jest w pełni przygotowany do prowadzenia prac badawczych.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca doktorska mgr Tomasza Janka pt. "Izolacja, identyfikacja oraz charakterystyka właściwości biomedycznych biosurfaktantów" spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim stawiane rozprawom doktorskim określone przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 18 marca 2011.

Mam więc zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego moją bardzo pozytywną ocenę rozprawy wraz z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Tomasza Janka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wysoka merytoryczna ocena przedstawionej pracy doktorskiej oraz to, że badania Doktoranta są pionierskie w kraju i w znaczny sposób przyczyniają się do poszerzenia wiedzy o biosurfaktantach w pełni upoważniają mnie do wystąpienia z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Janka.



Dr hab. inż. Marek Kułczyński