

Dr hab. inż. Emilia Sikorska, prof. uczelni
Pracownia Badań Strukturalnych Biopolimerów
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk 10.03.2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Rafała Jerzego Kopiasza zatytułowanej
„Synteza nowych przeciwdrobnoustrojowych polikationów oraz badania ich aktywności
z wykorzystaniem mikroorganizmów i liposomów”**

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Rafała J. Kopiasza została wykonana w Katedrze Chemii i Technologii Polimerów na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, pod kierunkiem dr hab. inż. Dominika Jańczewskiego, prof. uczelni. W swojej dysertacji, mgr inż. Rafał J. Kopiasz przedstawił rezultaty swoich badań nad polikationami przeciwdrobnoustrojowymi, będącymi syntetycznymi analogami naturalnie występujących peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Tematyka badawcza prezentowana w dysertacji wpisuje się w trendy dzisiejszych badań naukowych. Szybki wzrost antybiotykooporności wymusza potrzebę poszukiwania nowych strategii walki z drobnoustrojami chorobotwórczymi. Jak słusznie podkreślił Doktorant, jest to zadanie, które spoczywa dzisiaj głównie na barkach akademickich ośrodków naukowych, finansowanych ze źródeł publicznych.

Rozprawa doktorska mgr inż. Rafała Kopiasza, napisana w języku polskim, posiada strukturę zgodną z powszechnie obowiązującymi standardami przyjętymi dla prac doktorskich z dyscypliny nauk chemicznych. Dysertacja liczy sobie 204 strony i została podzielona na 5 głównych, ponumerowanych rozdziałów: *Wstęp i cel pracy*, *Przegląd literatury*, *Wnioski z badań literatury i założenia pracy*, *Badania własne i analiza wyników* oraz *Część eksperymentalna*. Całość została poprzedzona podziękowaniami, streszczeniem w języku polskim i angielskim, spisem treści oraz wykazem stosowanych skrótów. Dysertację kończą w formie nieponumerowanych rozdziałów kolejno: bibliografia (286 pozycji literaturowych,

w zdecydowanej większości anglojęzyczne artykuły naukowe, ale również rozdziały w książkach i raporty WHO), wykazy rysunków, schematów i tabel, podsumowanie dorobku publikacyjnego, informacje o wkładzie Doktoranta w prezentowane badania oraz załączniki (widma NMR i dane eksperymentalne wykorzystane do badania kinetyki eliminacji Hofmanna).

W rozdziale *Wstęp i cel pracy*, mgr inż. Rafał Kopiasz uzasadnił potrzebę poszukiwania nowych związków przeciwdrobnoustrojowych, ze względu na szybko rozwijającą się antybiotykooporność wśród mikroorganizmów chorobotwórczych. Kolejny rozdział, *Przegląd literatury*, wprowadza w tematykę polikationów przeciwdrobnoustrojowych, z uwzględnieniem ich wspólnych cech z naturalnie występującymi antybiotykami peptydowymi. Biorąc pod uwagę fakt, iż pierwszym etapem działania polikationów przeciwdrobnoustrojowych jest adsorpcja na powierzchni błony komórkowej, Kandydat do stopnia naukowego doktora scharakteryzował budowę otoczek komórkowych różnych mikroorganizmów, jak również metody badań oddziaływań związków przeciwdrobnoustrojowych z błonami komórkowymi. Ponadto, podkreślił On te cechy polikationów, które mogą decydować o ich selektywności działania (hydrofobowość, gęstość grup kationowych, równowaga lipofilowo-hydrofilowa, sztywność łańcucha, izomeria itp.). Rozdział *Wnioski z badań literatury i założenia pracy* stanowi uzasadnienie podjęcia badań nad jonenami – polikationami zawierającymi grupę kationową umieszczoną w łańcuchu głównym polimeru. W tym samym rozdziale, mgr inż. Rafał Kopiasz podał główne założenia swojej pracy, do których należały: synteza bibliotek jonenów o różnej hydrofobowości, sztywności i izomerii łańcucha głównego, badania biologiczne oraz badania mechanizmu ich działania. Rozdział *Badania własne i analiza wyników* stanowi „serce” całej rozprawy doktorskiej. Zawiera opisy wyników syntez jonenów, trudności napotkane podczas syntezy, badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej i biokompatybilności oraz badania mechanizmów działania. W pierwszej części badań, mgr inż. Rafał Kopiasz zaplanował syntezę biblioteki jonenów będących pochodnymi polietylenoiminy w formie wyczerpująco metylowanej (Me₂-L-PEI). Niestety, większości zaprojektowanych polikationów nie udało się zsyntezować, ze względu na podatności produktów na eliminację Hofmanna. Niepowodzenie to stało się dla mgr inż. Rafała Kopiasza motywacją do zbadania stabilności czwartorzędowych soli amoniowych, będących niskocząsteczkowymi analogami Me₂-L-PEI. Rezultaty tych badań wykazały, iż zwiększenie

liczby jednostek Me₂-L-PEI znacząco przyspiesza szybkość eliminacji Hofmanna, podobnie jak usztywnienie cząsteczki poprzez wprowadzenie grupy DABCO (1,4-diazobicyklo[2.2.2]oktan). Kandydat do stopnia naukowego doktora zaobserwował również wzrost przesunięcia chemicznego protonów będących celem ataku anionu hydroksylowego wraz ze wzrostem szybkości reakcji, co wytłumaczył zwiększoną polaryzacją wiązania C-H. Ponadto zauważył, iż większą szybkością rozpadu charakteryzowały się związki posiadające grupę odchodzącą o niższej nukleofilowości. W drugiej części badań, mgr inż. Rafał Kopiasz zaprojektował, a następnie zsyntezował bibliotekę jonenów o mniejszej gęstości ładunku dodatniego wzdłuż łańcucha głównego. Tym razem otrzymał 27 polikationów o różnej hydrofobowości, sztywności oraz izomerii łańcucha głównego. Dla wszystkich otrzymanych polikationów, mgr inż. Rafał Kopiasz wyznaczył stopień polimeryzacji, średnią masę molekularną na podstawie pomiarów magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz chromatografii wykluczenia (SEC), a także potwierdził skład pierwiastkowy za pomocą analizy elementarnej. Biorąc pod uwagę fakt, iż jony posiadające węglowodorowe łańcuchy alkoksylowe mają budowę typową dla wielołańcuchowych surfaktantów, Kandydat do stopnia naukowego doktora wyznaczył krytyczne stężenia agregacji dziesięciu wybranych związków, zawierających łańcuchy C8 i C12, stosując spektrofotometrię i metodę pirenową oraz wyznaczył zeta-potencjał tworzących się agregatów, wykorzystując metodę dynamicznego rozpraszania światła, DLS. Dla wszystkich otrzymanych jonenów zostały wyznaczone wartości minimalnych stężeń hamujących (MIC) rozwój modelowych mikroorganizmów (*E. coli*, *S. aureus* i *C. albicans*). Ponadto, dla jonenów z serii C_n-T-p-T (gdzie C_n oznacza długość łańcucha alkoksylowego, natomiast T to N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina) zostały również wyznaczone minimalne stężenia bakteriobójcze (MBC) i grzybobójcze (MFC). Dodatkowo, wybrane jony zostały przebadane pod kątem aktywności względem szczepów klinicznych, w tym *Mycobacterium tuberculosis*. Na podstawie uzyskanych wyników, Doktorant przedyskutował wpływ hydrofobowości, sztywności i izomerii łańcucha głównego oraz obecności dodatkowego hydrofilowego łańcucha PEG na aktywność przeciwdrobnoustrojową. Wyniki badań wykazały, iż wyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową charakteryzowały się bardziej hydrofilowe jony z elastycznym łańcuchem głównym. Z kolei, w przypadku prątków gruźlicy, Doktorant zaobserwował nieco inną tendencję

– wydłużenie długości łańcucha alkoksylogowego poprawiło aktywność hamującą wzrost tych drobnoustrojów, co Doktorant wytłumaczył bardziej hydrofobową budową ściany komórkowej prątków. W celu oceny biokompatybilności jononów zostały przeprowadzone badania właściwości hemolitycznych. Wyniki badań zgodnie z oczekiwaniami wykazały, iż wydłużanie łańcucha alkoksylogowego zwiększa aktywność hemolityczną, natomiast obecność dodatkowego łańcucha hydrofilowego PEG obniża tę aktywność. Dodatkowo, jonony z serii Cn-T-p-T zostały zbadane pod kątem ich cytotoksyczności względem mysich fibroblastów. Niestety, wyniki badań potwierdziły, iż nawet względnie hydrofilowe jonony, które nie wykazywały właściwości hemolitycznych, okazały się działać cytotoksycznie na fibroblasty. Jednakże, przez wprowadzenie do cząsteczki jonenu nienaładowanej hydrofilowej grupy PEG, udało się poprawić wskaźnik selektywności działania. Celem poznania mechanizmów działania jononów, Kandydat do stopnia naukowego doktora zbadal ich wpływ na polaryzację błony komórkowej gronkowca złocistego, jednak nie zaobserwował prostej korelacji pomiędzy aktywnością przeciwdrobnoustrojową, a zdolnością do depolaryzacji błony. W kolejnych badaniach potwierdził natomiast, iż jonony zwiększają przepuszczalności błony komórkowej, a ponadto mogą indukować agregację komórek *E. coli*, w wyniku neutralizacji ich ujemnego potencjału. Ostatnia część badań obejmowała badania na liposomach, imitujących błony komórkowe mikroorganizmów oraz komórek eukariotycznych, a konkretnie erytrocytów. Przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej została zbadana z wykorzystaniem pomiaru fluorescencji kalceiny uwalnianej z liposomów pod wpływem działania jononów. Adsorpcja jononów na powierzchni liposomów, jak również jej wpływ na agregację liposomów zostały zbadane poprzez pomiar zeta-potencjału oraz wyznaczenie promieni hydrodynamicznych liposomów traktowanych jononami, z wykorzystaniem techniki DLS. Uzyskane wyniki wykazały, iż jonony wywoływały destruktywne działanie na liposomy zawierające kardiolipinę oraz lipidy o ujemnej krzywiznie wewnętrznej jak POPE. W przypadku hydrofobowych jononów, ich wpływ na liposomy zależał od stosunku molowego polimeru do lipidów (P/L). Przy niskich stężeniach, jonony zaburzały integralność błony, natomiast przy wyższych – uszczelniały dwuwarstwę lipidową. Rozdział *Badania własne i analiza wyników* kończy zwięzłe podsumowanie otrzymanych rezultatów, z którego jasno wynika, iż Doktorant zrealizował wszystkie postawione sobie cele naukowe. Ostatni ponumerowany

rozdział pracy doktorskiej, *Część eksperymentalna*, zawiera wykaz użytych materiałów, szczegóły dotyczące syntez wraz z analizą NMR oraz wynikami analizy elementarnej produktów, wydajności syntez, a także informacje o stosowanych metodach i aparaturze naukowej.

Za mocną stroną pracy uważam logikę w planowaniu kolejnych etapów badań – każdy kolejny etap wynikał z etapu poprzedniego. Dyskusja otrzymanych wyników w świetle danych literaturowych potwierdza, iż Doktorant bardzo dobrze orientuje się w tematyce oraz świetnie porusza się w literaturze z tematu pracy. Na uwagę zasługuje również interdyscyplinarny charakter pracy. Niemniej jednak, w dysertacji pojawiły się pewne nieścisłości, które zostały wymienione poniżej. Lektura dysertacji nasunęła również kilka pytań:

- Str. 49 „*Na przykład przyłączenie łańcucha C16 oraz łańcucha C12 wraz z czwartorzędową solą amoniową zwiększało MIC wobec S. aureus i E. coli z więcej niż 8900 μ M do odpowiednio 6 i 56 μ M*” – czy na pewno zwiększało MIC?
- Str. 60 Brakuje definicji skrótów ED₅₀ i LD₅₀.
- Str. 80 „*... należy zastosować 20% nadmiar molony di-aminy 15-C0*” – diaminy 19-C0 czy dibromku 15-C0? Podobna nieścisłość pojawia się kilka zdań niżej „*nadmiar dibromku 19-C0*” czy nadmiar dibromku 15-C0?
- Str. 80 „*Pik przy 4,8 ppm został przypisany grupie benzyłowej*” – czy na pewno benzyłowej, czy raczej grupie metylenowej w grupie benzyłowej?
- Str. 118 Brakuje wyjaśnienia skrótu PDI?
- Załącznik 1: W podpisach do wykresów Z1.12-Z1.16 Doktorant podaje, iż są to dopasowania danych eksperymentalnych z reakcji eliminacji Hofmana do modelu reakcji kinetyki drugiego rzędu. Czy nie powinno dopasowywać się modelu do danych empirycznych?
- W jaki sposób Doktorant określał stopień konwersji oraz stopień polimeryzacji na podstawie widm NMR?
- Czy dyspersyjności jonów ma wpływ na aktywność biologiczną?

- Str. 93 Czy zmętnienie pożywek po dodaniu do nich wodnych roztworów jonenów z grupą boczną C8 i C12 mogło być efektem samoagregacji jonenów?
- Czy Doktorant miał jakieś problemy z pomiarami widm NMR w roztworach o wysokim stężeniu soli (0,4 M)? W jaką sondę wyposażony był spektrometr Varian 400 MHz oraz w jakiej temperaturze rejestrowano widma NMR?

Doktorant nie uniknął również błędów edycyjnych i językowych, takich jak „literówki”, brak spacji, brak przecinków, przymków, błędy składniowe i fleksyjne, kropki zamiast przecinków w wartościach liczbowych itp. Dla przykładu: „płodowa surowica bydlęcia” (str. 12) – powinno być „bydlęca”, „Aniony bromkowe pomięto” (str. 75, schemat 4) – powinno być „Aniony bromkowe pominięto”, „hydrofoliowe” (str. 47) – powinno być hydrofobowe. Wkradły się również błędy ortograficzne: „wacha się” (str. 60) „przeciw jon” (np. str. 81), „nie lamelarnych faz” (str. 30), „nie aktywne” (str. 49). W pracy pojawiają się też niefortunne sformułowania:

- Str. 20 „Wszystkie żywe komórki otoczone są błoną komórkową, która jest podstawową barierą oddzielającą życie od otaczającego świata” – czy na pewno chodzi o oddzielenie życia od otaczającego świata?
- Str. 73 Zdanie „Dodatk nienaładowanej grupy hydrofilowej zbadalem...” brzmiałoby lepiej w formie „Wpływ nienaładowanej grupy hydrofilowej na aktywność biologiczną polikationów zbadalem...”
- Str. 93 „wypadanie ciała stałego” - może lepiej „wytrącanie osadu”
- Str. 103 „Negatywny wpływ usztywnienia cząsteczki widoczny jest również porównując aktywność jonenów C0-D-p-D z C0-T-p-T” – „(...) gdy porównamy aktywność (...)”
- Błędna forma rzeczownika „na Rysunek” powtarza się w tekście kilka razy.

Rezultaty badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej mgr inż. Rafała Kopiasza zostały opublikowane w trzech artykułach zamieszczonych w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku wpływu równym 13,128 (Reactive and Functional Polymers, IF₂₀₁₉=3,5; Macromolecular Bioscience, IF₂₀₂₀=4,36; Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, IF₂₀₂₀=5,268). Czwarty artykuł, przesłany do redakcji czasopisma Biomacromolecules (IF₂₀₂₀=6,988) jest w trakcie recenzji. Doktorant jest również

współautorem jednego artykułu w czasopiśmie Polymers ($IF_{2020}=4,329$), który obejmuje badania spoza rozprawy doktorskiej. We wszystkich artykułach mgr inż. Rafał Kopiasz jest pierwszym autorem, co świadczy o Jego znacznym wkładzie w powstanie tych prac.

Podsumowując, wyniki badań uzyskanych przez mgr inż. Rafała Jerzego Kopiasza w ramach Jego rozprawy doktorskiej stanowią cenne źródło wiedzy w zakresie potencjalnego zastosowania polikationów jako związków przeciwdrobnoustrojowych. Biorąc pod uwagę fakt, iż antybiotykooporność jest dzisiaj globalnym problemem zdrowotnym, poszukiwanie nowych metod walki z drobnoustrojami jest jak najbardziej uzasadnione i wskazane. W mojej opinii, Kandydat do stopnia naukowego doktora wykonał ogrom ciężkiej pracy w laboratorium, a przeprowadzone przez Niego badania zostały odpowiednio zaplanowane. Niedociągnięcia edycyjne i językowe pojawiające się w pracy, w żaden sposób nie umniejszają jej wartości merytorycznej. Wyniki badań zostały opublikowane w renomowanych czasopiśmie o wysokich współczynnikach wpływu. Dlatego też, nie mam najmniejszych wątpliwości, iż Kandydat posiada znakomity, ukształtowany po opieką promotora rozprawy warsztat naukowy oraz jest gotowy do samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych.

Mając na uwadze powyższe stwierdzam, iż przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Rafała Jerzego Kopiasza zawiera elementy nowości naukowej i w pełni spełnia ustawowe (w świetle art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) oraz zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Kandydata do stopnia naukowego doktora do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

dr hab. inż. Emilia Sikorska, prof. uczelni

