

Gliwice, 22.07.2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Julii Pachli

pt.: *Liniowe poliaminy o silnych właściwościach przeciwbakteryjnych: synteza, charakterystyka i badanie zależności między strukturą a aktywnością biologiczną*

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej z dnia 13.06.2024 r. zgodnie z Uchwałą Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej nr 509/45/2024 podjętą w dniu 11.06.2024 r.

Przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską pani mgr inż. Julia Pachla wykonała w Katedrze Chemii i Technologii Polimerów na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, pod kierunkiem promotora pana prof. dr hab. inż. Dominika Jańczewskiego.

Mając na uwadze unikalne właściwości naturalnych związków małowcząsteczkowych wzrasta intensywność badań zajmujących się ich syntetycznymi naśladowcami, do których należą także makrocząsteczki o odpowiednio zaprojektowanej strukturze. Szczególnie istotnym obszarem są zastosowania biomedyczne, w których wykorzystanie polimerów wiąże się z określonymi wymaganiami, takimi jak biogodność i nietoksyczność wobec zdrowych komórek, ograniczenie niepożądanych efektów ubocznych, czy też poprawa rozpuszczalności transportowanego związku biologicznie aktywnego. Zainteresowanie funkcjonalnymi materiałami polimerowymi w znacznym stopniu jest ukierunkowane na generowanie właściwości przeciwbakteryjnych i ich wykorzystaniu w antybiotykoterapii, w tym przeciwdziałając lekooporności i innym poważnym problemom, które wynikają ze stosowania konwencjonalnych antybiotyków począwszy od pionierskiej penicyliny.

Tematyka rozprawy doktorskiej podejmuje działania, które mają wskazać rozwiązanie na istniejące problemy antybiotykoterapii, proponując nowe struktury polimerów liniowych, w tym kopolimerów gradientowych, syntezowanych z wykorzystaniem metody polimeryzacji z otwarciem pierścienia monomerów oksazynowych i oksazolinowych. Otrzymane poliaminy jako funkcjonalne materiały zawierające I-, II-, III-rzędowe grupy aminowe i IV-rzędowe grupy amoniowe, które wskazują na aktywność biologiczną, były badane pod kątem oznaczenia właściwości przeciwdrobnoustrojowych wobec modelowych mikroorganizmów (bakterie i drożdże) oraz szczepów klinicznych, w tym cytotoksyczności i aktywności hemolitycznej. Rozprawa na układ klasyczny i obejmuje 182 strony, na które składają się: *Streszczenie w j. polskim i angielskim* (4 stron), *Wykaz użytych skrótów i symboli* (3 strony), *Wstęp i cel pracy* (3 strony), *Przegląd literatury* (46 stron), *Badania własne i dyskusja wyników* (54 strony), *Podsumowanie i wnioski* (3 strony), *Część*



doświadczalna (17 stron), *Bibliografia* (23 strony), *Załączniki* zawierające 31 rysunków i 2 tabele (19 stron) oraz *Spis artykułów własnych* (1 strona).

Część literaturowa rozpoczyna się od omówienia peptydów przeciwdrobnoustrojowych wytwarzanych przez układ odpornościowy do walki z patogenami i naśladujących je syntetycznych polimerów o zbliżonej aktywności biologicznej, do których należą kationowe polimery amfifilowe o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Po czym Doktorantka przedstawia podstawowe czynniki, takie jak rodzaj komórki i skład membrany dwulipidowej, równowaga hydrofilowo-lipofilowa, długość łącznika alkilowego, rodzaj grupy aminowej i kationowej, sztywność łańcucha oraz ciężar cząsteczkowy, które mogą wpływać na właściwości biologiczne wyżej wspomnianych polimerów. W kolejnym podrozdziale wyjaśnia mechanizm kopolimeryzacji, w której kluczową rolę odgrywają względne współczynniki reaktywności komonomerów decydujące o rozmieszczeniu dwóch rodzajów merów wzdłuż łańcucha, tj. statystycznym, blokowym, naprzemiennym lub gradientowym. Ten ostatni rodzaj kopolimerów, w szczególności zawierających jednostki aminowe, ma ścisły związek z pracą doktorską. W dalszej części skupia się na mechanizmie polimeryzacji kationowej z otwarciem pierścienia (CROP) cyklicznych iminoeterów, takich jak 2-podstawiona-2-oksazyna i -oksazolina. Jednocześnie zwraca uwagę na najpopularniejsze i dostępne handlowo poli(2-alkilo-2-oksazoliny) (alkil = metyl, etyl, *n*-butyl, izopropyl) i ich analogowe polioksazyny, które znajdują zastosowania biomedyczne, np. jako wektory transfekcji genów i nośniki leków. Ponadto, obydwie grupy polimerów są prekursorami poliamin, które powstają w wyniku hydrolizy.

Pod względem merytorycznym omówione zagadnienia stanowią bardzo dobre wprowadzenie do pracy eksperymentalnej. Wątpliwości nasuwają rysunki 20 i 22, na których przedstawione struktury są powtórzeniem tych z wcześniejszych rysunków 2(c,d) i 13(c,d). Doktorantka opracowała przegląd literaturowy na podstawie 217 artykułów, głównie opublikowanych po 2000 roku, co podkreśla aktualność tematyki, zaś te starsze odnoszące się do stanu wiedzy w latach 60-tych i nieco późniejszych przedstawiają pierwsze raporty w zakresie badanych związków. Odnośnie zapisu cytowanej bibliografii, nie ma zachowanego jednego formatu dla publikacji, gdzie pojawiają się niepotrzebne informacje (np. 123, 145, 159, 162), czy też podano niewłaściwy rok 1440 (202), co zapewne wynika z niedoskonałości używanego oprogramowania.

W pracy doktorskiej pani mgr Pachla skupiła się na następujących celach badawczych:

- i) Synteza poliamin o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych o mechanizmie działania odmiennym niż dla klasycznie stosowanych antybiotyków:
 - a) polioksazyny i polioksazoliny jako prekursory politrimetylenoimin i polietylenoimin,
 - b) *N*-metylowane i *N,N*-dimetylowane pochodne homopolimerów,
 - c) gradientowe kopolimery oksazynowo-oksazolinowe jako prekursory kopolimerów trimetylenoiminowo-etylenoiminowych,
 - d) zhydrolizowane polimery, w tym częściowo;
- ii) Weryfikacja aktywności biologicznej poszczególnych serii (ko)polimerów, w szczególności wskazanie struktur o silnym działaniu przeciwbakteryjnym, niskiej toksyczności wobec organizmów eukariotycznych i obniżonej antybiotykoodporności w oparciu o korelację z ich parametrami strukturalnymi.



Dyskusję wyników Doktorantka rozpoczęła od omówienia syntezy monomerów 2-*n*-propylo-2-oksazyny (1) i 2-metylo-2-oksazyny (2), podczas gdy trzeci użyty monomer 2-metylo-2-oksazolina (3) był dostępny handlowo. Powyżej wymienione monomery poddano polimeryzacji CROP uzyskując serię odpowiadających im polimerów (seria 1: 7 polimerów; seria 2: 1 polimer; seria 3: 2 polimery). W analogicznej procedurze otrzymano kopolimery 2-*n*-propylo-2-oksazyny i 2-metylo-2-oksazoliny o zróżnicowanym składzie (25/75, 50/50, 75/25) przy prawie całkowitym przereagowaniu komonomerów, dla których wyznaczone metodą Kelena-Tudosa względne współczynniki reaktywności wskazywały na zdecydowanie większą reaktywność monomeru oksazynowego i strukturę gradientową kopolimeru. Jednocześnie oznaczało to bardzo szybką kopropagację aktywnego łańcucha zakończonego jednostką oksazolinową z monomerem oksazynowym i bardzo wolną kopropagację aktywnego łańcucha zakończonego jednostką oksazynową z monomerem oksazolinowym, podczas gdy homopolimeryzacją oksazoliny następowała z większą szybkością niż homopolimeryzacja oksazyny, co potwierdzono wyznaczonymi wartościami stałych szybkości propagacji. Następnie w wyniku reakcji hydrolizy kwasowej wykonanej w reaktorze mikrofalowym w 140°C uzyskano odpowiednio politrimetylenoiminy zawierające łącznik alkilowy z 3 at.C (6 polimerów: 0,8k-18kDa) i polietylenoiminę z krótszym łącznikiem alkilowym 2 at.C (polimer 4kDa) oraz ich kopolimery gradientowe (3 polimery ~8kDa), dla których różnice w zasadowości określono na podstawie krzywych miareczkowania chlorowodorów poliamin. Ponadto, przeprowadzone badania kinetyczne hydrolizy w niższej temperaturze (30°C, 50°C, 70°C i 90°C) umożliwiły monitorowanie postępu reakcji i wyznaczenie pozornych stałych szybkości, które wskazały na szybszą hydrolizę grup oksazolinowych niż oksazynowych, podczas gdy te ostatnie hydrolizowały szybciej w homopolimerze niż w kopolimerze. Ponadto, w wyniku częściowej hydrolizy otrzymano serię kopolimerów, które zawierały dwa lub cztery rodzaje jednostek powtarzalnych, gdy wyjściowym był odpowiednio homopolimer lub kopolimer, osiągając pożądaną skład. Dodatkowo, w przypadku homopolimerów przeprowadzono *N*-metylowanie, a następnie *N,N*-dimetylowanie, aby uzyskać określony stopień czwartorzędowania wprowadzając trwałe ładunki dodatni (2 homopolimery i 4 kopolimery o zawartości jednostek jonowych 10% i 20%). Zsyntezowane związki zostały scharakteryzowane podstawowymi metodami fizykochemicznymi opierając się na analizie metodą chromatografii gazowej i żelowej (wyznaczenie konwersji monomeru i średnich ciężarów cząsteczkowych oraz wskaźnika dyspersyjności polimerów), jak i spektroskopii NMR (potwierdzenie struktury, określenie podstawowych parametrów).

Bardziej zaawansowana charakterystyka otrzymanych polimerów była ukierunkowana na badanie aktywności biologicznej, gdzie wyznaczono minimalne stężenie hamujące (MIC), stężenie hemolityczne wskazujące na lizę 50% czerwonych krwinek (HC50) i stężenie hamujące aktywność metaboliczną komórek o 50% (IC50) dla modelowych szczepów bakterii *Escherichia coli* (Gram-ujemna), *Staphylococcus aureus* (Gram-dodatnia), *Mycobacterium tuberculosis* (prątek gruźlicy) i grzyba *Candida albicans*, jak i dla izolatorów klinicznych szczepów patogennych z grupy ESKAPE stanowiących zagrożenie medyczne ze względu na ich oporność na powszechnie stosowane antybiotyki (po 4 szczepy: *M. tuberculosis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, oraz po 1 szczepie: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*) oraz linii komórek fibroblastów ludzkich płuc (MRC-5). Badania te Doktorantka wykonała we współpracy z Katedrą

Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków (Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny) oraz z Instytutem Gruźlicy i Chorób Płuc. Badania potwierdziły, że politrimetylenoimina jest skuteczna wobec antybiotykoopornych szczepów *S. aureus* oraz jest bardziej aktywna od polietylenoiminy wobec modelowych szczepów, ale w przypadku szczepów grzyba i prątka gruźlicy aktywność ta jest umiarkowana lub nie występuje. Ponadto, aktywność przeciwdrobnoustrojowa politrimetylenoimin $\geq 3\text{kDa}$ znacząco wzrosła osiągając stały poziom. Natomiast aktywność ta wraz z cytotoksycznością została obniżona przez *N*-metylowanie i *N,N*-dimetylowanie. W przypadku kopolimerów gradientowych aktywność wzrastała wraz z zawartością jednostek trimetylenoiminowych, co wiązało się ze wzrostem zasadowości oraz korelowało z wynikami otrzymanymi dla blend ich homopolimerów mieszanych w proporcjach odpowiadających składom kopolimerów. Z kolei struktury otrzymane w wyniku hydrolizy wykazały wzrost aktywności wraz z zawartością grup aminowych, podczas gdy obecność grup amidowych powodowała obniżenie cytotoksyczności. Na tym etapie badań stwierdzono, że otrzymane poliaminy wymagają poprawy selektywności, aby mogły być stosowane wewnątrzustrojowo. Jednakże uzyskane wyniki są obiecujące ze względu na wstępnie wykazany odmienny mechanizm działania w odniesieniu do konwencjonalnych antybiotyków i możliwość pominięcia efektu oporności bakterii. W związku z tym warto byłoby, aby w przyszłości badania były kontynuowane bazując na uzyskanej wiedzy.

Obszerna zagadnieniowo praca o charakterze interdyscyplinarnym wymagała różnorodnej wiedzy i umiejętności od Doktorantki, aby wykonać syntezy monomerów i polimerów oraz odpowiednie ich modyfikacje, a następnie określić właściwości biologiczne, które były weryfikowane z użyciem testu XTT i MTT. Jednocześnie badania te odnosiły się do zagadnień z zakresu chemii, fizykochemii i biochemii polimerów oraz szczegółowej charakterystyki biologicznej materiałów polimerowych.

Sposób przedstawienia badań i interpretacja wyników nie budzą zastrzeżeń merytorycznych, chociaż niektóre zagadnienia wymagają uzupełnienia lub wyjaśnienia:

- 1) Dlaczego zastosowanie wielkocząsteczkowych związków o właściwościach antybiotycznych ma być bardziej efektywne od terapii związkami małowcząsteczkowymi, które mogą być kojarzone, aby zwiększyć efekt terapeutyczny?
- 2) W jaki inny sposób niż na zasadzie zróżnicowanej reaktywności komonomerów można otrzymać gradientową strukturę kopolimeru?
- 3) W przypadku otrzymanych polimerów oksazynowych i oksazolinowych oraz kopolimerów gradientowych nie wykonano pomiarów SEC. Ponadto, z czego wynika tak duża rozbieżność ciężarów cząsteczkowych M_n , które dla metylowanych pochodnych są dwukrotnie mniejsze niż dla ich prekursorów (PTMI_7k: 6,7kDa vs 3,6kDa, tabela 2 vs tabela 7).
- 4) stosowane nazewnictwo kopolimerów jest niepoprawne, np. „kopolimery gradientowe poli-2-metylo-2-oksazolin i poli-2-fenilo-2-oksazolin”, „kopolimery zawierające PEI r.u.” podobnie PPrOzi-co-PMeOx, L-PTMI-co-L-PEI (to samo dotyczy metylowanych i hydrolizowanych pochodnych). Przypomina to coś w rodzaju hybrydy kopolimeru blokowego ze względu na wskazane segmenty i ogólnego zapisu kopolimeru ze względu na łącznik *co*, ale jest to niezgodne z podstawowymi zasadami nomenklatury polimerów. W związku z tym jak poprawnie należy zapisać



nazwy otrzymanych kopolimerów? Odnosząc się do zapisu polimetakrylan i poli(metakrylamid): kiedy należy stosować nawiasy? Która forma jest poprawna: PEG jako glikol polietylenowy str. 32 czy poli(glikol etylenowy) str.60?

5) Jakie inne metody są stosowane do wyznaczania względnych współczynników reaktywności komonomerów?

6) Konwersję monomeru obliczano na podstawie analizy GC, ale można to także sprawdzić za pomocą pomiarów NMR mieszaniny reakcyjnej dla potwierdzenia wyników otrzymanych inną metodą, uzyskując porównywalne wyniki. Czy taki wariant był wzięty pod uwagę?

7) W jakim celu są stosowane 3 różne określenia dla jednego parametru, tj. jednostki powtarzalne i skrót r.u. od repeating units, podczas gdy to samo definiuje stopień polimeryzacji DP? Podobnie są stosowane wymiennie: ciężar cząsteczkowy, masa cząsteczkowa i MW, czy też SEC i GPC.

Autorka nie uniknęła także błędów dotyczących skrótów myślowych (np. *długość polimeru*; *kowalencyjne przyłączenie anionu*, *polimery z aminami*), problemów ze stosowaniem skrótów (najpierw skrót, a w dalszej części dopiero wyjaśnienie, np. SMAMPs, MIC, zaś inne skróty są wielokrotnie wprowadzane, np. DQ str.40 i 46, i tłumaczone, np. MIC str. 72, a niektóre wcale, np. MeOTs, DMF, ACN), niewłaściwie wprowadzonych do tekstu rysunków (brak zachowanej kolejności wg rosnących numerów, np. rys. 7, rys. 6, rys. 10 i rys.19, rys.18, nie zawsze we właściwym miejscu zdania, np. rys. 7g, 10c, 10e, lub wcale nie są wprowadzone, np. rys. 9, 11, 15, 23), niefortunnego tłumaczenia z jęz. angielskiego (np. *stromy gradient* zamiast silny gradient) i błędów przypadkowych (np. *MBC* zamiast *MIC* str. 50; *przeciwwgrzybowe* str. 19, *pierwszorzędowe grupy amoniowe*) oraz warto pamiętać, że w j. polskim rysunek, tabela, etc. powinny być pisane z małej litery.

W dorobku naukowym Doktorantki znajdują się 4 artykuły opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, w tym 2 związane z tematyką pracy doktorskiej, w których jest pierwszym autorem (IF: 5,5 i 5,8, za 140 pkt, TOP10). Zgodnie z podaną informacją kolejna publikacja jest w przygotowaniu. Praca doktorska była realizowana w ramach dwóch projektów NCN, SONATA BIS 5 (2016-2022) i OPUS 20 (2021-2025, w realizacji) kierowanych przez Promotora.

Podsumowując, przedstawioną do recenzji pracę doktorską oceniam bardzo dobrze, Autorka otrzymała różne rodzaje polimerów aminowych, w tym kopolimerów gradientowych, a następnie wykazała wpływ ich struktury na podstawowe parametry biologiczne wstępnie wskazując ich duży potencjał jako przyszłościowe materiały funkcjonalne o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Recenzowana praca spełnia kryterium nowości naukowej, o czym świadczą artykuły opublikowane w czasopiśmie o dużym wskaźniku oddziaływania. Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej na Politechnice Warszawskiej o dopuszczenie mgr inż. Julii Pachli do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.