

## **Zakład Biologii Medycznej**

Instytut Biologii

Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

ul. Świętokrzyska 15

25-406 Kielce

tel. 41 349 63 31

email: arabski@ujk.edu.pl

---

Kielce, 16.08.2023

Dr hab. Michał Arabski, prof. UJK

Zakład Biologii Medycznej

Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Uniwersytet Jan Kochanowskiego w Kielcach

### **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz

*Nowe polimery antybakteryjne zaburzające ciągłość dwuwarstwy lipidowej, badania mechanizmów aktywności i regulacji przewodnictwa jonowego*

Narastająca antybiotykooporność patogenów w ramach klasycznych terapii stanowi obecnie problem o zasięgu światowym. Opracowanie nowych terapii alternatywnych wymaga interdyscyplinarnych badań, pozwalających na ocenę ich skuteczności w eradykacji komórek bakteryjnych, opisie mechanizmu działania, efektów ubocznych wobec komórek eukariotycznych oraz potencjalnego ryzyka nabywania oporności. W ramach nowych terapii opracowywanych jest obecnie szereg rozwiązań opartych na nanozwiązkach, kompleksach metali przejściowych, nowych form dostarczania znanych leków, bakteriofagach i rekombinowanych białkach fagowych czy też peptydów przeciwbakteryjnych. Wspólnym mianownikiem tych rozwiązań, zwłaszcza w kontekście mechanizmu działania, jest oddziaływanie z błoną komórkową. Niejednokrotnie błona ta stanowi kluczową barierę ograniczającą możliwość stosowania czynników bójczych o potencjalnie wysokiej skuteczności. Przykładem może być aktywność endolizyn fagowych wobec bakterii Gram-ujemnych dla których zewnętrzna błona komórkowa stanowi ograniczenie w degradacji peptydoglikanu. Niejednokrotnie rozważane są kombinacje preparatów zawierających czynnik zaburzający integralność błony komórkowej, ułatwiający transport dodatkowego związku bójczego o działaniu wewnątrzkomórkowym, co addytywnie wzmacnia skuteczność eliminacji komórki bakteryjnej. Wiedza z zakresu charakterystyki zaburzeń ciągłość dwuwarstwy lipidowej w obecności np. peptydów przeciwbakteryjnych warunkuje ich skuteczność i aplikacyjność, w tym w powyższych układach skojarzonych. Wysoka aktywność bójcza peptydów zwłaszcza o krótkich sekwencjach daje możliwości wydajnych syntez chemicznych a zarazem produkcji w systemach ekspresyjnych z wykorzystaniem narzędzi biologii molekularnej.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz pt. *Nowe polimery antybakteryjne zaburzające ciągłość dwuwarstwy lipidowej, badania mechanizmów aktywności i regulacji przewodnictwa jonowego* wpisuje się w powyższą tematykę związaną z zastosowaniem nowych polimerów przeciwbakteryjnych zaburzających ciągłość dwuwarstwy lipidowej. Interującym rozwiązaniem z biologicznego punktu widzenia, co podkreśla Doktorantka, jest zastosowanie w badaniach polimerów naśladujących działanie peptydów przeciwbakteryjnych, co daje możliwość kontroli pomiędzy regionami hydro- i lipofilowymi w ich strukturze. Parametr ten (HLB) przekłada się na ich wysoką aktywność przeciwbakteryjną z obniżonym efektem cytotoksycznym wobec komórek eukariotycznych.

Praca doktorska Pani mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz stanowiąca podstawę do nadania stopnia doktora została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Dominika Jańczewskiego. Badania zostały sfinansowane w ramach dwóch grantów Narodowego Centrum Nauki o numerach (PoCoDi) 2015/18/E/ST5/00222 oraz (ConPPM) 2020/39/B/ST4/00183. Wyniki badań zostały opublikowane w ramach dwóch prac i jednej będącej w trakcie recenzji z dominującym wkładem Pani mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz związanym z koncepcją i przeprowadzeniem części doświadczalnej pracy, analizą wyników oraz przygotowaniem manuskryptów:

- Dominika Kozon, Jolanta Mierzejewska, Tomasz Kobiela, Agnieszka Grochowska, Ksenia Dudnyk, Agnieszka Głogowska, Anna Sobiepanek, Aleksandra Kuźmińska, Tomasz Ciach, Ewa Augustynowicz-Kopeć, Dominik Jańczewski. Amphiphilic Polymethyloxazoline–Polyethyleneimine Copolymers: Interaction with Lipid Bilayer and Antibacterial Properties. *Macromolecular Bioscience* (rok: 2019, tom: 19, strony: 1900254).
- Dominika Kozon, Piotr Bednarczyk, Adam Szewczyk, Dominik Jańczewski. Regulation of Lipid Bilayer Ion Permeability by Antibacterial Polymethyloxazoline-Polyethyleneimine Copolymers. *ChemBioChem* (rok: 2021, tom: 22, strony: 1020-1029).

W kolejnych częściach recenzji odniosę się do poszczególnych rozdziałów rozprawy. Jako całość napisana jest starannie, w sposób usystematyzowany co do omawianych treści. Praca posiada części typowe dla rozprawy doświadczalnej. Ryciny w części stanowiącej wprowadzenie w pełni obrazują omawiane treści i ułatwiają ich zrozumienie.

We wstępie rozprawy Doktorantka przedstawiła cel pracy tj. ocenę wpływu składu lipidowego dwuwarstwy na mechanizm działania polimerów przeciwbakteryjnych z zastosowaniem modeli liposomowych oraz techniki BLM. W badaniach tych zastosowano membrany modelowe

naśladujące błonę komórek bakteryjnych. Cel pracy sformuowany jest klarownie i został osiągnięty w trakcie realizacji części doświadczalnej rozprawy.

Rozdział *PRZEGLĄD LITERATURY* stanowi kompendium wiedzy z zakresu charakterystyki wybranych polimerów przeciwbakteryjnych, w tym jonenów oraz polietylenoiminy i jej pochodnych, budowy błon i ścian komórkowych, organizacji przestrzennej agregatów lipidowych z uwzględnieniem przemian fazowych i właściwości wybranych lipidów. W drugiej części wprowadzenia Doktorantka przedstawia charakterystykę modeli membrany komórkowej uwzględniających jej skład. Część trzecia to przegląd wybranych technik analitycznych pozwalających na ocenę oddziaływania substancji czynnej z dwuwarstwą lipidową, w tym techniki liposomowe oraz BLM. Wprowadzenie kończy zestawienie wpływu konkretnych lipidów na aktywność związków przeciwbakteryjnych, co uzupełnia wiedzę mającą bezpośrednie przełożenie na część doświadczalną rozprawy. Do tej części pracy mam pytanie dotyczące przykładów konkretnych polimerów przeciwbakteryjnych mogących tworzyć pory w błonie komórkowej. Czy znane są w literaturze mimetyki peptydów przeciwbakteryjnych z grupy polimerów o powyższej aktywności?

Rozdział *BADANIA WŁASNE I ANALIZA WYNIKÓW* przedstawia zarówno interpretację wyników jak również ich zestawienie z prawidłowo dobranymi źródłami literaturowymi. Badania te przeprowadzono w dwóch etapach. Pierwszym z nich dotyczył grupy polimerów o charakterze amfifilowym i hydrofilowym, drugi to badania kopolimerów polietylenoiminy i polioksazoliny metylowej z czwartorzędowymi jednostkami powtarzalnymi różniącymi się zeta potencjałem.

W pierwszej kolejności Doktorantka przebadła zależność aktywności dwóch jonenów tj. C0-T-p i C8-T-p od składu lipidowego z zastosowaniem modeli liposomowych o zróżnicowanym składzie poprzez pomiar uwalniania kalceiny. Związki te były wstępnie scharakteryzowane pod kątem aktywności membranowej i biologicznej. Analizując efekt zaburzający strukturę dwuwarstwy lipidowej obu badanych jonenów, Doktorantka zaobserwowała różnice w kinetyce tego zjawiska pomiędzy C0-T-p i C8-T-p, wpływ kardiolipiny oraz ładunku formalnego liposomów. W tej części recenzji mam pytanie dotyczące potencjalnego mechanizmu przeciwbakteryjnego badanych jonenów na komórki bakteryjne na drodze zależnej od kardiolipiny. Czy mechanizm ten może być podobny z chemicznego punktu widzenia do efektu amfifilowych pochodnych aminoglikozydów, które poprzez oddziaływanie z mikrodomenami kardiolipiny nie tylko prowadzą do zwiększenia przepuszczalności i zmniejszenia płynności dwuwarstwy lipidowej, ale pośrednio oddziałują na białka bakteryjne związane z podziałem komórkowym i procesem fosforylacji oksydacyjnej? Mechanizm ten mógłby być szczególnie istotny w kontekście eradykacji szczepów *Pseudomonas aeruginosa* opornych na kolistynę. W kolejnym etapie badań Doktorantka wykazała, że oba jony powodowały zarówno

fuzję jak i wyciek z liposomów w zależności od ich stężenia. Istotnym rozszerzeniem ilościowych analiz z zastosowanym modelem liposomowym jest użycie techniki BLM, co pozwoliło na charakterystykę zaburzenia ciągłości dwuwarstwy lipidowej na podstawie przepływu prądu. Poprzez rejestrację częstotliwości zerwań membrany w obecności C0-T-p i C8-T-p, średniego czasu aktywności polimeru oraz ilości i średniego czasu zdarzenia wykazano jej stabilizację w obecności C8-T-p w przeciwieństwie do bardziej aktywnego przeciwbakteryjnie C0-T-p (zrywanie modelowej membrany). Zastosowanie w rozprawie narzędzia badawcze wnoszą więc nową wiedzę w zakresie charakteru oddziaływania jonów z dwuwarstwą lipidową.

W drugiej części rozprawy Doktorantka opisała efekt polimerów oznaczonych PMOX-PEI na właściwości biologiczne, poziom agregacji oraz oddziaływanie z modelowymi membranami. Zastosowanie w badaniach serii polimerów różniących się zeta potencjałem pozwoliło na ocenę jego wpływu na właściwości bójcze wobec analizowanego panelu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, związane z oddziaływaniami o charakterze elektrostatycznym. Problematyczne były oznaczenia w przypadku szczepu grzybiczego *C. albicans*, wynikająca ze zmętnienia próbki. Proszę o próbę wyjaśnienia przyczyny powyższego zjawiska, a jego rozwiązaniem może byłoby zastosowanie techniki hodowlanej polegającej na określeniu liczby jednostek koloniotwórczych na podłożu stałym. Podobny efekt obecności hydrofobowych łańcuchów w strukturze polimeru miał efekt na analizowane w pracy właściwości hemolityczne i cytotoksyczne, co związane jest z ich zdolnością zaburzenia ciągłości dwuwarstwy lipidowej oraz indukcją transportu jonów. Proszę o wyjaśnienie dlaczego na rycinie 43 nie podano żywotności przy braku w próbce badanej analizowanych form polimerowych i zastosowano różne zakresy stężeń. Ważnym elementem tej części badań bezpośrednio związanym z celem pracy jest efekt polimerów PMOX-PEI na ciągłość dwuwarstwy lipidowej, której zaburzenie ocenione metodą BLM (indukcja różnych typów prądów oraz możliwość wbudowania w strukturę membrany) jest skorelowany z badaną aktywnością biologiczną.

Rozdział CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA to opis zastosowanych materiałów oraz metod badawczych i w moim przekonaniu powinien być przed opisem wyników w ramach rozprawy. Prezentacja metod i zastosowanych materiałów jest szczegółowa i zawiera informacji wymagane do odtworzenia części doświadczalnej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz pt. *Nowe polimery antybakteryjne zaburzające ciągłość dwuwarstwy lipidowej, badania mechanizmów aktywności i regulacji przewodnictwa jonowego* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego wnosząc nową wiedzę w zakresie aktywności

biologicznej polimerów przeciwbakteryjnych w kontekście składu i ciągłości dwuwarstwy lipidowej i spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn.zm). Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Michał Anab