

Lublin, 07.08.2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz zatytułowanej „Nowe polimery antybakteryjne zaburzające ciągłość dwuwarstwy lipidowej, badania mechanizmów aktywności i regulacji przewodnictwa jonowego”

Rozprawa pod kierunkiem Pana Promotora Prof. dr hab. inż. Dominika Jańczewskiego została wykonana w Katedrze Chemii i Technologii Polimerów, Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Recenzję opracowano na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Nauk Chemicznych PW z dnia 4 lipca 2023 roku na wniosek Przewodniczącego Rady Prof. dr hab. inż. Janusza Zachary (pismo datowane 13.07.2023 r.) zgodnie z przepisami zawartymi w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742).

Rozprawa doktorska mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz napisana w formule tradycyjnej opiera się na 4 artykułach naukowych opublikowanych w prestiżowych czasopismach międzynarodowych z bazy JCR. Sumaryczny IF dla tych prac wynosi 15,8, co daje wysoki wskaźnik średnio 3,95 na pracę i jednocześnie wysokie punkty ministerialne, MEiN=410 pkt. Udział Doktorantki w wyżej wymienionych pracach jest dominujący, co zostało uwidocznione w dołączonym oświadczeniu. Na jego podstawie mogę stwierdzić, że Doktorantka była zaangażowana na każdym z etapów tworzenia prac począwszy od zaprojektowania i przeprowadzenia badań, między innymi syntezy i modyfikacji materiałów, mineralizacji, oznaczenia cytotoksyczności polimerów, ich aktywności hemolitycznej, wyznaczenia krytycznego stężenia agregacji, wielkości agregatów oraz potencjału dzeta, analizy oddziaływań polimerów z dwuwarstwą lipidową z wykorzystaniem mikrowagi kwarcowej, wykonania badań NMR, wnikliwej analizy uzyskanych wyników a także przygotowania oryginalnej wersji wymienionych manuskryptów.



Recenzowana dysertacja obejmuje 140 stron, w tym streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz użytych skrótów i symboli, wstęp, założenia i cel pracy, przegląd literatury, badania własne i analizę wyników, część eksperymentalną, bibliografię, spis rysunków, tabel oraz schematów, a także wykaz artykułów. Bibliografia zawiera 204 pozycje literaturowe, z czego tylko 25 ukazało się przed rokiem 2000, a zdecydowana większość to prace z lat 2015-2022. Świadczy to o trafnym doborze literatury oraz umiejętności krytycznej analizy dostępnych informacji, a pośrednio także o nowatorskim charakterze badań zawartych w dysertacji i znajomości przedmiotu. Rozprawa doktorska jest dobrym przykładem przemyślanego i kompleksowo zrealizowanego, krok po kroku, projektu badawczego. Już na samym początku dysertacji została podana informacja, że badania były współfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki NCN, w ramach 2 projektów zatytułowanych „Kontrolowana degradacja membrany komórkowej przy użyciu polimerów amfifilowych: aktywacja przy użyciu bodźców, aktywność przeciwko *Mycobacterium*” (PoCoDi, 2015/18/E/ST5/00222) oraz „Metoda kontrolowanej modyfikacji polimerów na etapie „post-polimeryzacji” i jej zastosowanie do otrzymywania polimerowych czynników zaburzających strukturę ściany komórkowej” (ConPPM, 2020/39/B/ST4/00183).

Doktorantka w swoim dorobku ma w sumie 5 prac o wysokiej punktacji (sumaryczny IF=17,4; 510 pkt. MEiN). Ogółem prace były cytowane 70 razy wg bazy Scopus (84 wg Google scholar), co w mojej ocenie jest dobrym wynikiem na tym etapie kariery naukowej.

We wstępie na stronie 17 sformułowano w sposób precyzyjny a jednocześnie zwięzły cel naukowy prezentowanej rozprawy doktorskiej, a także cele szczegółowe. Celem rozprawy było zbadanie wpływu składu lipidowego na aktywność wybranych związków przeciwbakteryjnych oraz charakterystyka zmian zachodzących w strukturze dwuwarstwy lipidowej w efekcie ich zastosowania. Do osiągnięcia założonego celu niezbędne było zastosowanie membran modelowych naśladujących komórki bakteryjne, jak również prawidłowe dobranie technik analitycznych umożliwiających określenie i interpretację szeregu parametrów istotnych w tym trudnym obszarze nauk interdyscyplinarnych. Podstawy teoretyczne dotyczące tych zagadnień zostały zawarte w obszernych fragmentach przeglądu literaturowego rozprawy doktorskiej (Rozdział 2.3 oraz 2.4).

Zrozumienie oddziaływań między substancjami wykazującymi mechanizmy niszczące błony komórkowe a lipidami pozwala na znalezienie związków przeciwbakteryjnych o większej wydajności. Nie jest to zadanie łatwe i staje się coraz większym wyzwaniem ze względu na wzrastającą oporność bakterii i innych patogenów na tego typu związki, w tym antybiotyki



(Rozdział 2.5 oraz 2.6 dysertacji). Wynika to głównie z procesu dostosowywania przez bakterie składu błony i ściany komórkowej w efekcie zmieniających się warunków środowiskowych i obecności związków przeciwbakteryjnych (Rozdział 2.2 oraz 2.6). Tematyka recenzowanej rozprawy jest w moim odczuciu bardzo interesująca, zarówno pod względem poznawczym, jak i technologicznym. W określonym celu już na wstępie wyraźnie zarysowuje się duży potencjał aplikacyjny badań, tj. poszukiwania wysoce skutecznych polimerów przeciwbakteryjnych a także szerokiego wachlarza możliwości ich wykorzystania w wielu dziedzinach medycyny i farmacji. Wymienione przeze mnie aspekty w pełni uzasadniają celowość badań opisanych przez mgr inż. Dominikę Kozon-Markiewicz w przedłożonej do recenzji dysertacji.

W ramach przeprowadzonych badań w Rozdziale 3 zatytułowanym „Badania własne i analiza wyników” Doktorantka scharakteryzowała aktywność membranową substancji należących do dwóch grup związków: jonenów (C0-T-p i C8-T-p) oraz pochodnych polietylenoiminy różniących się potencjałem dzeta (PMOX-PEI, w tym P1, P2 i P3 o innej zawartości procentowej jednostek powtarzalnych oraz L-PEI). Aktywność membranowa jonenów została zbadana przy wykorzystaniu pomiarów uwalniania kalceiny (barwnika fluorescencyjnego) z liposomów, fuzji liposomów, jak również techniki czarnych błon lipidowych (Rozdział 3.1). Oba wymienione jony powodowały fuzję liposomów oraz zaburzały strukturę dwuwarstwy lipidowej, ale w sposób zróżnicowany. Bardziej aktywny mikrobiologicznie polimer hydrofilowy oznaczony symbolem C0-T-p zaburzał strukturę modelowej membrany efektywniej niż polimer C8-T-p, którego aktywność z kolei była mniej specyficzna niż C0-T-p i zależna od stężenia lipidów anionowych. Co istotne z aplikacyjnego punktu Doktorantka wykazała, że aktywność obu jonenów była ograniczona, gdy w składzie dwuwarstwy znajdował się fosfolipid POPC.

W badaniach dotyczących drugiej klasy związków, pochodnych polietylenoiminy opisanych w Rozdziale 3.2 dysertacji, Pani Dominika Kozon-Markiewicz wykazała, że związkiem o największej aktywności membranowej, jak również największej selektywności jest polimer P3 charakteryzujący się najwyższymi wartościami potencjału dzeta. Badając wpływ pochodnych polietylenoiminy na regulację przewodnictwa jonowego dwuwarstwy lipidowej w każdym przypadku stwierdzono destabilizację dwuwarstwy, ale prądy w ten sposób indukowane miały różny charakter. Dla polimeru P3 oddziaływanie z dwuwarstwą lipidową generowało przepływ prądu typowy dla białek kanałowych. Analizując ten mechanizm wykazano możliwość wbudowywania się polimeru w warstwę i tworzenie agregatów transmembranowych, jak również powstawanie traw na skutek oddziaływań powierzchniowych. Istotny jest również fakt, że



otrzymane struktury cechowała selektywność względem anionów chlorkowych, w odróżnieniu od pozostałych pochodnych.

Osiągnięcia pracy

Celem recenzji przedłożonej rozprawy doktorskiej jest ocena całokształtu osiągnięcia naukowego. Dysertacja jest rezultatem konsekwentnej realizacji ciekawych i nowatorskich pomysłów. Sugerują to prześledzone przeze mnie poszczególne etapy badań, poczynając od syntezy nowych polimerów przeciwbakteryjnych wzorowanych na peptydach, umiejętnego doboru parametrów mających wpływ na aktywność membranową, zastosowania wielu nowoczesnych technik badawczych, ściśle uzupełniających się oraz dających pełen wachlarz możliwości szczegółowej charakterystyki a także trafnej analizy uzyskanych wyników na poszczególnych etapach i znalezienie potencjalnych obszarów, w których tego typu układy polimerowe mogą zostać wykorzystane.

Doktorantka w pierwszym etapie badań zastosowała dwa polimery różniące się budową o trwałym ładunku dodatnim w łańcuchu głównym, tzw. jony. Określiła wpływ składu dwuwarstwy lipidowej na ich aktywność membranową przy zastosowaniu czterech lipidów różniących się ładunkiem i w różnym stopniu wpływających na krzywiznę membrany. Zmieniając proporcje lipidów zbadała również, w jakim stopniu rodzaj lipidu, ładunek tworzonych liposomów oraz spontaniczna krzywizna lipidów wpływają na stabilność liposomów w kontakcie z badanymi jonami.

W kolejnym etapie badań Doktorantka przeprowadziła analogiczne analizy, ale z udziałem pochodnych polietylenoiminy oznaczonych w dysertacji jako PMOX-PEI o zróżnicowanym potencjale dzeta. Określiła dla tych układów właściwości biologiczne, w tym hemolityczność, cytotoksyczność, aktywność nie tylko przeciwbakteryjną, ale dodatkowo przeciwrzybiczą i przeciwpłatkową (tego typu badania pojawiają się sporadycznie w literaturze), a także wpływ polimerów typu PMOX-PEI na przewodnictwo dwuwarstwy lipidowej.

Za największe osiągnięcia recenzowanej dysertacji uważam:

1. powiązanie mechanizmu oddziaływania polimerów przeciwbakteryjnych na bazie polietylenoiminy z rodzajem nieciągłości powstających w dwuwarstwie lipidowej pośrednio na podstawie rodzaju i wielkości generowanych prądów (nieregularnych o różnym natężeniu lub typu schodkowego zbliżonych do prądów kanałowych);



2. otrzymanie układów wykazujących selektywność wobec anionów chlorkowych;
3. powiązanie składu lipidowego błon biologicznych z ich trwałością w kontakcie z omawianymi polimerami przeciwbakteryjnymi;
4. określenie mechanizmów aktywności wymienionych polimerów przeciwbakteryjnych przybliżające do otrzymania układów o szerokim spektrum zastosowań i/lub wysoce selektywnych, niezbędnych w zwalczaniu bakterii antybiotykoopornych.

Naukowa dociekliwość narzuca pojawiające się w trakcie lektury dysertacji następujące pytania, niektóre z nich mogą być potraktowane jako zachęta do dyskusji lub dalszych pogłębionych badań:

- ✚ We Wstępie i celu pracy, jak również w dalszych częściach dysertacji pojawia się sformułowanie „...cel molekularny w komórce bakteryjnej” (str. 17). Proszę o doprecyzowanie tego terminu;
- ✚ Doktorantka stwierdza, że polimer o najwyższym potencjale dzeta ($35,9 \pm 2,23$ mV) jako jedyny powodował powstawanie prądów typowych dla białek kanałowych. Polimer ten może wbudowywać się w dwuwarstwę lipidową w postaci agregatów transmembranowych lub oddziaływać tylko powierzchniowo tworząc tzw. tratwy. Czy na podstawie przeprowadzonych badań i/lub doniesień literaturowych można pokusić się o uogólnienie, dla jakich konkretnych wartości (zakresu wartości) potencjałów dzeta polimerów przeciwbakteryjnych będą generowane prądy typu kanałowego?
- ✚ Jakie parametry lub grupy parametrów zachodzących procesów będą decydowały o wbudowywaniu polimerów i tworzeniu agregatów transmembranowych a jakie o oddziaływaniach typowo powierzchniowych i powstawaniu tratw? Które parametry w charakterystyce polimerów (struktura, ładunek, rodzaj grup funkcyjnych, długość łańcucha hydrofobowego, itp.) mogą tu być dominujące?
- ✚ W dysertacji na str. 55-56 Doktorantka pisze „Kolejnym przykładem przystosowania bakterii do obecności peptydów przeciwbakteryjnych jest surfaktyna, cykliczny antybiotyk lipopeptydowy zwiększający płynność i zaburzający ciągłość dwuwarstwy lipidowej. Skład membran bakterii produkujących surfaktynę determinuje ich wytrzymałość na jej działanie upłynniające. Główny składnik fosfatydyloetanoloamina (oznaczona w dysertacji skrótem PE) swoim kształtem kompensuje kształt surfaktyny”. Proszę rozwinąć myśl zawartą w ostatnim zdaniu, czy w rozważaniach tych można



również wykorzystać parametr upakowania (lub krytyczny parametr upakowania) omówiony na str. 25-26?

- ✚ Doktorantka do badań indukowania fuzji przez joneny wybrała trzy kompozycje lipidowe: V1(POPE/TOCL 80/20), V4 (POPE/POPG 80/30) i V10 (POPC/TOCL 80/20). Dlaczego akurat te trzy układy zostały wybrane spośród dziesięciu scharakteryzowanych, jaka była motywacja, czy tylko udziały poszczególnych lipidów były brane pod uwagę? Proszę wyjaśnić, co oznacza z chemicznego punktu widzenia następujące sformułowanie: „...analizowany związek dodawany jest do buforów, a następnie membrana jest przemalowywana”?
- ✚ Skrót Δ_M opisano w dysertacji jako dyspersyjność (str. 108). Jest on mało precyzyjny w moim odczuciu. Przy określeniu rozmiarów, podobnie jak w technice DLS bardziej miarodajny jest termin polidispersyjność (lub wskaźnik polidispersyjności), który informuje czy mamy do czynienia z układem homogenicznym (monodispersyjnym, o jednym wymiarze cząstek lub wąskim rozkładzie wielkości cząstek, z *ang.* *multimodal size distribution*) albo polidispersyjnym tj. o kilku wymiarach cząstek lub szerokim rozkładzie, albo nawet o kilku populacjach cząstek, a w efekcie o dużym rozproszeniu). Czy termin dyspersyjność jest tożsamy z polidispersyjnością? Proszę o komentarz.

Reasumując, materiał przedstawiony przez mgr inż. Dominikę Kozon-Markiewicz w rozprawie doktorskiej spełnia wymagania Ustawy w zakresie doboru literatury, opanowania zakresu wiedzy ściśle powiązanego z tematyką doktoratu, jak również uzasadnia celowość podjętych badań. Na tej podstawie z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że Doktorantka osiągnęła wysoki poziom wiedzy w reprezentowanej przez nią dyscyplinie naukowej. Praca doktorska mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz wnosi istotny wkład do dziedziny projektowania polimerów o potencjalnych zastosowaniach biomedycznych jako alternatywa dla istniejących leków przeciwbakteryjnych a także antybiotyków. Analizując rezultaty badań Doktorantki należy zwrócić uwagę na duży wkład pracy i wykorzystanie wielu właściwie dobranych metod badawczych, wymagających pracowitości i precyzji, tym bardziej, że doskonalenie metodyki jest szczególnie ważne w rozwoju dziedziny, której dotyczy rozprawa doktorska.



Uwagi i komentarze do pracy

W trakcie wykonywania obowiązków Recenzenta zapoznałam się szczegółowo z dysertacją, jak również przesłanymi dokumentami. O ile badania wchodzące w zakres doktoratu są bardzo ciekawe, nowatorskie i wysoce poprawne pod względem merytorycznym to sam sposób ich opisanie pozostawia niedosyt. Wynika to zapewne z korzystania głównie z literatury anglojęzycznej i publikowania również w tym języku. Jednak zadeklarowany język dysertacji to język polski, dlatego moim zadaniem jest ocena również jego poprawności. Poniżej przedstawiam uwagi oraz komentarze, które nasunęły mi się podczas lektury rozprawy, mają one charakter głównie uwag technicznych i nie wymagają dyskusji, chyba że Doktorantka się z nimi nie zgadza.

- ✚ W pracy doktorskiej zdarzają się czasami błędy stylistyczne (np. powtórzenia i interpunkcyjne, przeskoki myślowe, składnia angielska zamiast polskiej (np. podmiot na końcu zdania), co obniża jej jakość językową. Przykładowo, str. 33 „Takie modele wykorzystywane są w pomiarach elektrycznych, z wykorzystaniem mikrowagi..”, str. 55 „Zwiększenie zawartości CL zwiększa...”. Język polski jest bardzo bogaty i jednocześnie stosunkowo trudny, ale w mojej ocenie naukowcy są szczególnie zobligowani do dbałości o jego poprawność;
- ✚ W tytule dysertacji pojawia się drobny błąd językowy, powinno być „Nowe polimery przeciwbakteryjne...”. W pracy wyrazy antybakteryjny (z *ang. antibacterial*) i przeciwbakteryjny występują zamiennie. Niestety także inne zapożyczenia z języka angielskiego mimo funkcjonujących lepszych odpowiedników polskich zdarzają się w całej rozprawie: molekuły zamiast cząsteczki, zwitterjonowe (obojnaczy), negatywnie naładowana (naładowana ujemnie), makromolekuły, str. 86 pomp efflux; str. 91 dysypacja energii (rozproszenie energii), str. 105 został zaindukowany, str. 112 supernatant; inokulum zamiast posiew;
- ✚ W Spisie treści i w dalszych częściach pracy czasami brakuje odmiany przez przypadki (4.3.3 Oznaczenie toksyczność....zamiast Oznaczenie toksyczności...); rzeczowniki pojawiają się w mianowniku prawdopodobnie w efekcie pobieżnego tłumaczenia z języka angielskiego (np. w zdaniu „Dobrze uformowane czarne membrany, czyli pojedyncza dwuwarstwa lipidowa”), co niestety zdarza się coraz częściej w tego typu opracowaniach. W całej dysertacji brakuje akapitów, pojawiają się również błędy typograficzne tzw. literówki, wdowy lub bękarty;



- ✚ W Wykazie skrótów również trafiają się zapożyczenia np. inhibicja zamiast zahamowanie, HLB to prawidłowo równowaga hydrofilowo-lipofilowa, GUV to olbrzymi pęcherzyk jednowarstwowy, LUV to duży pęcherzyk jednowarstwowy, SAM to monowarstwa samoorganizująca się, SLB to dwuwarstwa lipidowa **osadzona** na podłożu stałym;
- ✚ W podpisach niektórych rysunków brakuje wyjaśnień dotyczących poszczególnych jego części, np. Rys. 1a-f., czasami brak oznaczeń a, b, c..., powinno to być ujednolicone. Ponadto, w moim odczuciu rysunki powinny być większe, gdyż trafiają się mało czytelne (np. Rys. 28, str. 65). Przy omawianiu zależności przedstawionych na rysunkach i przytaczaniu konkretnego numeru rysunku w tekście pozostaje on w mianowniku, np. ...od schematu ogólnego z Rysunek 5a jest kardiolipina...(str. 23); „Na Rysunek 18....” zamiast „Na Rysunku 18 (str. 45);
- ✚ We fragmencie zatytułowanym „Przemiany fazowe lipidów” na str. 27 zastosowane zostały zbyt duże przeskoki myślowe, co w mojej ocenie doprowadziło do wymieszania nazewnictwa faz z rodzajami agregatów w nich występujących. Pojawiają się czasami błędne nazwy związków, przykładowo str. 37 kwas palmityninowy, kwas oleoinowy, kwas mirystylinowy, itp.; W cyfrach często zamiast przecinków nadal są kropki tak jak w systemie angielskim (przykładowo przy podawaniu wartości pH);
- ✚ Prawidłowa forma to i/lub (str. 28) a nie odwrotnie, podobnie jak potencjał zeta (lub potencjał dzeta), który już od dawna funkcjonuje w polskojęzycznej literaturze przedmiotu; „Pod względem formy przestrzennej jaką przyjmują membrany można je podzielić na: liposomy, monowarstwy i dwuwarstwy...”, (str. 30), bardziej logiczny byłby zapis od najprostszych form do tych bardziej złożonych (...na: monowarstwy, dwuwarstwy i liposomy), w mojej ocenie cały fragment na str. 43 wymaga przeredagowania (podczas malowania membrany, maluje dwuwarstwę lipidową...);
- ✚ Na stronie 66 znajduje się niezbyt poprawne sformułowanie...potencjału dzeta mierzonego na krawędzi płaszczyzny poślizgu....Potencjału dzeta nie mierzymy, mierzymy przykładowo ruchliwość elektroforetyczną i ona jest dopiero przeliczana w oprogramowaniu aparatu zgodnie z równaniem Smoluchowskiego (lub analogicznym) na potencjał dzeta. Na podstawie definicji (IUPAC) potencjał dzeta jest jedynie umiejscowiony w płaszczyźnie poślizgu;
- ✚ Niezbyt fortunne pod względem chemicznym jest zdanie (str. 103) „Biorąc pod uwagę statystyczną budowę P3”?, Przy opisie rodzajów występujących prądów pojawia się



sformułowanie pojedyncze „kolce”, czy pojedyncze „piki” nie byłyby jednak poprawniejsze?, podobnie na str. 92 małe prądy, duże prądy, str. 99 Rys. 49 średniego prądu, bardziej poprawnieprądy o małym, średnim lub dużym natężeniu?;

- ✚ Strony 111-113 dysertacji, w opisach eksperymentów podano różne temperatury 35°C albo 37°C, czasami brakuje odchylenia, dlaczego temperatura nie była ujednolicona? „Erytrocyty przemyto trzy razy zimnym PBS...”, to nie jest opis typowo chemiczny, powinno być doprecyzowane, jaką konkretnie temperaturę miał PBS?; zapisy parametrów wirowania są różne, (str. 112, powinna być podana prędkość obrotów a nie waga próbki, tj. 700 g, 10 min).

Chcę jeszcze raz podkreślić, że wskazane niedociągnięcia nie umniejszają wartości merytorycznej i naukowej recenzowanej dysertacji mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz oraz nie wpływają na jej wysoce pozytywną ocenę.

Ocena końcowa

Rozprawa jest spójna, dobrze zaplanowana doświadczalnie oraz zawiera ciekawą i przemyślaną interpretację szeregu wyników. Charakter i efekty podjętych badań w mojej ocenie stanowią znaczący dorobek naukowy w dziedzinie fizykochemii polimerów. Przeprowadzone eksperymenty należy uznać za nowatorskie i ściśle wpisane w aktualne kierunki badań dotyczące opracowania nowych polimerów przeciwbakteryjnych o dobrze scharakteryzowanych mechanizmach aktywności zarówno w aspekcie naukowym, jak i aplikacyjnym. Podsumowując, mogę stwierdzić, że opiniowana dysertacja jest wartościowa pod względem poznawczym oraz praktycznym wykazując przy tym niezbędne elementy nowości naukowej i tym samym spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz.U. 2023 poz. 742). Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agnieszka Ewa Migał

