

Dr hab. Mariusz Kępczyński, prof. UJ
Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii
Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz
zatytułowanej

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

Wydział Chemii

Oceniana praca doktorska Pani mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz została zrealizowana pod opieką prof. dr hab. inż. Dominika Jańczewskiego na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Rozprawa ma formę pracy pisemnej liczącej 139 strony. Jest opatrzona streszczeniem w języku angielskim, co spełnia wymogi ustawy.

Cel rozprawy doktorskiej dotyczył zrozumienia mechanizmu działania polimerów o właściwościach antybakteryjnych, w szczególności zbadano wpływ składu lipidowego membrany na aktywność wybranych związków przeciwbakteryjnych oraz charakteryzację zmian w strukturze dwuwarstwy lipidowej. Jak zaznaczyła Doktorantka realizacja tego celu wymagała wybrania modelowych membran naśladujących komórki bakteryjne oraz technik analitycznych umożliwiających zbadanie założonych parametrów. Warto podkreślić, że obserwuje się rosnącą ilość patogenów odpornych na stosowane obecnie antybiotyki. Dlatego badania nad nowymi substancjami przeciwbakteryjnymi są obecnie szeroko rozwijane. Tematyka ocenianej pracy jest więc bardzo aktualna i ważna dla rozwoju nowych materiałów mogących znaleźć zastosowanie jako środki antybakteryjne.

Oceniana rozprawa doktorska ma klasyczny układ, na który składają się cztery główne rozdziały. Rozpoczyna ją krótki rozdział zatytułowany „Wstęp i Cel Badań”, w którym Doktorantka przedstawiła zamysł swoich badań. Doktorantka dodała też wykaz skrótów stosowanych w treści

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl

rozprawy. Rozdział o tytule „Przegląd literatury” zawiera prezentację aktualnej wiedzy dotyczącej zagadnień poruszanych w pracy doktorskiej oraz opis stosowanych metod badawczych. Bardzo dobrym pomysłem było krótkie podsumowanie najważniejszych informacji zaprezentowanych w tym rozdziale. Najważniejszy rozdział pracy zatytułowany „Badania własne i analiza wyników” składa się z dwóch podrozdziałów opisujących badania dla dwóch różnych typów polimerów antybakteryjnych. Rozdział ten kończy się Podsumowaniem i wnioskami z pracy. Kolejny rozdział stanowi „Część eksperymentalna”, którego podrozdziały zawierają opisy stosowanych materiałów i aparatury, preparatyki próbek oraz sposobu przeprowadzenia poszczególnych eksperymentów. W mojej ocenie, pomysł umieszczenia tego rozdziału na końcu rozprawy doktorskiej wydaje się dosyć niefortunny i kłopotliwy dla czytelnika.

Jak wspomniano powyżej, rozprawa doktorska zawiera liczący 57 stron rozdział zatytułowany Przegląd literatury, który został opracowany w oparciu o bogatą literaturę przedmiotu (Autorka zacytowała w nim aż 159 oryginalnych prac badawczych). W tej części Doktorantka opisała w sposób wyczerpujący m.in. stosowane polimery antybakteryjne, ze szczególnym uwzględnieniem pochodnych polietylenoiminy oraz jonenów. Bardzo szczegółowo przedstawiono budowę oraz skład błon komórkowych oraz ścian komórkowych bakterii. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisała rodzaje lipidów budujących błony biologiczne oraz wpływ właściwości lipidów na morfologię struktur powstających w wyniku samoorganizacji lipidów w środowisku wodnym. Następnie Doktorantka przedstawiła opis modeli membran komórkowych, które są stosowane w badaniach różnymi metodami eksperymentalnymi. Omówiono m.in. liposomy, monowarstwy Langmuira, dwuwarstwy lipidowe osadzone na podłożu, czarne lipidowe membrany (BLM) oraz bicele. W kolejnym podrozdziale przedstawiono wybrane metody eksperymentalne stosowane do badania oddziaływań substancji czynnej z dwuwarstwą lipidową. Osobny podrozdział poświęcony został badaniom z użyciem membran BLM. Doktorantka szczegółowo opisała układ pomiarowy stosowany w tej technice oraz

sposób analizy wyników otrzymanych dla membran lipidowych. Następnie Doktorantka opisała mechanizmy oddziaływania makromolekuł z membraną lipidową. Ostatni podrozdział tej części pracy dotyczył wpływu składu błony komórkowej na aktywności związków przeciwbakteryjnych, ze szczególnym uwzględnieniem lipidów anionowych takich jak kardiolipina, czy fosfatydyloglicerol. Uważam, że zawarte w tym rozdziale opisy badań innych naukowców są dobrze dobrane, co świadczy o tym, że Autorka szczegółowo zapoznała się z dostępną literaturą w temacie swojej pracy doktorskiej. Po zapoznaniu się z tą częścią rozprawy pani mgr inż. Dominika Kozon-Markiewicz mogę z całkowitym przekonaniem stwierdzić, że posiada ugruntowaną wiedzę w dziedzinie nauki, której dotyczy praca doktorska.

Wydział Chemii

Rozprawa jest napisana poprawnym językiem. Zawiera liczne starannie przygotowane schematy, wykresy oraz tabele. Podczas redagowania tak obszernego opracowania Autorka nie ustrzegła się pewnych nieścisłości w opisie i prezentacji swoich wyników. Kilka przykładów przedstawiono poniżej.

Rysunek 21, w podpisie brakuje nazw polimerów zaprezentowanych na rysunku. Rysunek 29, podpis pod rysunkiem głosi: „Porównanie położenia maksimum wpływu kalceiny (wartość stężenia) powodowanego przez C8-T-p w funkcji zeta potencjału liposomów (a) oraz ładunku formalnego liposomów (b)”, co sugeruje, że na wykresie potencjał zeta lub ładunek formalny będą na osi odciętych, a stężenie polimeru będzie na osi rzędnych, natomiast na wykresie jest odwrotnie. W opisie rysunku 32 brakuje informacji, że fuzja liposomów była badana z wykorzystaniem sondy molekularnej R18. Dobrą praktyką jest umieszczanie w opisie rysunków informacji dotyczących stężeń badanych związków. Zgodnie z rysunkiem 33, kontrola pozytywna oznaczała dodanie C0-T-p, natomiast w tekście jest opis, że „Kontrola pozytywna polega na dodaniu do mieszaniny liposomów znakowanych (LUV-A) i nieznakowanych (LUV-B) roztworu Tritonu X-100”. Strona 66, Autorka napisała: „Zwitterjonowe POPE i POPC są zbliżone do siebie pod względem budowy. Jednakże niewielkie różnice w wielkości

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



hydrofilowej głowy”. Różnica w wielkości głowy pomiędzy PE i PC jest bardzo duża. Ponadto, głowy PE mogą tworzyć wiązania wodorowe w przeciwieństwie do PC. Strona 73, zdanie „Do badań wykorzystałam dwa różne roztwory buforowe, zapewniając w układzie obecność potencjału chemicznego, koniecznego do oznaczenia selektywności powstałych struktur.” Czy Autorce miała na myśli potencjał elektrochemiczny? Strona 81, zdanie „Zarejestrowałam widma fluorescencji polimerów P1-P3 przy długości fali równej 337 nm, a widma fluorescencji rejestrowałam w przedziale 357-600 nm” jest bardzo nieprecyzyjne. Zapewne pierwsza liczba oznacza długość fali wzbudzenia. Te nieścisłości uchwycone w pracy nie stwarzają dużego kłopotu podczas czytania, a tym bardziej nie wpływają na wartość naukową całej pracy.

W swojej rozprawie Doktorantka skupiła na dwóch grupach polimerów o potencjalnym działaniu antybakteryjnym. W pierwszym podrozdziale opisane są badania dotyczące dwóch jonenów oznaczonych jako C0-T-p i C8-T-p. Obydwa polimery posiadały taki sam łańcuch główny, natomiast C8-T-p miał dodatkowo w swojej strukturze boczne grupy *n*-oktylowe. Aktywność membranową jonenów zbadano wykorzystując pomiary fluorymetryczne uwalniania barwnika z liposomów, fuzji liposomów oraz przewodności membran lipidowych (technika BLM). Wyniki pokazały, że oba polimery powodowały fuzję liposomów oraz zaburzały strukturę dwuwarstwy lipidowej. C0-T-p specyficznie oddziałuje z kardiolipiną (CL), a zamiana CL na PG powodowała spadek aktywności C0-T-p. Natomiast, aktywność C8-T-p jest mniej specyficzna niż C0-T-p i zależy od ilości anionowych lipidów. Ważnym wynikiem przeprowadzonych badań była obserwacja obniżenia aktywności obu jonenów powodowana obecnością PC w składzie dwuwarstwy lipidowej.

W drugim podrozdziale Doktorantka opisała badania dotyczące kopolimerów polietylenoiminy i polioksazoliny (PMOX-PEI, oznaczone jako P1, P2 i P3) oraz liniowej polietylenoiminy (PEI). Wszystkie kopolimery posiadały w swojej strukturze grupy dodecyłowe, a różniły się ilością poszczególnych merów. Badano wpływ struktury polimeru na aktywność biologiczną oraz przewodnictwo jonowe dwuwarstwy

lipidowej. Wyniki pokazują, że badane polimery wykazują właściwości przeciwbakteryjne względem wybranym szczepom bakterii (m. in. E. coli, S. aureus, M. tuberculosis), jak i przeciwgrzybicze (C. albicans). Polimer o najwyższym zeta potencjale (P3) wykazywał największą aktywność biologiczną. Badania BLM pokazały, że polimery PMOX-PEI destabilizują dwuwarstwę lipidową w różnym stopniu indukując przepływ trzech typów prądów: małe prądy z nieregularną aktywnością, duże prądy z nieregularną aktywnością oraz prądy schodkowe zbliżone do prądów typu kanałowego. PMOX-PEI po wbudowaniu w dwuwarstwę lipidową tworzyły stabilne struktury, w przypadku polimeru P3 założono, że polimer ten może wbudowywać się w membranę tworząc agregaty transmembranowe lub powierzchniowo oddziaływać poprzez tworzenie tratw na jej powierzchni.

Rozprawa pani mgr inż. Kozon-Markiewicz dostarcza nowych, oryginalnych wyników na temat aktywności biologicznej polimerów antybakteryjnych oraz ich mechanizmów oddziaływania z membranami lipidowymi. W swoich badaniach Doktorantka użyła szeregu dobrze dobranych metod badawczych. Metody fluorescencyjne z wykorzystaniem sond molekularnych użyto do badania krytycznego stężenia agregacji polimerów (piren), porowania membran przez polimery (kalceina), fuzji pęcherzyków lipidowych (pochodna rodaminy B). Do badania zmian przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej przez wybrane polimery Doktorantka wykorzystwała technikę BLM. Ponadto, przy współpracy z innymi ośrodkami, dla wybranych polimerów Doktorantka mierzyła cytotoksyczność względem komórek HaCaT, aktywność hemolityczną oraz minimalne stężenie inhibicji (MIC) względem modelowych mikroorganizmów. Opisy przeprowadzonych eksperymentów są wystarczające, aby mogły być powtórzone przez innych naukowców. Uważam, że sposób przeprowadzenia doświadczeń, opracowania i dyskusji ich wyników zasługują na uznanie.

Oceniając uzyskane przez Doktorantkę wyniki, należy podkreślić ogromny wkład pracy wymagającej szczególnej skrupulatności i umiejętności badawczych. Zrealizowanie założonych celów naukowych

jest dużym sukcesem. Co ważne, duża część wyników zebranych w trakcie przygotowania niniejszej rozprawy została już opublikowana w formie trzech artykułów naukowych w bardzo dobrych czasopismach z listy JCR. To pokazuje, że jakość i oryginalność otrzymanych wyników zostały wysoko ocenione przez międzynarodowych ekspertów zajmujących się podobnymi badaniami. Prowadzone badania miały charakter badań podstawowych, jednak ich wyniki będą bardzo pomocne podczas projektowania nowych polimerów biologicznie aktywnych.

Poniżej kilka uwag (o charakterze dyskusyjnym), które powinny być przedyskutowane przez Doktorantkę w trakcie obrony pracy:

- Rysunek 26b i 27b, maksima dla liposomów V1 i V5 (o największej zawartości CL) wypadają dla coraz to większych stężeń polimeru C8-T-p. Doktorantka nie przedstawiła wyjaśnienia dla tej obserwacji.
- Podrozdział 3.1.2. Indukowanie fuzji przez jony. Fuzja liposomów prowadzi do znacznego zwiększenia ich rozmiarów, co można łatwo kontrolować stosując np. DLS lub inne metody pozwalające na wyznaczenie rozmiarów obiektów, brak opisu takich pomiarów w pracy.
- Nie jest jasne, dlaczego maksimum fuzji przypada dla stężenia jonów dla których wciąż obserwowane są niewielkie rozmiary liposomów (Rysunek 34).
- Tabela 4, Autorka pracy nie tłumaczy ujemnej wartości potencjału zeta dla agregatów polimeru P1. Wartość ta jest dosyć dziwna zważywszy na to, że w strukturze tego polimeru jest 9% merów dodatnio naładowanych.
- Dla polimeru P3 badano wpływ obecności jonów magnezowych w eksperymentach BLM. Doktorantka nie uzasadniła, dlaczego wybrała taki kation do tych pomiarów.
 - Wyniki pokazane na rysunku 42 i 43 oraz w Tabeli 5 wskazują, że „pocziwa” liniowa polyetylenoimina wykazuje bardzo dobre właściwości biologiczne (lepsze od badanych polimerów?).

Wnioski końcowe

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

W oparciu o przeprowadzoną analizę stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz pt. „Nowe polimery antybakteryjne zaburzające ciągłość dwuwarstwy lipidowej, badania mechanizmów aktywności i regulacji przewodnictwa jonowego” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 187, Dz. U. 2023 r. poz. 742), dlatego wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę duże walory poznawcze pracy, nowe oryginalne dane na temat wpływu bioaktywnych polimerów na właściwości modelowych membran lipidowych oraz spełnienie wymogów w sprawie wyróżniania rozpraw doktorskich, wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Warszawskiego o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr inż. Dominiki Kozon-Markiewicz.

Wydział Chemii

Kraków, 21 sierpnia 2023

ul. Gronostajowa 2
30-387 Kraków
tel. +48 12 686 26 00
fax +48 12 686 27 50
sekretar@chemia.uj.edu.pl
www.chemia.uj.edu.pl