



Uniwersytet
Jana Kochanowskiego
w Kielcach

Kielce, dnia 11 sierpnia 2024 r.

Dr hab. Karol Ciepluch, Prof. UJK
Zakład Biologii Medycznej, Instytut Biologii,
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych,
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Ocena pracy doktorskiej mgr Julity Pachli

pt: „Liniowe poliaminy o silnych właściwościach przeciwbakteryjnych: synteza, charakteryzacja i badanie zależności między strukturą a aktywnością biologiczną”

Przedstawiona mi do recenzji praca Pani Julity Pachli dotyczy bardzo istotnego zagadnienia jakim jest opracowanie nowych alternatyw do istniejących, choć już często nieskutecznych antybiotyków. Zagadnienie jest mi bardzo bliskie, dlatego też z wielką chęcią przystąpiłem do recenzji. Problemy wielolekooporności bakterii są opisywane już od wielu lat. Przyczyny są dobrze znane ale znalezienie odpowiednich sposobów jak je pokonać już nie koniecznie. Oczywiście w literaturze znajdziemy tysiące potencjalnych środków przeciwbakteryjnych o szerokim spektrum działania, ale nikt nie ma wątpliwości, iż wiele z nich nie znajdzie komercyjnego zastosowania. Przyczyn tego jest wiele i wynika z kilku różnych mechanizmów powstawania oporności. Jedną z głównych barier dla wielu środków przeciwbakteryjnych jest zewnętrzna błona bakteryjna bakterii gram ujemnych. Jest ona nieprzepuszczalna dla większości potencjalnych środków przeciwbakteryjnych. Tę właśnie barierę próbuje pokonać doktorantka w swojej pracy doktorskiej, gdzie za cel stawia sobie syntezę i modyfikacje liniowych poliamin o potencjalnym zastosowaniu przeciwdrobnoustrojowym. Liniowe poliaminy zgodnie z założeniem powinny destabilizować zewnętrzną błonę bakteryjną w podobny sposób jak naturalne kationowe peptydy antibakteryjne.

Rozprawa doktorska ma charakter zarówno chemiczny jak i biologiczny. W rozprawie znajdziemy opis syntezy, chemiczno-fizycznej charakterystyki a także opis aktywności biologicznej zsyntetyzowanych poliamin. Jako biolog pozwolę sobie skupić się bardziej na recenzji części biologicznej wyników. Opis syntezy i właściwości otrzymanych poliamin zostały zaprezentowane i ocenione przez już przez recenzentów w dwóch świetnych publikacjach w *European Polymer Journal* oraz *Biomacromolecules*.

Układ pracy jest typowy i zawiera wstęp, opis wyników z dyskusją, podsumowanie oraz opis metod badawczych. Rozprawa doktorska zaczyna się długim wstępem zawierającym cel pracy oraz przegląd literatury. Znajdziemy w nim opis peptydów i polimerów przeciwbakteryjnych oraz opis czynników wpływających na właściwości tychże polimerów. Dodatkowo zawarte są informacje na temat kopolimeryzacji oraz opis syntezy i właściwości kilku syntetycznych polimerów o potencjalnych właściwościach przeciwbakteryjnych. Część ta jest wyczerpująca, choć osobiście brakuje mi poszerzenia opisu o bardziej rozgałęzione polimery dla porównania. Nie mam większych zastrzeżeń do sposobu przygotowania wstępu, choć chciałbym zwrócić uwagę na kilka kwestii. Pierwszą trochę irytującą sprawą jest zapewne używanie automatycznego tłumacza artykułów w języku angielskim na język polski, co w prawdzie nie jest złe, ale jeśli nie zostanie to dokładnie sprawdzone brzmi czasem śmiesznie i nieprofesjonalnie. Przykład pierwszy z brzegu- „ w zewnętrznym listku błony ssaczej...” zapewne zostało źle przetłumaczone słowo odnoszące się do zewnętrznej warstwy lipidowej. W całym wstępie jest dużo tego typu „błędów tłumacza”. Powinno się przyłożyć więcej uwagi do tłumaczonych fragmentów artykułów stanowiących przegląd literatury. Doktorantka w przeglądzie literatury wskazuje również na szereg badań pośrednio i bezpośrednio dotyczących jej zagadnienia. Podaje w nim odnośniki do rycin zawartych w pracy. Problem polega na tym, że odnośniki te mogą sugerować, iż na rysunkach znajdziemy wyniki badań w szczególności wyników aktywności przeciwbakteryjnych, ale znajdujemy jedynie struktury zastosowanych polimerów. Brakuje właśnie dodatkowych rycin z wynikami. Kolejnym mylnym opisem jest wskazanie na stronie 38, iż liniowa polietylenoimina jest aktywniejsza wobec bakterii i erytrocytów. Nie wiadomo czy chodzi o to, że jest mniej czy też bardziej toksyczna.

Następną częścią jest opis wyników własnych i ich dyskusja. W pierwszej kolejności doktorantka otrzymała i scharakteryzowała liniowe politrimetylenoiminy. Do części chemicznej i fizyko-chemicznej nie mam żadnych zastrzeżeń. Dobrym pomysłem było porównanie otrzymanych polimerów z naturalnie występującymi poliaminami. Właściwości biologiczne politrimetyloimin zostały zbadane na 2 szczepach bakteryjnych tj. *E. coli*, *S. aureus* oraz 1 grzybie *C. albicans*. Dodatkowo sprawdzono ich cytotoksyczność (hemoliza).

Doktorantka słusznie zauważyła, iż syntetyczne polimery mają lepsze właściwości niż naturalne poliaminy. Dlatego, też do badań nad klinicznymi izolatami wybrała dwa związki różniące się masą cząsteczkową. Na podstawie wyników wybrała do dalszych badań L-PTMI-1.2 k oraz 7k. Uważam jednak, iż lepszym wyborem było by wybranie L-PTMI-3k, bowiem 1.2 ma właściwości zbliżone do L-PEI 4k. W części dotyczącej badania właściwości przeciw izolatom kliniczny, otrzymano obiecujące wyniki. Warto zauważyć, że od samego początku otrzymywano lepszą aktywność wobec bakterii gram dodatnich niż bakterii gram ujemnych i grzybów. Autorka słusznie sugeruje, że różnice te wynikają z budowy w ścianach komórkowych wybranych organizmów. Problem polega na tym, że brakuje w pracy choćby małego rysunku pokazującego różnice w budowie ściany. Z pewnością pomogłoby to zrozumieć czytelnikowi cel pracy. W tabeli 5 jest też informacja o stężeniu MIC jako mg/mL zamiast $\mu\text{g/mL}$.

W kolejnej części autorka opisuje wpływ N-metylowania i N, N-dimetylowania na aktywność biologiczną L-PTMI oraz L-PEI. Metylowanie i czwartorzędowanie nie poprawiły jednak aktywności biologicznej poliamin. Pomimo tego doktorantka twierdzi, że modyfikacja ta powoduje niską cytotoksyczność, więc charakteryzują się wysoką selektywnością. Pojęcie selektywności może być mylące, bowiem co prawda zsyntetyzowane poliaminy są nietoksyczne dla komórek ludzkich ale też mają aktywność przeciwbakteryjną niższą albo podobną do innych czynników przeciwbakteryjnych. Ciężko wskazać gdzie jest idealna granica stężeń tj. różnica między MIC i IC50 . Dodatkowo na wykresach nie ma słupków błędów. W dalszej części przeprowadzono syntezę kopolimerów i ich właściwości. Pomimo iż kopolimeryzacja poprawia nieco właściwości przeciwbakteryjne to ich toksyczność jest dużo większa niż np. L-PEI-7k. Nie mogę się również zgodzić z twierdzeniem, że kopolimery L-PTMI-co-PEI wykazują addytywny efekt przeciwbakteryjny odpowiadający poszczególnym składnikom. Wyniki tego nie potwierdzają.

Następny rozdział dotyczy aktywności kopolimerów utworzonych z częściowej hydrolizy wcześniej otrzymanych kopolimerów. Pomimo, iż otrzymane wyniki nie są zbyt obiecujące w kontekście działania przeciwbakteryjnego, to uzyskana wiedza jest bardzo cenna. Po analizie tego rozdziału można znaleźć podsumowanie, iż zawartość w polimerze odpowiedniej liczby grup zdolnych do kontaktu z powierzchnią komórki bakteryjnej jest kluczowe.

W mojej opinii analiza wyników została przeprowadzona prawidłowo, choć brakuje nieco skrupulatniejszej analizy biologicznej np. analizy biofizycznej oddziaływań poliamin z błoną lipidową.

Rozdział podsumowanie i wnioski mimo, że krótki to został napisany bardzo dobrze. Świetnie podsumowuje otrzymane wyniki i stara się wytłumaczyć dlaczego tak jest w kontekście ich właściwości przeciwbakteryjnych. Do tej części mam jednak kilka uwag i chciałbym aby doktorantka się do nich ustosunkowała.

Na stronie 120 Doktorantka napisała- „W większości przypadków wprowadzone zmiany strukturalne spowodowały obniżenie aktywności przeciwbakteryjnej polimerów, ale także obniżyły ich cytotoksyczność, co przyczyniło się do otrzymania związków o znaczącej selektywności”. Co to znaczy znacząca selektywność?

Na stronie 121 Doktorantka napisała- „Te same zależności dla fizycznych mieszanin polimerów oraz dla kowalencyjnie związanych jednostek powtarzalnych L-PTMI i L-PEI wspierają hipotezę dotyczącą niespecyficznych oddziaływań amin drugorzędowych z otoczką komórkową.” Jakie to są niespecyficzne oddziaływania?

Na stronie 121 napisane jest- „Wprowadzenie jednostek PrOzi do struktury L-PTMI na poziomie 40 % r.u. nie spowodowało pogorszenia właściwości przeciwdrobnoustrojowych materiału w porównaniu z L-PTMI. Obecność amidowych jednostek przyczyniła się jednak do obniżenia cytotoksyczności. Kombinacja tych czynników przełożyła się na wartość selektywności na poziomie 20 do kopolimeru PPrOzi_{40%}-co-L-PTMI_{60%}.” Czy to znaczy, że selektywność 20 jest wystarczająca? Jaka jest wartość progowa uważana za dobrą?

Na stronie 122- „Równie wysoka aktywność L-PTMI wobec MRSA i modelowego *S. aureus* wskazują na odmienny mechanizm działania polimeru niż klasycznych antybiotyków, co daje szansę na obejście typowych mechanizmów oporności bakterii przez tę klasę związków”. Czyli jakich mechanizmów?

Rozdział zawierający metody badawcze jest opisany bardzo szczegółowo i nie mam zastrzeżeń. Dobór literatury jak odpowiedni i zawiera 217 pozycji.

Ogólnie stwierdzam, że rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie. Nie mam wątpliwości, że Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Podsumowując, uważam, że uzyskane wyniki są naprawdę obiecujące i dostarczają cennych informacji na temat przyszłościowych modyfikacji i wyboru kationowych polimerów zawierających aminy drugorzędowe jako środków przeciwdrobnoustrojowych. Bez wątpienia istnieje praktyczne zastosowanie wyników badań.

Na koniec recenzji chciałbym również wspomnieć o całkowitym zaangażowaniu doktorantki w prace naukowe. Jest współautorka 4 publikacji naukowych w bardzo dobrych czasopismach.

Biorąc wszystkie zalety pracy wspomnianej powyżej, nie mam wątpliwości, iż praca doktorska zasługuje na **wyróżnienie**.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani Mgr Julity Pachli pt. „Liniowe poliaminy o silnych właściwościach przeciwbakteryjnych: synteza, charakteryzacja i badanie zależności między strukturą a aktywnością biologiczną” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.). Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie nauk chemicznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnoszę do Komisji Politechniki Warszawskiej do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne o dopuszczenie Pani Julity Pachli do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z poważaniem

Karol Ciepluch

