

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS



ul. Pawińskiego 5a
02-106 Warszawa
Tel. Standard: 659-70-72
658.. ..

Prof. Dr hab. Joanna Rytka
Zakład Genetyki
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

Warszawa 24-08-2018

Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Emila Palucha

pt. „Biologiczna aktywność nowo zsyntetyzowanych kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych wobec wybranych mikroorganizmów”

Przedstawiona do oceny praca była wykonywana w Zakładzie Fizykochemii Drobnoustrojów Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotorem pracy jest dr hab. Ewa Obłąk.

Przedstawiona do oceny praca wpisuje się w cykl badań prowadzonych pod kierunkiem dr hab. Ewy Obłąk nad biologiczną aktywnością czwartorzędowych soli amoniowych o różnej strukturze chemicznej (monomeryczne, gemini i wielofunkcyjne), które zaowocowały licznymi pracami opublikowanymi w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej oraz pracą doktorską Agaty Piecuch (2016).

Nie można przecenić znaczenia prowadzonych badań. Związki powierzchniowo-czynne, do których należą surfaktanty, są jedną z kluczowych grup związków chemicznych syntetyzowanych, badanych i stosowanych praktycznie we wszystkich gałęziach przemysłu i w codziennym życiu. Obecnie światowa produkcja surfaktantów wynosi około 18 mln ton rocznie i przewiduje się, że jej wartość w 2018 roku osiągnie 30,7 mld USD. Coraz bardziej wymagający jest rynek surfaktantów, obecnie poszukuje się związków aktywnych w niskich stężeniach, a przy tym biodegradowalnych.

Badania prowadzone w zespole dr hab. Ewy Obłąk we współpracy z Wydziałem Chemicznym Politechniki Wrocławskiej skierowane są na wykorzystanie surfaktantów pochodnych soli amoniowych w skonstruowaniu nowej klasy związków (lub leków) przeciwdrobnoustrojowych. Jest to palący ogólnie światowy problem, ponieważ wiele powszechnie stosowanych antybiotyków, w tym nawet tzw. antybiotyki ostatniej szansy takie jak wankomycyna czy kolicyna tracą skuteczność działania wobec nabywających oporność bakterii.

Do związków niespokrewnionych z antybiotykami o bójącym działaniu wobec drobnoustrojów należą czwartorzędowe sole amoniowe (CSA). Na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej

zaprojektowano i zsyntetyzowano nowe dimeryczne sole tzw. CSA gemini. Przetestowanie aktywności biologicznej tych związków, wykazanie efektywności ich działania zależnie od struktury chemicznej było głównym zadaniem mgr Agaty Piecuch. Przedmiotem badań mgr. Emila Palucha były kationowe surfaktanty wielofunkcyjne (KSW), pochodne czwartorzędowych soli amoniowych (CSA) oraz dimetyloaminy, które zostały zsyntezowane na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem Pani Profesor Kazimiery A. Wilk. Badania zaplanowano w oparciu o dotychczasowe wyniki opisane w literaturze i badania własne zespołu prof. Kazimiery A. Wilk i profesor Ewy Obłąk.

Ocena sposobu przedstawienia pracy

Rozprawa doktorska mgr Emila Palucha zawiera 10 następujących rozdziałów: **Wstęp**, który poprzedza wykaz skrótów użytych w pracy, spis tabel, rysunków, wykresów i zdjęć, **Cel pracy**, **Materiały**, **Metody**, **Wyniki**, **Dyskusja**, **Podsumowanie**, **Literatura**, **Abstract**, **Dorobek naukowy**. Całość rozprawy obejmuje 195 stron.

Wstęp

Obszerny wstęp (52 strony), opracowany na podstawie bogatego i aktualnego piśmiennictwa, świadczy o bardzo dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktoranta do realizacji podjętego tematu pracy.

Wstęp składa się z czterech głównych podrozdziałów. W pierwszym podrozdziale Autor opisał strukturę i klasyfikację surfaktantów, szczególną uwagę poświęcając kationowym surfaktantom wielofunkcyjnym, zwłaszcza ich biologicznej aktywności i możliwości zastosowania w medycynie. W drugim podrozdziale Doktorant przedstawił dane literaturowe dotyczące właściwości biofilmów i metod ich zwalczania. Trzeci podrozdział obejmuje charakterystykę wybranych do badań bakterii *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz grzybów *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae*. Czwarty podrozdział przedstawia możliwości wykorzystania drożdży *S. cerevisiae* jako modelowego organizmu w badaniu molekularnych mechanizmów działania kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych.

Cel pracy

Cel pracy został jasno sformułowany, jest nim określenie biologicznej aktywności nowo zsyntezowanych kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych, pochodnych dimetyloaminy oraz czwartorzędowych soli amoniowych. Doktorant przedstawił trzy konkretne zadania badawcze, które konsekwentnie realizował.

Materiały

W tym rozdziale przedstawiono strukturę i charakterystykę chemiczną badanych surfaktantów, spis stosowanych szczepów bakteryjnych i grzybowych oraz opisy wykorzystanych podłoży mikrobiologicznych, buforów i barwników.

Metody

Ten rozdział zawiera szczegółowo opisane stosowane procedury, które zostały prawidłowo dobrane do postawionych zadań badawczych.

Wyniki

Część doświadczalna pracy (66 stron) obejmuje trzynaście podrozdziałów. Ta część pracy zwraca uwagę logicznym zaplanowaniem i dokładnością wykonania eksperymentów.

Wyniki doświadczeń zostały zestawione w tabelach, w postaci wykresów, diagramów lub zdjęć mikroskopowych. Zgodnie z zadaniami przedstawionymi w rozdziale **Cel pracy** Doktorant wyznaczył dla ośmiu kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych pochodnych czwartorzędowych soli amoniowych i dimetyloaminy minimalne stężenia hamujące wzrost i bójcze dla wybranych bakterii i grzybów. Do dalszych eksperymentów Doktorant wybrał najsilniej działające surfaktanty o 14-to i 16-to węglowych łańcuchach alkilowych i sprawdził ich wpływ na adhezję szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* oraz *Candida albicans* do powierzchni polistyrenowej, metalowej, silikonowej i szklanej. Wykazał, że największą aktywność przeciwadhezyjną badanych surfaktantów obserwowano na powierzchni metalowej. W kolejnych eksperymentach mgr Paluch badał wpływ wybranych kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych na tworzenie oraz eradykację biofilmów przez szczepy *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* oraz *C. albicans* na powierzchni polistyrenowej. Wyniki tej serii doświadczeń wskazują na najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wybranych kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych (związków z 14- i 16-węglowym łańcuchem alkilowym w porównaniu do surfaktantów z 10- i 12- węglowym łańcuchem hydrofobowym) zarówno wobec form planktonicznych, jak i biofilmowych, przy czym związki te wykazują silniejsze działanie wobec komórek grzybów niż bakterii. Z kolei pochodne dimetyloaminy wykazują większą zdolność do redukcji biofilmu tworzonoego przez badane drobnoustroje niż pochodne czwartorzędowej soli amoniowej. Pochodne dimetyloaminy nie tylko wywołują znaczący spadek przeżywalności komórek w biofilmie *C. albicans*, ale też prowadzą do zahamowania procesów filamentacji tego grzyba.

Inną serię badań stanowią doświadczenia zmierzające do poznania mechanizmów grzybobójczego działania kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych. Obiektem badań były drożdże *C. albicans* i *S. cerevisiae*. Sprawdzano wpływ wybranych związków na ciągłość błon komórkowych i wewnątrz komórkowy transport lipidów, a także ich wpływ na zawartość nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych, ergosterolu i lanosterolu w błonach komórkowych *S. cerevisiae*. Okazało się, że badane surfaktanty powodowały niewielkie zmiany w stosunku nienasyconych do nasyconych kwasów tłuszczowych, przy czym pochodne dimetyloaminy i czwartorzędowe sole działały różnie. Podobnie zmianie ulegała zawartość ergo- i lano-sterolu. **Moim zdaniem obserwowane zmiany w składzie lipidowym błon i kropli lipidowych nie są bardzo znaczące. Również zmiany morfologii komórek wprawdzie widoczne nie są dramatyczne.** Spektakularna natomiast jest indukcja stresu oksydacyjnego w komórkach drożdży, zwłaszcza pod wpływem dimetyloaminy o 14-to węglowym łańcuchu alkilowym.

W związku z planowanymi badaniami w kierunku wykorzystania kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych, pochodnych CSA i pochodnych dimetyloaminy jako nośników genów i leków wykazano ich zdolność do formowania miceli i kondensacji DNA. Niestety kolejne doświadczenia

wykazały, że badane związki są cytoto- i genotoksyczne, a związki z 16-węglowym łańcuchem alkilowym są mutagenne. Natomiast pochodne dimetyloaminy wykazują silne właściwości hemolityczne.

Dyskusja

Konsekwentna i logiczna **dyskusja** wyników jest przeprowadzona w oparciu o dane literaturowe i podobnie jak wstęp świadczy o dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktoranta. Interpretacja wyników nie budzi zastrzeżeń. Interesujące są propozycje Autora w odniesieniu do eksperymentów, które pozwoliłyby na bardziej szczegółowe rozwiązywanie problemów molekularnych mechanizmów działania kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych istotnych zwłaszcza dla podjętych badań nad wykorzystaniem tych związków jako nośników DNA i/lub leków w procesie transfekcji.

Podsumowanie

Najważniejsze osiągnięcia Autora obrazuje 13 zwięzłych i ważnych wniosków. W punkcie 5-tym „Kationowe surfaktanty wielofunkcyjne mają zdolność do hamowania produkcji czynników wirulencji przez *P. aeruginosa*, w szczególności piowerdyny” dodałabym **do nieznacznego hamowania.**

Moim zdaniem zabrakło stwierdzenia, że wybrane kationowe surfaktanty wielofunkcyjne są w stanie wydajnie formować micelle.

Literatura

Spis zawiera 272 pozycji literaturowych.

Abstract

Abstract jest krótkim streszczeniem w języku angielskim założeń i wyników pracy.

Dorobek naukowy

Na podkreślenie zasługuje fakt, że część wyników przedstawionej do oceny pracy została opublikowana. Mgr Emil Paluch jest współautorem prac:

Paluch E., Piecuch A., Obłąk E., Lamch Ł., Wilk K. Antifungal activity of newly synthesized chemodegradable dicephalic-type cationic surfactants. *Colloids and surfaces: biointerfaces* vol. 164 p.34-41 2018.

Piecuch A., Lamch Ł., **Paluch E.,** Obłąk E., Wilk K. Biofilm prevention by dicephalic cationic surfactants and their interactions with DNA, *Journal of Applied Microbiology* vol. 121 p.682-692 2016.

Publikacja - Książczyk M., Kuczkowski M., Dudek B., Korzekwa K., Tobiasz A., Korzeniowska-Kowal A., **Paluch E.,** Wieliczko A., Bugła-Płoskońska G. Application of routine diagnostic procedure, VITEK 2 Compact, MALDI-TOF MS and PCR assays in identification procedure of bacterial strain with ambiguous phenotype, *Current Microbiology* vol. 72 p.570-582 2016. 194 zawiera wyniki pracy magisterskiej Doktoranta.

Mgr Paluch wyniki swojej pracy prezentował na pięciu międzynarodowych konferencjach oraz ośmiu konferencjach krajowych. Był beneficjentem wewnętrznego grantu UWr. „Młodych

Naukowców” w ramach dotacji docelowej na prowadzenie badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców i doktorantów pt. „Mechanizm działania kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych na komórki grzybów”.

Moje uwagi jako recenzenta mają charakter edytorski. Jako czytelnik odczuwałam brak bardziej szczegółowych podpisów pod tabelami i rysunkami oraz odniesień w rodzaju: jak wykazano w Tabeli lub na rysunku tak, jak omawia się wyniki w publikacjach.

Często pojawiały się sformułowania „syntetyzowano za pomocą inżynierii” zamiast prosto zsyntetyzowano. Rysunek 6 str. 25: Potencjalny model adhezji. Model nie jest potencjalny co najwyżej proponowany.

Str. 26 zakażenia jatrogenne i szpitalne - zakażenia jatrogenne należą do zakażeń szpitalnych.

Str. 43 Autor nazwał *Candida albicans* grzybem drożdżopodobnym - *C. albicans* tak jak drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* należy do rzędu *Saccharomycetes*.

Str. 45 „genom drożdży składa się z około 12,8 milionów par zasad, które obejmują 6 275 otwartych ramek odczytu ORF (z ang. *open reading frame*) zlokalizowanych na 16 chromosomach (przyjmuje się, że 5 800 stanowi miejsca ORF dla funkcjonalnych genów). Nie rozumiem co oznacza te 5800 miejsc.

Liczne są tzw. kalki językowe z angielskiego np. stężenia inhibujące - zamiast hamujące, leki się aplikuje a można po prostu podawać itp. Te uwagi to na przyszłość, gdyby Dr Emil Paluch pisał artykuły w języku polskim.

Podsumowując dobrane metody, przeprowadzone doświadczenia oraz uzyskane wyniki świadczą o dużej pomysłowości, pracowitości i dojrzałości naukowej mgr Emila Palucha. Badania zawarte w powyższej pracy umożliwiły poznanie biologicznej aktywności nowo zsyntetyzowanych kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych, pochodnych czwartorzędowych soli amoniowych oraz dimetyloaminy. W przeprowadzonych badaniach Doktorant wykazał właściwości przeciwbakteryjne oraz przeciwgrzybowe kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych, a także ich wpływ na adhezję wybranych patogenów oportunistycznych do różnych powierzchni. Określił zależności między strukturą chemiczną związków a efektem ich działania. Uzyskane wyniki wskazują, że działanie kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych może być związane z indukowaniem stresu oksydacyjnego oraz zaburzeniami w strukturze błon komórkowych.

Kończąc moja opinię stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa w pełni spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie magistra Emila Palucha do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof.Dr hab. Joanna Rytka

