



Politechnika Łódzka

Instytut Technologii Polimerów i Barwników

Łódź, 19 sierpnia 2024

prof. dr hab. inż. Joanna Pietrasik
Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Julity Pachli

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

Promotor: prof. dr hab. inż. Dominik Jańczewski

Polimery wykazujące właściwości antybakteryjne to materiały zdolne do hamowania wzrostu bakterii lub ich eliminowania. Może to wynikać ze struktury chemicznej polimerów, bądź też z ich funkcjonalizacji, na przykład przez dodanie środków antybakteryjnych. Polimery o właściwościach antybakteryjnych odgrywają kluczową rolę w wielu dziedzinach, bowiem znajdują zastosowanie między innymi w urządzeniach medycznych, w materiałach opakowaniowych, tekstyliach czy różnego typu powłokach.

Spośród polimerów, które właściwości antybakteryjne zawdzięczają swojej strukturze wymienić należy przede wszystkim poliaminy, kationowe polimery akrylowe, czy chitozan. Działają one poprzez różne mechanizmy, które między innymi mogą przyczyniać się do destabilizacji błony komórkowej, zakłócenia kluczowych procesów metabolicznych w komórkach bakteryjnych, mogą też bezpośrednio oddziaływać ze składnikami ściany komórkowej bakterii czy też wiązać się z DNA lub RNA bakterii, prowadząc tym samym do jej osłabienia i ostatecznego rozkładu. W konsekwencji polimery takie są zdolne do zabijania bakterii lub hamowania ich wzrostu. Należy nadmienić, iż każdy z tych mechanizmów może działać samodzielnie lub w połączeniu z innymi, co czyni takie polimery wszechstronnym narzędziem w walce z zakażeniami bakteryjnymi, a także przydatnymi w różnych zastosowaniach przemysłowych i medycznych.

Niewątpliwie rozwój i zastosowanie polimerów antybakteryjnych jest ważnym krokiem w kierunku innowacji technologicznych, który pozwala na tworzenie nowych, bardziej funkcjonalnych materiałów, odpowiadających na współczesne wyzwania, takie jak ochrona zdrowia czy środowiska.

W tym kontekście przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr inż. Julity Pachli, pt. „Liniowe poliaminy o silnych właściwościach przeciwbakteryjnych: synteza,

charakteryzacja i badanie zależności między strukturą a aktywnością biologiczną”, wpisuje się w aktualne trendy badań dotyczących syntezy i właściwości polimerów funkcjonalnych. Celem pracy było otrzymanie biblioteki związków opartych na liniowych poliaminach, ich weryfikacja pod kątem aktywności biologicznej, mając na uwadze potrzebę generowania struktur o silnym działaniu przeciwbakteryjnym, przy jednoczesnej niskiej toksyczności wobec organizmów eukariotycznych. Przedstawione badania są o tyle istotne, iż otrzymane polimery nie tylko wykazują właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne, ale mechanizm ich działania jest odmienny od klasycznie stosowanych antybiotyków. Zatem należy sądzić, że materiały te mogą przyczynić się do pomniejszenia skali oporności mikroorganizmów na antybiotyki.

Recenzowana praca liczy 182 strony. Układ dysertacji jest tradycyjny. Na początku rozprawy autorka zamieściła streszczenie odpowiednio w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów i symboli, spis treści, oraz wstęp i cel pracy, po których następuje przegląd literatury, dalej badania własne i dyskusja wyników, obejmująca pięć zasadniczych rozdziałów noszących następujące tytuły: a. *Liniowa politrimetylenoimina (L-PTMI)*; b. *Wpływ N-metylowania i N,N-dimetylowania na aktywność biologiczną L-PTMI i L-PEI*; c. *Kopolimery gradientowe L-PTMI i L-PEI*; d. *Badania nad szybkością hydrolizy kopolimeru PPrOzi_{50%}-co-PMeOx_{50%}*; e. *Kopolimery otrzymane w wyniku częściowej hydrolizy polioksazyn i poliokazolin*. W kolejnych sekcjach autorka zawarła podsumowanie i wnioski oraz część doświadczalną, która odnosiła się do stosowanych materiałów, organizmów, aparatury, jak również stosowanych procedur syntezy, prowadzonych badań oraz oznaczeń wyselekcjonowanych parametrów, całość rozprawy kończy rozdział zatytułowany *Bibliografia*. Dodatkowo rozprawa zawiera załączniki oraz wykaz artykułów naukowych, w tym będących podstawą recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Część literaturowa zawarta na 46 stronach to spójny i przemyślany tekst. Ta część rozpoczyna się od zapoznania czytelnika z takimi pojęciami jak peptydy przeciwdrobnoustrojowe, (AMPs) oraz syntetyczne polimery naśladujące peptydy przeciwdrobnoustrojowe, SMAMPs. W tej części odnajdziemy także przykładowe struktury polimerów przeciwdrobnoustrojowych. Kolejny rozdział poświęcono czynnikom wpływającym na aktywność biologiczną polimerów przeciwdrobnoustrojowych. W tym kontekście omówiono znaczenie równowagi hydrofilowo-lipofilowej, długości łącznika hydrofobowego, rodzaju grup kationowych oraz sztywności łańcucha i masy cząsteczkowej. Mając na uwadze metody syntezy omawianych polimerów osobny rozdział poświęcono kopolimeryzacji, która jest stosunkowo łatwym narzędziem umożliwiającym otrzymanie szerokiej gamy kopolimerów o właściwości odmiennych aniżeli odpowiadające im homopolimery. Dalej przedstawiono poli(cykliczne iminoetery), rozważając polimeryzację cyklicznych iminoeterów, polioksazoliny i polioksazyny oraz hydrolizę poli(cyklicznych iminoeterów). Ostatni rozdział w tej części rozprawy to podsumowanie i przedstawienie założeń pracy.

Przegląd literatury jest napisany w sposób przystępny i angażujący. Pani mgr inż. Julita Pachla w interesujący, a przede wszystkim konkretny sposób wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące polimerów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, przedstawiając i omawiając najistotniejsze parametry molekularne tych polimerów. W swojej analizie zwraca również uwagę na niejednoznaczności w wynikach badań oraz na problemy, które wciąż pozostają nierozwiązane. Ta część rozprawy zdecydowanie spełnia swoje zadanie.

Krótkie podsumowanie wskazuje na istniejącą lukę w literaturze, którą zajęła się w swoich badaniach Pani mgr inż. Julita Pachla. Wybrana do badań liniowa politrimetylenoimina nie była jak dotąd badana pod kątem jej działania przeciwdrobnoustrojowego i niewątpliwie biorąc pod uwagę jej liniowy analog, polietylenoiminę, stanowi bardzo obiecujący materiał.

Badania własne i dyskusja wyników obejmują pięć spójnych rozdziałów.

W pierwszym z nich mgr inż. Julita Pachla opisała procedurę syntezy i scharakteryzowała właściwości liniowej politrimetylenoiminy (L-PTMI). W tym celu w pierwszej kolejności zsyntetyzowała poli(2-*n*-propylo-2-oksazyny) o zróżnicowanej masie cząsteczkowej oraz poli(2-metylo-oksazolinę), która posłużyła jako układ odniesienia. Jako metodę polimeryzacji wykorzystowała polimeryzację kationową z otwarciem pierścienia, którą prowadziła w reaktorze mikrofalowym. Zróżnicowanie czasu trwania polimeryzacji pozwoliło na uzyskanie polimerów o założonych masach cząsteczkowych z zachowaniem odpowiednio niskiej dyspersyjności. Następnie otrzymane polimery zostały poddane reakcji hydrolizy w warunkach kwasowych, w wyniku której otrzymano 6 liniowych politrimetylenoimin o zróżnicowanych wartościach masy cząsteczkowej (MW) oraz liniową polietylenoiminę. Ciężary cząsteczkowe zostały oznaczone z wykorzystaniem chromatografii żelowej (SEC), natomiast stopień konwersji monomerów odpowiednio za pomocą chromatografii gazowej (GC) oraz analizy spektroskopowej magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR). Tak otrzymane polimery zostały scharakteryzowane pod kątem ich aktywności biologicznej, co pozwoliło na określenie wpływu masy cząsteczkowej na ich aktywność. Pani mgr inż. Julita Pachla określiła takie parametry jak minimalne stężenie hamujące (MIC), stężenie powodujące lizę 50% czerwonych krwinek w badanej próbce (HC₅₀), stężenie hamujące aktywność metaboliczną komórek ssaczych o 50% (IC₅₀). Do badań wybrano modelowe organizmy: *E. coli* (bakteria Gram-ujemna), *S. aureus* (bakteria Gram-dodatnia); *C. albicans* (grzyb). Badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej zostały również wykonane dla występujących naturalnie oligomerycznych poliamin o istotnym znaczeniu biologicznym. Okazało się, że MW odgrywa kluczową rolę w aktywności biologicznej tych materiałów, tzn. jest ona tym większa im wyższa MW. Obliczone wskaźniki selektywności (IC₅₀/MIC) również istotnie zależą od tego parametru. Ogólnie stwierdzono, iż otrzymane polimery wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe, znacznie efektywniejsze w porównaniu z naturalnie występującymi analogami poliamin. Natomiast oznaczona aktywność przeciwgrzybicza dla wszystkich badanych polimerów była umiarkowana, co mgr inż.

Julita Pachla przypisała różnej budowie ścian i błon komórkowych badanych mikroorganizmów. W testach aktywności wobec izolatów klinicznych mikroorganizmów z grupy ESKAPE wykorzystane zostały wybrane politrimetylenoiminy, L-PTMI_1.2k i L-PTMI_7k.

W odniesieniu do tej części rozprawy proszę o skomentowanie z jakich powodów reakcje prowadzono w reaktorze mikrofalowym.

W kolejnej części pracy Pani mgr inż. Julita Pachla zajęła się określeniem wpływu rzędowości amin oraz obecności czwartorzędowych soli amoniowych na właściwości biologiczne liniowych poliamin. Do tego celu do badań stosowała dwa typy otrzymanych uprzednio polimerów, tj. L-PTMI_7k i L-PEI_4k, jako materiały odniesienia wykorzystwała niezmodyfikowane materiały. W celu otrzymania amin trzeciorzędowych prowadziła reakcje N-metylowania, natomiast czwartorzędowe grupy amoniowe otrzymywała w reakcji z jodometanem. Otrzymane polimery scharakteryzowała z wykorzystaniem analizy SEC oraz $^1\text{H NMR}$.

Niestety zarówno metylowanie, jak i częściowe czwartorzędowanie nie przyczyniło się poprawy właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Natomiast otrzymane polimery wykazywały znacznie mniejszą cytotoksyczność. Przeprowadzone modyfikacje okazały się mieć zróżnicowany wpływ na aktywność materiałów w testach z udziałem izolatów klinicznych.

Alternatywna modyfikacja badanych polimerów polegała na syntezie kopolimerów zawierających w swoim składzie jednostki PrOzi i MeOx. Hydroliza takich polimerów w warunkach kwasowych pozwoliła otrzymać kopolimery L-PTMI-co-PEI o masach cząsteczkowych w zakresie 7-9 kDa. Za względu na większą reaktywność PrOzi w stosunku do MeOx, otrzymane kopolimery miały strukturę gradientową. Okazało się, iż otrzymane kopolimery charakteryzowały się addytywnym efektem przeciwbakteryjnym, wynikającym z udziału poszczególnych jednostek w łańcuchu. W przypadku cytotoksyczności obecność jednostek L-PTMI powodowała spadek wartości IC_{50} , przy czym nie zaobserwowano liniowej zależności pomiędzy udziałem jednostek L-PTMI a stopniem zmiany wartości IC_{50} .

Dla tej grupy polimerów (PPrOzi_{50%}-co-PMeOx_{50%}) Pani mgr inż. Julita Pachla zbadała przebieg reakcji hydrolizy w środowisku kwaśnym w różnych temperaturach. Analogiczne badanie wykonała również dla homopolimerów PPrOzi, PMeOx i poli(2-metylo-2-oksazyny) (PMeOzi). Kinetykę procesu badała z wykorzystaniem analizy $^1\text{H NMR}$. Wykazała, że hydroliza jednostek PPrOzi zachodzi wolniej aniżeli jednostek PMeOx, zarówno w przypadku homopolimerów, jak i kopolimerów.

W tym miejscu rozprawy nasuwa się pytanie czy w przypadku kopolimerów, dla których stopień hydrolizy był mniejszy aniżeli 100%, można wnioskować, iż rozmieszczenie grup aminowych wzdłuż pojedynczego łańcucha jest gradientowe, mając na uwadze gradientową strukturę badanych kopolimerów?

Wyselekcjonowane z tej grupy kopolimery po ich częściowej hydrolizie i scharakteryzowaniu za pomocą $^1\text{H NMR}$ oraz SEC, Pani mgr inż. Julita Pachla poddała badaniom aktywności biologicznej. Celem tej analizy było wyznaczenie progowej wartości liczby grup zhydrolizowanych, powyżej której materiał wykazuje istotną

aktywności przeciwdrobnoustrojową. Jednocześnie ważnym było określenie zawartości jednostek PrOzi, niezbędnych do zachowania odpowiednio niskiej cytotoksyczności materiału. Dla wybranych układów testowych cel został osiągnięty, Pani mgr inż. Julita Pachla wytypowała zawartość grup aminowych niezbędnych do osiągnięcia dobrych właściwości przeciwdrobnoustrojowych przy jednocześnie niskiej cytotoksyczności.

Wobec powyższego proszę o komentarz czy wyznaczone wartości procentowe odnoszące się do zawartości poszczególnych jednostek należy traktować jako wartości uniwersalne, niezależne od ciężaru cząsteczkowego polimerów?

Dysertację zamyka podsumowanie całej pracy, w którym Pani mgr inż. Julita Pachla w sposób bardziej skondensowany odwołała się do swoich najistotniejszych osiągnięć. Należy podkreślić, iż opisane przez Panią mgr inż. Julitę Pachlę materiały są nowatorskie, a uzyskane wyniki dają dobre podstawy do dalszego rozwoju tego typu polimerów.

W mojej ocenie Pani mgr inż. Julita Pachla wykonała sumienną pracę eksperymentalną, która niewątpliwie ma charakter interdyscyplinarny. To wymagało od niej dogłębnej wiedzy z zakresu chemii, fizyko-chemii polimerów, jak również biologii. Uzyskane wyniki stawiają przed czytelnikiem wiele interesujących pytań, które niewątpliwie umożliwią dalszy rozwój tego obszaru tematycznego.

W swoim dorobku Pani mgr inż. Julita Pachla ma 2 publikacje, które wchodzą w skład rozprawy, które ukazały się w czasopismach o dużym współczynniku IF; jest w nich pierwszym autorem. Ponadto jest również współautorem 2 innych publikacji w renomowanych czasopismach. Jest to bardzo dobry dorobek na tym etapie drogi zawodowej.

Uznaję zatem, iż przedstawiona praca w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w Ustawie „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Julity Pachli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

