



Politechnika
Wroclawska

Politechnika Wroclawska
Wydział Chemiczny

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
<https://wch.pwr.edu.pl>

Wrocław, 28.02.2022

Prof. dr hab. inż. Kazimiera A. Wilk
e-mail: kazimiera.wilk@pwr.edu.pl
tel. +48 696 613 668

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Rafała Jerzego Kopiasza

pt. *Synteza nowych przeciwdrobnoustrojowych polikationów oraz badania ich aktywności z wykorzystaniem mikroorganizmów i liposomów*

Promotor: dr hab. inż. Dominik Jańczewski, prof. uczelni

WPROWADZENIE

Innowacyjne badania nad skutecznymi metodami walki z infekcjami bakteryjnymi są aktualnie podmiotem szeroko pojętych projektów interdyscyplinarnych z zakresu nauk chemicznych, farmaceutycznych i biomedycznych. Kreowanie nowych struktur chemicznych farmaceutyków typu antybiotyków – w świetle lekooporności drobnoustrojów - obejmuje aktualnie, oprócz wielorakich strategii o znaczeniu biochemicznym/biotechnologicznym, także projektowanie nowych produktów bioaktywnych o strukturze amfipatycznej, w tym najczęściej ich złożonych struktur zaburzających integralność błony komórkowej. Potrzeba zrozumienia zależności pomiędzy ich budową a zachowaniem się na granicach faz i ich najkorzystniejszymi właściwościami biologicznym (tutaj: silna aktywność przeciwdrobnoustrojowa a niska hemolityczność) stanowią aktualne wyzwania badawcze szeregu renomowanych zespołów naukowych na świecie. Badania te opierają się na dążeniu do otrzymania biblioteki związków tzw. „szytych na miarę” (ang. *custom-designed*), chemikaliów specjalistycznych o *stricte* dedykowanych właściwościach fizykochemicznych i użytkowych. Tematyka pracy doktorskiej mgr inż. Rafała Jerzego Kopiasza, dotycząca badań nad nowymi syntetycznymi analogami peptydów przeciwdrobnoustrojowych (ang. *Synthetic Mimics of Antimicrobial Peptides*, SMAMPs), dokładnie wpisuje się wyżej zasygnalizowany obszar aktywności naukowej.

Mgr inż. Rafał Jerzy Kopiasz wykonał swoją pracę doktorską pod kierunkiem dra hab. inż. Dominika Jańczewskiego, prof. ucz., w Katedrze Chemii i Technologii Polimerów, na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Zgodnie z literaturą przedmiotu recenzowana praca doktorska ma elementy nowości naukowej. Jako pokłosie zaangażowania badawczego, Doktorant

jest współautorem 4 artykułów z listy JCR, z czego 3 – o sumarycznym współczynniku wpływu (ang. *Impact Factor*, IF) 13,58 (w tym *React. Funct. Polym.* ma IF=3,333 (2019); *Macromol. Biosci.* – 4,979 (2020); *Colloids Surf. B* - 5,268 (2021)) – dotyczą zakresu pracy doktorskiej. Część materiału jest w przygotowaniu do wysłania do redakcji. Spoza tematyki doktoratu jest praca opublikowana w *Polymer* (IF=4,49 (2021)). We wszystkich ww. publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem. Recenzowana praca doktorska została wykonana w ramach grantu NCN (Sonata BIS5, nr 2015/18/E/ST5/00222 (2016-2022), kierownik: dr hab. inż. Dominik Jańczewski).

OPINIA MERYTORYCZNA

Zamysł kompozycyjny rozprawy jest tradycyjny; obejmuje ona 182 strony oraz 20 stron z załącznikami. Jest to praca z zachowaniem właściwej proporcji fragmentu opisującego badania własne w stosunku do całej rozprawy. Bardzo bogata bibliografia obejmuje 267 pozycji anglojęzycznej światowej literatury. Źródła literaturowe stanowią merytorycznie uzasadnioną dokumentację działań naukowo-badawczych podjętych przez Doktoranta. W części teoretycznej pracy Autor w sposób kompetentny dokonał opisu zagadnień, związanych ze stanem wiedzy na temat: (i) budowy i specyfiki błony komórkowej, ze szczególnym uwzględnieniem jej składników budulcowych i stabilizujących - surfaktantów naturalnych typu fosfolipidów i ich rodzajów, w tym zależnych od funkcji w danym mikroorganizmie; (ii) budowy, specyfiki, aktywności biologicznej i mechanizmu działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych (ang. *Antimicrobial Peptides*) oraz syntetycznych polikationów SMAMPs (skrót we Wprowadzeniu). Duży fragment przeglądu literaturowego (i są to najciekawsze rozdziały w pracy) traktuje o metodyce badań nad mechanizmem działania związków przeciwdrobnoustrojowych atakujących błonę komórkową (ang. *Membrane-Targeting Antimicrobial Compounds*, MTAC), a także na temat relacji: struktura polikationów-aktywność biologiczna (tj., aktywność przeciwdrobnoustrojowa, aktywność hemolityczna), oceniana w układach modelowych błon komórkowych. Część literaturowa dowodzi dobrej znajomości omawianych zagadnień przez Autora.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była nowa grupa polikationów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej SMAMPs; ich ścieżki syntetyczne, cechy aktywności biobójczej wraz z mechanizmem działania. Przy projektowaniu biblioteki ww. pochodnych Autor kierował się przesłankami zależności: struktura-aktywność (ang. *Structure-Activity Relationship*, SAR), która to metodologia umożliwia badaczom określenie roli danych parametrów oraz elementów strukturalnych projektowanych związków na ich aktywność w układach biologicznych. Aby wskazać materiał badawczy mgr Kopiasz przeprowadził staranną analizę wyników SAR dotychczas opisanych polikationów jako czynników zaburzających strukturę błony komórkowej w odniesieniu do najczęstszych połączeń grupy hydrofobowej z kationową w stosunku do łańcucha głównego polimeru SMAMPs (tutaj: dla struktur zawierających grupę kationową w łańcuchu bocznym oraz jonenów, a także kopolimerów blokowych). Następnie Autor dokonał analizy wpływu strategii modulowania równowagi lipofilowo-hydrofilowej (ang. *Hydrophilic-Lipophilic Balance*, HLB) polikationów zarówno na poziomie monomeru poprzez zastosowanie ugrupowania hydrofobowego o zmiennej długości, jak i poprzez kopolimeryzację monomerów hydrofobowych i hydrofilowych w różnych proporcjach. Niezależnie przeanalizował dane odnośnie SMAMPs na temat rodzaju grupy

końcowej (polikationy telecheliczne), dodatku nienaładowanej hydrofilowej grupy bocznej, rodzaju i gęstości grup kationowych, a także struktury łańcucha głównego polimeru – jego sztywności czy izomerii położenia. Ta wieloparametrowa analiza doniesień literaturowych umożliwiła Doktorantowi staranne zaprojektowanie zamysłu badań własnych, czyli: (i) syntezę biblioteki nowych stabilnych jonenów o zadanych parametrach kontrolnych - hydrofobowości czy dodatkowej hydrofilowej grupy bocznej, sztywności i izomerii łańcucha głównego (w znaczeniu izomerii *meta/para* ugrupowania benzenowego); (ii) zaprojektowanie i wykonanie badań biologicznych otrzymanych jonenów (oznaczenia mikrobiologiczne i badania biokompatybilności); (iii) zrealizowanie badań nad mechanizmem działania (badania na komórkach bakterii, badania na liposomach). I stosownie do tak ustawionego wektora naukowego część doświadczalna zawiera opis stosowanej metodyki i procedur.

W moim przekonaniu zamysł badań został starannie zaprojektowany i jest spójny pod względem merytorycznym. Zrealizowanie założonych bardzo ambitnych planów badawczych uznaję za sukces Doktoranta. W mojej ocenie szczególnymi atutami pracy są następujące wyróżniki:

1. Biblioteka nowo syntezowanych 27 jonenów o wysokiej gęstości czwartorzędowych grup amoniowych wzdłuż łańcucha głównego polimeru objęła 5 serii związków o zadanych parametrach strukturalnych, opisanych w poprzednim akapicie, w których to etapach Doktorant zrealizował z sukcesem dobrze zaplanowane wieloetapowe ścieżki syntetyczne, zaawansowane metodycznie pod względem procedur izolacji, oczyszczania i identyfikacji. Otrzymane jony składały się z merytorycznie uzasadnionych pochodnych *N,N,N',N'*-tetrametyloetylenodiaminy (TMEDA) lub 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu (DABCO), rozdzielonych grupami ayłowymi na zasadzie podstawników w pozycji *para* lub *meta*, tj. były to serie: Cn-T-p-T; Cn-T-m-T; Cn-D-p-D; Cn-D-m-D; Cn-D-PEG-D (n=0,2,4,8,12). Skrót PEG odpowiadał metyłowemu estrowi trój(tlenku etylenu) (oPEG) w pozycji *meta*. Dodatkowo, 2 grupy stanowiły jony standardowe bez bocznych grup hydrofobowych, czyli: p-T-p-T oraz p-D-p-D.
2. Dobrze zaplanowane systematyczne badania biologiczne otrzymanych jonenów objęły ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej (parametr MIC, Minimalne Stężenie Hamujące ang. *Minimum Inhibitory Concentration*) zarówno wobec mikroorganizmów z Amerykańskiej Kolekcji Szczepów Wzorcowych (ang. *American Type Culture Collection*, ATCC), czyli z udziałem modelowych mikroorganizmów o znaczeniu klinicznym – oportunistycznej Gram-ujemnej bakterii *Escherichia coli*, Gram-dodatniej *Staphylococcus aureus*, a także drożdżaka *Candida albicans*, jak i wobec lekoopornych szczepów klinicznych (np. *Klebsiella pneumoniae* (szczep produkujący metalo- β -laktamazę) czy szczepy produkujące β -laktamazy, nadające bakteriom oporność na wiele antybiotyków (tutaj: *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc). Ocena objęła również aktywność wobec prątków (*Mycobacterium*), w tym prątków gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*). Aby mieć jak najbardziej kompleksowy ogląd na charakterystykę biologiczną biblioteki jonenów, Autor wykonał również badania biokompatybilności, wyrażone zarówno przez ocenę właściwości hemolitycznych (tj., parametr HC₅₀, ang. *Hemolytic Concentration*, stężenia wywołujące lizę 50% erytrocytów) otrzymanych jonenów, jak i poprzez cytotoksyczność (tj., parametr IC₅₀, ang. *Inhibitory Concentration*, stężenie hamujące w 50% wzrost komórek) wobec linii komórkowej mysich fibroblastów L929.

Przeprowadzone badania wykazały, że syntezowane jony wykazują pożądaną aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec badanych mikroorganizmów a niską aktywność hemolityczną. Badania nad kinetyką zabijania bakterii *S. aureus* i *E. coli* przez jony – Cn-T-p-T (n=0,8), Cn-D-p-D (n=0,8) oraz C2-D-m-D i C2-D-PEG-D, udowodniły ich wysoką skuteczność. Większość jonenów to jednak produkty cytotoksyczne i ten efekt można częściowo modyfikować wbudowując fragment PEG w ich strukturę. W ogólności, zwiększenie hydrofobowości grupy bocznej Cn w strukturze każdej badanej serii jonenów skutkuje zmniejszeniem ich wartości MIC, co więcej - zwiększeniem HC₅₀, natomiast wartości IC₅₀ nie wykazują istotnych zmian w odniesieniu do zwiększania n w łańcuchu Cn badanych serii. Ponadto, izomeria strukturalna pierścienia aryłowego (tj., podstawników w pozycji *para* lub *meta*) nie wywiera istotnego wpływu na wartości parametrów MIC, HC₅₀, i IC₅₀. Zwiększona elastyczność łańcucha głównego jonenów poprawia ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec *E. coli* i *C. albicans*. Należy zaznaczyć, że w świetle doniesień literatury przedmiotu wykazanie wpływu hydrofobowości i elastyczności/sztywności łańcucha głównego jonenów na ich aktywność przeciwdrobnoustrojową jest jednym z najważniejszych osiągnięć Doktoranta.

3. Badania nad mechanizmem działania otrzymanych polikationów, jako czynników zaburzających integralność błony komórkowej i zwiększających w efekcie jej przepuszczalność, uznają za bardzo przydatne w perspektywie ewentualnych aplikacji. Autor najpierw ocenił wpływ jonenów na polaryzację błony komórkowej *S. aureus* ATCC 6538 z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego, uzyskując brak wyraźnej globalnej korelacji pomiędzy aktywnością przeciwdrobnoustrojową jonenów a ich zdolnością do indukowania depolaryzacji błony komórkowej. Następnie zostały wykonane pomiary zmiany przepuszczalności błony komórkowej *E. coli* ATCC 8739 wywołane przez jonen hydrofilowy C0-T-p-T i hydrofobowy C8-T-p-T, stosując znakowane fluorescencyjnie dekstrany o zmiennych masach cząsteczkowych i ładunkach, pochodzących od znakowania różnymi fluorofortami (FITC-dekstran). Autor zaobserwował zwiększoną przepuszczalność błony komórkowej badanej bakterii wobec obu badanych jonenów, jednakże ten hydrofilowy czynnik dużo skuteczniej neutralizował ujemny potencjał powierzchni komórek (pomiary potencjału ζ), wywołując silną agregację komórek bakteryjnych. Integralną częścią oceny mechanizmu oddziaływania jonenów z modelowymi dwuwarstwami lipidowymi były badania na liposomach (tutaj: duże jednowarstwowe liposomy, ang. *Large Unilamellar Vesicles*, LUVs). Doktorant udowodnił, że kardiolipina (Cl) oraz lipidy o ujemnym współczynniku krzywizny (np. fosfatydyloetanolamina, PE) są niezbędnymi składnikami dwuwarstwy, by była ona podatna na niszczące działanie hydrofilowych jonenów. Hydrofobowe jony mogą wykazywać tendencję do stabilizacji dwuwarstwy, co może być przyczyną ich niższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej w porównaniu do pochodnych hydrofilowych.
4. Doktorant w swoich eksperymentach stosował prawidłową metodologię badawczą – przykładowo, skaningową mikroskopię elektronową (ang. *Scanning Electro Microscopy*, SEM), dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *Dynamic Light Scattering*, DLS), konfokalną laserową mikroskopię skaningową (ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM), spektroskopie ¹H

NMR i ^{13}C NMR czy chromatografię wykluczenia (ang. *Size-Exclusion Chromatography*). Ścieżki syntetyczne, metody analityczne i techniki oceny biologicznej są wybrane prawidłowo i zgodnie z aktualną wiedzą.

Porównując cel i założenia pracy, wymagającej od Doktoranta szczególnej skrupulatności i zachowania dyscypliny badawczej, z podsumowaniem ogromu jej wyników, mogę z przekonaniem stwierdzić, że program badań został całkowicie zrealizowany. Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne niejasności w pracy. Poniżej wykaz moich pytań (stricte o charakterze dyskusyjnym), wobec których oczekuję ustosunkowania się przez Doktoranta w trakcie obrony:

- Wartości krytycznego stężenia agregacji (ang. *Critical Aggregate Concentration*, CAC) były wyznaczone spektrofluorymetrycznie wobec pirenu jako znacznika zgodnie z pracą [246]. Jakże inne metody można rozważyć przy wyznaczaniu CAC?
- Który jonen, otrzymany przez Autora (wskazać tylko jeden przykład) jest szczególnym osiągnięciem naukowym (tj., z zakresu badań podstawowych), a który może stanowić wyróżnik na płaszczyźnie technologicznej i dlaczego?
- Co, jak i dlaczego można ulepszyć, zgodnie z aktualną wiedzą Autora po wykonaniu swoich badań, w zamyśle utworzenia nowej biblioteki jonenów o funkcji przeciwdrobnoustrojowej?

WNIOSEK KOŃCOWY

W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Rafała Jerzego Kopiasza całkowicie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj., Dz. U. z 2021 r., poz. 478) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Niniejszym dodatkowo wnoszę, by uznać pracę doktorską p. mgra inż. R. Kopiasza za wyróżniającą. Kluczowe wyniki, stanowiące odniesienie do celu i zakresu pracy, zostały w dużej mierze opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych JCR (wylistowane we Wprowadzeniu), a sama zaś praca pod względem interdyscyplinarności i obszernego zakresu badań, a także znaczenia wyników dla dyscypliny nauki chemicznej jest nowatorska i stanowi kompendium wiedzy o wysokich walorach zarówno poznawczych, jak i praktycznych. Rzeczowa argumentacja wniosku mgra inż. Kopiasza świadczy o Jego dużej kreatywności badawczej, o rzetelności i dobrym przygotowaniu zarówno merytorycznym, jak i warsztatowym. Doktorant opanował zarówno podstawy fizykochemiczne, jak i uzyskał kompetencje instrumentalne, umożliwiające prawidłowy dobór procedur syntetycznych i technik badawczych, wykonanie syntez, pomiarów i interpretację wyników. We wszystkich tych aspektach wynik – moim zdaniem – jest wzorowy.

