UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Dr hab. Marcin Mączyński, prof. uczelni

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Damiana Neubauera

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

pt. **„SYNTEZA I BADANIE AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ LINIOWYCH ORAZ CYKLICZNYCH LIPOPEPTYDÓW"**

Problem lekooporności na stosowane leki jest coraz bardziej narastający. W związku z pojawieniem się szczepów opornych Światowa Organizacja Zdrowia opublikowała w 2017 roku listę patogenów stanowiących poważny problem kliniczny. Antybiotykami tak zwanej ostatniej szansy są lipopeptydy wytwarzane przez mikroorganizmy – polimyksyny i deptomycyna, ale widoczna jest już tendencja do narastania na nie oporności. Z tego powodu konieczne są badania prowadzące do powstania nowych i skutecznych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Jedną z tych grup stanowią krótkie kationowe lipopeptydy (USCLs), które wykazują wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową uszkadzając błonę komórkową dzięki występowaniu oddziaływań elektrostatycznych z ujemnie naładowaną powierzchnią komórki patogenu prowadząc do jej śmierci. Niestety USCLs wykazują także znaczną cytotoksyczność i aktywność hemolityczną, dlatego konieczne są modyfikacje strukturalne, które między innymi zaproponował Doktorant, aby otrzymać związki bardziej bezpieczne. W tym kontekście podjęta w recenzowanej rozprawie doktorskiej tematyka, dotycząca wpływu modyfikacji strukturalnych krótkich kationowych lipopeptydów (USCLs) na aktywność biologiczną *in vitro* oraz synteza analogów o wyższej aktywności biologicznej, mniejszej cytotoksyczności i aktywności hemolitycznej jest jak najbardziej zasadna.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi monotematyczny cykl trzech publikacji eksperymentalnych, które zamieszczono na łamach czasopism o międzynarodowym

ul. Borowska 211A 50-556 Wrocław
T: +48 71 784 03 42 F: +48 71 784 03 41 marcin.maczynski@umed.wroc.pl www.umed.wroc.pl

zasięgu, takich jak *Molecules* (1 praca) i *International Journal of Molecular Sciences* (2 prace). Łączny współczynnik oddziaływania (IF) cyklu prac wynosi 12,379, a suma punktów MNiSW 380. We wszystkich trzech pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami określającymi indywidualny wkład wszystkich Współautorów, także autorem posiadającym największy udział procentowy co świadczy o bardzo dużym zaangażowaniu Doktoranta w ich powstanie. Zbiór omawianych i załączonych publikacji opatrzony jest opracowaniem, na który składają się, *problematyka i cele badawcze rozprawy doktorskiej* (wprowadzające czytelnika w zagadnienia związane z opisem, budową i syntezą krótkich kationowych lipopeptydów oraz celowością wyboru tematu badawczego), *podsumowanie* (rozdział wskazujący na nowatorstwo otrzymanych wyników prezentujący wpływ modyfikacji strukturalnych na aktywność biologiczną oraz potencjalne walory aplikacyjne), *wnioski* (rozdział w którym Doktorant wysunął najważniejsze wnioski ze swoich badań, potwierdzając tym samym założenia i cele badawcze, które sobie postawił), *literatura* (z której korzystał) oraz *dorobek naukowy* Doktoranta, składający się z 25 publikacji posiadających współczynnik wpływu IF, 5 publikacji spoza listy JCR oraz 5 wystąpień konferencyjnych w formie plakatu. Sumaryczny IF Doktoranta z dnia 10.05.2021 wynosi 84,490, suma punktów MNiSW wynosi 1670, liczba cytowani 198, a index Hirscha 9. Niestety dane bibliometryczne nie zostały potwierdzone przez Bibliotekę Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego co w opinii Recenzenta powinno być obowiązkowe.

Przedmiotem dysertacji doktorskiej były badania przedstawione w trzech publikacjach. Publikacja 1 (*Molecules 2020*) przedstawia zbadanie wpływu poszczególnych modyfikacji strukturalnych krótkich kationowych lipopeptydów na wykazywaną przez nie aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz zaprojektowanie i syntezę liniowych analogów USCLs. Badania przeprowadzone przez Doktoranta polegały na modyfikacji zarówno hydrofobowego jak i hydrofilowego fragmentu cząsteczki, modyfikacji długości oraz struktury reszty kwasu tłuszczowego, zmieniono sekwencję aminokwasową oraz strukturę fragmentu peptydowego. Doktorant zbadał także wpływ charakteru *N*-końcowej reszty aminokwasowej lipopeptydu, długość i strukturę łańcucha kwasu tłuszczowego na hydrofobowość, aktywność przeciwdrobnoustrojową na szczepy ESKAPE oraz hemolizę. Mgr Damian Neubauer otrzymał związki o większej aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz o zmniejszonym potencjale hemolitycznym (wyższej selektywności) w odniesieniu do serii związków wyjściowych o zbliżonej hydrofobowości.

Wyniki przedstawione w pracy 1 posłużyły do zaplanowania i wykonania badań przedstawionych w pracy 2 i 3. Mgr Damian Neubauer w pracy 2 (*Int. J. Mol. Sci.* 2021)

przedstawił badania i wyniki, które polegały na zaprojektowaniu i syntezie serii dimerycznych lipopeptydów będących odpowiednikami USCLs z dwoma resztami L-argininy. Jako łącznika Doktorant zastosował amid L-lizyny oraz diamid L-cystyny, a także użył kwasy tłuszczowe o różnej długości łańcucha węglowego i różnej strukturze chemicznej. Doktorant przedstawił wyniki badań hydrofobowości związków, określił krytyczne stężenie agregacji, wartość MIC oraz minimalne stężenie eradykujące biofilm w odniesieniu do szczepów referencyjnych bakterii z grupy ESKAPE i grzybów z rodzaju *Candida*, cytotoksyczność w stosunku do linii komórkowej HaCaT oraz hemolizę. Wybrane związki Doktorant poddał badaniom stabilności w surowicy i przeprowadził symulacje oddziaływań z błonami komórkowymi z wykorzystaniem dynamiki molekularnej. Z przeprowadzonych badań wynika, że zastosowanie rozgałęzionego kwasu tłuszczowego korzystnie wpływa na aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz selektywność działania wobec komórek patogenów w porównaniu do USCLs, które zawierają prosty łańcuch kwasu tłuszczowego.

W pracy 3 (*Int. J. Mol. Sci. 2020*) Doktorant wykonał syntezę cyklicznych lipopeptydów, zastosował L-norleucynę, L-fenyloalaninę i skrócił długość łańcucha węglowego w reszcie kwasu tłuszczowego. Mgr Damian Neubauer otrzymał serię cyklicznych USCLs używając reszty L-cysteiny, pomiędzy którymi utworzyło się wiązanie disulfidowe. Autor zsyntezował także serię związków, w której zamienił resztę L-lizyny na resztę L-argininy. Zaproponowane przez Doktoranta modyfikacje strukturalne pozwoliły szczegółowo opisać wpływ zastosowanych modyfikacji na właściwości związków i zaowocowały powstaniem analogów o wyższych właściwościach przeciwbakteryjnych i obniżonej toksyczności wobec komórek ludzkich.

Najważniejsze wnioski przedstawione przez Doktoranta, które wynikają z przeprowadzonych badań dotyczą zależności pomiędzy strukturą USCLs a aktywnością przeciwbakteryjną przytoczyłem poniżej:

- analogi USCLs zawierające dwie reszty L-argininy mają zwiększoną aktywność przeciwdrobnoustrojową,
- analogi USCLs z krótszym łańcuchem węglowym kwasu tłuszczowego i jednocześnie wstawioną hydrofobową resztą aminokwasową mają zmniejszoną aktywność hemolityczną,
- analogi dimeryczne USCLs zawierające jako łącznik diamid L-cystyny oraz amid L-lizyny mają wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową i większą selektywność niż ich liniowe odpowiedniki, a rodzaj łącznika nie wpływa istotnie na kinetykę permeabilizacji błon komórkowych i na stabilność w surowicy ludzkiej,

- zamiana reszt L-lizyny resztami L-argininy w cyklicznych analogach USCLs prowadzi do obniżenia ich aktywności hemolitycznej, ale cykliczne analogi USCLs mają wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec szczepów Candida i mniejszą cytotoksyczność w stosunku do linii komórkowych HaCaT i HeLa,

oraz założeń, że:

- aktywność przeciwdrobnoustrojowa, cytotoksyczność i aktywność hemolityczna są związane z hydrofobowością USCLs oraz ładunkiem i strukturą poszczególnych fragmentów cząsteczki,
- otrzymane USCLs oddziałują z błoną komórkową powodując jej permeabilizację i depolaryzację,
-otrzymane USCLs wykazują wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do bakterii Gram (+) niż do Gram (-) zarówno w odniesieniu do biofilmu jak i form planktonowych.

Wyrazem nowatorskiego charakteru i naukowej wartości badań było opublikowanie ich wyników w renomowanych czasopismach o międzynarodowym zasięgu.

W przedstawionym opracowaniu znalazło się kilka błędów językowych i stylistycznych ale pragnę podkreślić, że mają one głównie charakter techniczny oraz redakcyjny, natomiast w żadnym stopniu nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

Mając na uwadze oryginalność oraz wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pana mgr Damiana Neubauera pt. „SYNTEZA I BADANIE AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ LINIOWYCH ORAZ CYKLICZNYCH LIPOPEPTYDÓW", przedstawionej w formie monotematycznego cyklu prac stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane dysertacjom doktorskim określone w art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki jak również w §6 ust. 3 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789). Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Damiana Neubauera do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a także wnioskuję o jej wyróżnienie.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII ORGANICZNEJ
kierownik

dr hab. Marcin Mączyński, profesor uczelni

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Wydział Farmaceutyczny
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII ORGANICZNEJ
ul. Borowska 211 A, 50-556 Wrocław
tel. 71 784 03 40, faks: 71 784 03 41

Pieczątka jednostki organizacyjnej recenzenta

MARCIN MĄCZYŃSKI

Imię i nazwisko recenzenta

DR HAB, PROFESOR UCZELNI

Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko doktoranta: MGR INŻ. DAMIAN NEUBAUER

Tytuł pracy doktorskiej: „SYNTEZA I BADANIE AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ LINIOWYCH ORAZ CYKLICZNYCH LIPOPEPTYDÓW."

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszy zwracam się z wnioskiem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie:

Po dokładnej analizie i przedstawieniu recenzji stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagane stawiane tego typu pracom zgodnie z zasadami zgłaszania prac doktorskich (decyzja RW WF z OHL 16.09.2014).
Praca prezentuje szerokie pole naukowe, szerokie tematy i jakość badań syntetycznych, biologicznych i fizykochemicznych. Zastosowane nowoczesne i metody badawcze cechuje oryginalność i ich dobre zastosowanie, a treści zawarte prezentują dużo danych poznawczo i możliwości aplikacyjne.
W związku z powyższym wnioskuję o jej wyróżnienie.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII ORGANICZNEJ
Kierownik

dr hab. Marcin Mączyński, profesor uczelni