



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Szczepan Zapotoczny
Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
tel. 12 686 2530
Email: zapotocz@chemia.uj.edu.pl

Wydział Chemii

RECENZJA

**Rozprawy doktorskiej mgr inż. Rafała Jerzego Kopiasza
pt.: "Synteza nowych przeciwdrobnoustrojowych polikationów oraz
badania ich aktywności z wykorzystaniem mikroorganizmów i
liposomów"**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Rafała Kopiasza obejmuje zagadnienia związane z syntezą i badaniem właściwości nowych polikationów, w szczególności, ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Tematyka pracy jest bardzo aktualna w kontekście rosnącego problemu związanego z antybiotykoopornością nabywaną przez szereg szczepów bakteryjnych i wynikające z tego rozprzestrzenianie się groźnych patogenów nie dających się zwalczać dostępnymi antybiotykami. Potencjalne zastosowanie nowych kationowych polimerów daje szansę na wytworzenie efektywnych narzędzi zwalczania tych patogenów, atakujących błony komórkowe bakterii, bez równoczesnego generowania lekooporności. Tego ambitnego naukowo i ważnego społecznie zadania podjął się Doktorant w przedstawionej do recenzji pracy.

Recenzowana rozprawa w klasycznym układzie składa się z części literaturowej opisującej aktualny stan wiedzy w tematyce rozprawy oraz części prezentującej wyniki badań Doktoranta i ich szczegółową analizę. Całość poprzedzona jest wstępem zawierającym sformułowane zasadnicze cele pracy, które obejmowały wytworzenie nowych polikationów oraz znalezienie korelacji pomiędzy ich strukturą, a aktywnością biologiczną.

Poszczególne rozdziały części literaturowej omawiają zagadnienia bezpośrednio związane z przedmiotem pracy w wyczerpującym zakresie. Doktorant przeprowadził gruntowne poszukiwania literaturowe m.in. w celu, jak sam stwierdza, „zidentyfikowania luk w wiedzy dotyczącej tej tematyki”. Na początku przedstawił on informacje dotyczące samej struktury błony komórkowej, która jest celem ataku przez interesujące go związki przeciwdrobnoustrojowe typu MTAC (ang. membrane-targeting antimicrobial compounds). W dalszej kolejności przedstawił przegląd dotychczas badanych MTAC z uwzględnieniem peptydów i syntetycznych polikationów oraz omówił mechanizmy ich działania. Wykonał także przegląd metod badań działania MTAC na komórki oraz modelowe układy liposomalne. Krytyczne omówienie tych metod, a nie tylko ich opis, jest bardzo istotne z punktu widzenia prowadzonych prac eksperymentalnych Doktoranta oraz wiarygodności prezentowanych wyników na tle dotychczasowej literatury.

Całościowo, część literaturowa napisana została merytorycznie poprawnie, w sposób przejrzysty i systematyczny. Świadczy to o zgłębieniu przez Doktoranta tematyki rozprawy doktorskiej, a czytelnikowi daje bardzo dobre tło dla motywacji podejmowanych badań oraz wprowadzenie do opisywanych dalej zagadnień.

Badania własne mgr inż. Rafała Kopisza zostały przedstawione w trzech głównych rozdziałach zakończonych łącznym podsumowaniem. Wyodrębniona została część eksperymentalna podająca spis użytych odczynników, metod syntezy i charakterystyki otrzymanych związków oraz innych procedur eksperymentalnych wykorzystywanych w pracy.

Pan mgr inż. Rafał Kopisz przygotował dobrze uzasadnioną i dość obszerną bibliotekę polimerów kationowych zawierających czwartorzędowe sole amoniowe w łańcuchu głównym, jonenów, które wykorzystywał w dalszej części pracy. Co warte podkreślenia, początkowe niepowodzenia w zaplanowanej pierwotnie metodzie syntezy przekuł w użyteczną i bardzo systematyczną analizę trwałości otrzymywanych jonenów, które w środowisku zasadowym ulegały rozpadowi. Przedstawione wnioski z tej części pracy są

interesujące w kontekście obecnego i potencjalnego zastosowania tego typu jonenów, co przez wielu badaczy mogłoby być przeoczone, a co istotnie wpływa na wyniki eksperymentalne (możliwy rozkład jonenów w trakcie eksperymentów prowadzonych w środowisku zasadowym).

Finalna koncepcja biblioteki jonenów uwzględniła problemy z trwałością polimerów o dużej gęstości czwartorzędowych grup amoniowych, które zostały „rozcieńczone” w łańcuchach odpowiednio podstawionymi grupami aromatycznymi. Umożliwiło to przetestowanie szczegółowych hipotez/celów badań związanych z wpływem sztywności łańcucha, izomerii położeniowej w makrocząsteczce, czy też obecności bocznych grup hydrofobowych na właściwości i aktywność biologiczną tej grupy polimerów. Przedstawione zostały szczegółowo ścieżki syntetyczne z pełnym uzasadnieniem. Doktorant z dużą starannością analizował zarówno widma NMR otrzymywanych związków, jak też ich chromatogramy otrzymane techniką SEC oraz wyciągał poprawne, dobrze uzasadnione wnioski.

W dalszej części badań Doktorant określił aktywność przeciwdrobnoustrojową zsyntezowanych polimerów względem dwóch wybranych modelowych szczepów bakterii (*E. Coli*, *S. Aureus*), kilku szczepów klinicznych oraz jednego szczepu grzyba (*C. Albicans*), wyznaczając takie parametry jak minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC) oraz minimalne stężenie bakterio- i grzybobójcze (MBC i MFC). Na bazie uzyskanych wyników, porównując głównie wartości MIC, wyciągnął on szereg dobrze uzasadnionych eksperymentalnie wniosków w zakresie zależności aktywności biologicznej względem danych drobnoustrojów od struktury makrocząsteczek. Oprócz potwierdzenia pożądanых właściwości antymikrobiotycznych (niska wartość MIC) konieczne było sprawdzenie właściwości hemolitycznych otrzymanych polimerów. Joneny, które miały najlepsze właściwości antymikrobiotyczne okazały się także mieć niewielką tendencję do indukowania rozpadu erytrocytów, co jest korzystne z punktu widzenia potencjalnych zastosowań. Badania cytotoksyczności wskazały, że najlepszą selektywnością względem badanych szczepów charakteryzowały się polikationy o najwyższej hydrofilowości, które w kontekście wszystkich wyników badań biologicznych są najbardziej obiecujące.

Oprócz badań na komórkach Doktorant przeprowadził także badania na modelowych układach liposomalnych. W obu przypadkach stosował metody fluorescencyjne, badania mikroskopowe oraz korzystał z pomiarów dynamicznego rozpraszania światła, wyznaczania

potencjału dzeta komórek i liposomów do określenia przepuszczalności, ładunku powierzchniowego, czy też obserwacji agregacji komórek/liposomów pod wpływem zastosowanych jonów. Te badania na układach modelowych pozwoliły na postawienie i wstępne zweryfikowanie hipotez dotyczących wpływu składu i wynikającej z tego krzywizny błon liposomalnych na ich stabilizację (lub destabilizację) pod wpływem hydrofilowych oraz amfifilowych jonów. Wyciągnięte przez Doktoranta wnioski w tym zakresie stanowią możliwe wyjaśnienie gorszego niż oczekiwane działania antymikrobiocznego hydrofobowych jonów w stosunku do hydrofilowych. Ten i kilka innych wniosków z pracy doktorskiej stanowią ważny wkład do projektowania związków o działaniu antymikrobiocznym opartych na polikationach i stanowią istotny element nowości naukowej rozprawy.

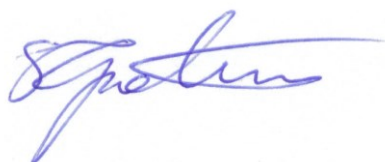
Przedstawiona do recenzji praca doktorska zawiera szereg bardzo wartościowych wyników badawczych, z których wybrane wymieniłem wyżej. Nie mam też zastrzeżeń do klarowności i stylu tekstu poza nielicznymi błędami literowymi. Co najważniejsze, wyniki badawcze zostały przedstawione w sposób systematyczny i wyczerpująco opisane w krytyczny sposób. Zastosowany warsztat badawczy oceniam bardzo wysoko także z uwagi na interdyscyplinarny charakter pracy, w której Doktorant objął całe spektrum badań od syntezy nowych związków, ich charakterystyki fizykochemicznej, po badania układów koloidalnych i badania biologiczne. Świadczy to niewątpliwie o dużej dojrzałości naukowej Pana mgr Rafała Kopisza.

Choć finalne konkluzje dotyczące praktycznego zastosowania otrzymanych jonów nie są w pełni optymistyczne, to jednak chciałbym usłyszeć w trakcie obrony od Doktoranta jak widzi On możliwy kierunek rozwoju struktur polimerów kationowych w celu poprawy ich niektórych parametrów biologicznych (np. cytotoksyczność). Otrzymane w pracy doktorskiej jony mają stosunkowo małe masy cząsteczkowe – czy zmiana tego parametru może mieć istotne znaczenie dla poprawy aktywności biologicznej tego typu polimerów? Doktorant zaobserwował, że jony z grupami C8 i C12 oddziałują z białkami pożywki stosowanej przy hodowli bakterii i grzybów. Oczywiście w kontekście ich zastosowanie wewnątrzustrojowego może to być istotny problem, ale możliwe są inne zastosowania tego typu związku – czy Doktorant widzi takie możliwości, a jeśli tak, to w jakich układach.

W podsumowaniu mogę stwierdzić, że uzyskane przez Doktoranta wyniki prac badawczych przedstawionych w recenzowanej dysertacji niosą istotne wartości poznawcze

oraz znaczenie dla projektowania polikationów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Doktorant wykazał się umiejętnością prowadzenia pracy badawczej na wysokim poziomie, krytycznego spojrzenia na uzyskiwane wyniki oraz wyciągania rzetelnych wniosków na ich podstawie. Wyniki przedstawionych badań zostały opublikowane w trzech bardzo dobrych czasopismach specjalistycznych (Doktorant jest współautorem jeszcze jednej publikacji nie ujętej w dysertacji), a dwie kolejne publikacje są w przygotowaniu. We wszystkich tych publikacjach Pan mgr inż. Rafał Kopiasz jest pierwszym autorem, co świadczy o jego istotnym wkładzie w powstanie tych publikacji. Oceniając pozytywnie recenzowaną pracę stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65/2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Wnoszę, zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr inż. Rafała Kopiasza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoką jakość warsztatu badawczego, szczególnie w zakresie syntezy organicznej, wysoce interdyscyplinarny charakter prac, bardzo dojrzałą naukowo i krytyczną analizę uzyskanych wyników, a także wartość uzyskanych wyników dla projektowania nowych polimerów antymikrobiotycznych, wnoszę o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej.



Szczepan Zapotoczny

Kraków, 10.03.2022