Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Farmakodynamiki
ul. Banacha 1b, 02-097 Warszawa

dr hab. n. med. i n. zdr. inż. Patrycja Kleczkowska

(+48 22) 116 61 26; E-mail: patrycja.kleczkowska@wum.edu.pl

Warszawa, dn. 8.07.2021 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Damiana NEUBAUERA
pt. „Synteza i badanie aktywności biologicznej liniowych i cyklicznych lipopeptydów"

Przedstawiona do oceny praca doktorska zatytułowana **„Synteza i badanie aktywności biologicznej liniowych i cyklicznych lipopeptydów"** stanowi cykl 3 oryginalnych publikacji naukowych, które dotyczą wpływu modyfikacji strukturalnych krótkich (<7 reszt aminokwasowych) kationowych lipopeptydów oraz kationowych surfaktantów *gemini* na ich aktywność mikrobiologiczną z jednoczesnym osiągnięciem wymaganego profilu bezpieczeństwa w aspekcie cytotoksyczności oraz właściwości hemolitycznych.

Oceniania rozprawa doktorska liczy 60 stron, w której zamieszczone zostały odpowiednio streszczenie w języku polskim i angielskim (str. 4 i 5), wykaz skrótów i akronimów (str. 6 i 7), lista publikacji wchodzących w skład dysertacji wraz ze wskazaniem współczynnika oddziaływania *Impact Factor* i punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki. Doktorant w swojej pracy prezentuje problematykę badawczą i podjęte cele, które dalej wraz z zastosowaną metodyką i uzyskanymi wynikami charakteryzuje we właściwie zdefiniowanych i jasnych dla czytelnika podrozdziałach (str. 9-36). Dysertację kończą rozdziały „Podsumowanie" (str. 37-40) i „Wnioski" (str. 41) oraz spis obszernego piśmiennictwa liczącego 141 pozycji literaturowych.

Jako główny cel pracy Doktorant postawił sobie nie tylko syntezę i ocenę aktywności biologicznej nowych związków, ale przede wszystkim szczegółowe zweryfikowanie wpływu modyfikacji wprowadzonych w strukturę cząsteczki danego związku. Ponadto w pracy zastosowano techniki mikroskopii fluorescencyjnej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej celem wizualizacji potencjalnych zmian w komórce drobnoustroju w wyniku ekspozycji na zsyntetyzowany lipopeptyd. Co istotne, działanie to stanowi doskonałe

preludium do zbadania mechanizmu działania przeciwdrobnoustrojowego nowych lipopeptydów o odmiennej strukturze.

We wstępie dysertacji, Doktorant w sposób zwięzły, aczkolwiek wyjątkowo precyzyjny przedstawił uzasadnienie podjętej tematyki oraz celu pracy. W tym miejscu wartym zwrócenia jest fakt, iż Doktorant doskonale prezentuje zarówno definicję lipopeptydów, koncentrując się na różnorodności form strukturalnych ww. związków, jak również przedstawia informacje dotyczące potencjalnych właściwości fizykochemicznych i biologicznych, tym samym wskazując ich możliwe zastosowanie terapeutyczne. Charakteryzując natomiast dostępne w praktyce klinicznej antybiotyki lipopeptydowe – damptomycynę oraz polimyksynę jako struktury bazowe dalej zaprojektowanych i syntezowanych przez mgr Damiana Neubauera m.in. krótkich kationowych lipopeptydów i szczegółowo wprowadzając czytelnika w zależność aktywności cząsteczki związku od jego struktury, Autor prezentuje jednocześnie zarys wymagań, które muszą być spełnione w przypadku projektowania ww. związków.

Wspomniane we wstępie informacje pozwoliły Doktorantowi na przyjęcie założeń i podjęcie działań niezbędnych do zaprojektowania biblioteki nowych potencjalnych antybiotyków, dla których przeprowadzono liczne badania.

Pracę eksperymentalną Doktorant podzielił na kilka poszczególnych części/etapów ściśle ze sobą połączonych, opierając się głównie na typie prowadzonych modyfikacji strukturalnych w cząsteczce związku, tj. analiza fragmentu hydrofobowego lipopeptydu, wpływ dodatkowej *N*-końcowej reszty aminokwasowej, cyklizacja oraz dimeryzacja lipopeptydu, również z wykorzystaniem wiedzy zdobytej w trakcie wykonywania poprzednich etapów badań.

Istotnie, w pierwszej z prac (Neubauer et al. Molecules 2020; 25: 257) stanowiących przedmiot dysertacji, mgr Damian Neubauer skupił swoje działania na szczegółowej analizie hydrofobowego elementu cząsteczki – krótkiego kationowego lipopeptydu, będącego liniowym bądź rozgałęzionym kwasem tłuszczowym, jak kwas kaprynowy (C10:0), palmitynowy (C16:0), kwas etyloheksanowy czy kwas 2-butylooktanowy. Dodatkowej weryfikacji i ocenie została poddana substytucja związku ze wskazanym kwasem tłuszczowym *N*-końcową resztą aminokwasową. Co ważne, umyślne zastosowanie przez Doktoranta różnorodnej gamy reszt aminokwasowych miało na celu wskazanie rangi obecności innych elementów w cząsteczce związku (m.in. liczby wiązań wodorowych, aromatyczności, ładunku wypadkowego), które mogłyby mieć odzwierciedlenie w jej konformacji i dalej wpłynąć na aktywność biologiczną. Tak zaprojektowane i syntetyzowane na fazie stałej związki w ilości 105 poddane zostały badaniom w kierunku określenia hydrofobowości, jako że – jak wskazuje Doktorant w pracy – aktywność przeciwdrobnoustrojowa krótkich kationowych lipopeptydów jest silnie uwarunkowana zdolnością struktury do odpychania od siebie cząsteczek wody. Z kolei w dalszej części doświadczenia Autor przeprowadził badania w kierunku określenia

właściwości przeciwdrobnoustrojowych związków wobec wybranych szczepów bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz grzybów z rodzaju *Candida* (wartości MIC). Dodatkowo Doktorant podjął działania dotyczące wstępnego określenia właściwości składających się na pojęcie toksyczności związku, tj. w tym przypadku właściwości hemolitycznych.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorant wykazał, iż długość łańcucha węglowego kwasu tłuszczowego, podobnie jak jego typ - liniowy *vs.* rozgałęziony - odgrywają istotną rolę w osiągnięciu wymaganych bądź co najmniej zadowalających aktywności przeciwdrobnoustrojowych. Przykładowo, skrócenie łańcucha do C12 z jednoczesnym wprowadzeniem *N*-końcowo zlokalizowanej reszty aminokwasowej prowadzi do większej selektywności związku względem komórek patogenów i aktywności biologicznej w porównaniu do krótkich kationowych lipopeptydów zawierających relatywnie dłuższe łańcuchy kwasów tłuszczowych (np. C16 i wyżej). Podobnie, zastosowanie kwasów tłuszczowych o rozgałęzionych łańcuchach może w konsekwencji prowadzić do uzyskania lipopeptydów aktywniejszych mikrobiologicznie aniżeli ich liniowe analogi. Co istotne, Doktorant potwierdził, że hydrofobowość związku zależy od długości łańcucha kwasu tłuszczowego. Ponadto ten sam element strukturalny okazał się mieć wpływ na właściwości hemolityczne nowo zsyntezowanych związków.

Obok istoty rodzaju kwasu tłuszczowego w cząsteczce lipopeptydu, Doktorant wskazał także wymiar charakteru zastosowanych reszt aminokwasowych, stwierdzając np. że substytucja aminokwasami zawierającymi ugrupowania kwasowe (Asp, Glu) skutkuje obniżeniem aktywności przeciwdrobnoustrojowej związku, podczas gdy reszty o charakterze zasadowym prowadzą do poprawy aktywności z jednoczesnym wzrostem selektywności ich działania.

W drugiej części wykonywanych prac badawczych, składających się na kolejną zaprezentowaną w dysertacji publikację naukową (Neubauer et al. Int. J. Mol. Sci. 2021; 22: 3229), mgr Damian Neubauer w oparciu o poprzednio uzyskane wyniki zaprojektował i zsyntetyzował nowej klasy związki, tj. surfaktanty *gemini* złożone z przeanalizowanych uprzednio kwasów tłuszczowych, wzbogacone resztą argininy, które dalej poddał analizie w aspekcie wpływu rodzaju wprowadzonego *spacera*, tj. amidu lizyny *vs.* diamidu cystyny. Obok określenia hydrofobowości nowych struktur z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) i badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej, Doktorant dokonał także pomiaru napięcia powierzchniowego czy stężenia krytycznej agregacji (CAC), wskazując tym samym wartości stężeń, dla których możliwe jest tworzenie się agregatów premicelarnych. Podobnie, działania niepożądane rozszerzono o właściwości cytotoksyczne wobec linii prawidłowych keratynocytów (HaCaT). Autor przeprowadził również badania mające na celu określenie i) wpływu enzymów proteolitycznych obecnych w surowicy krwi na aktywność mikrobiologiczną surfaktantów

gemini względem szczepów *S. aureus*, *P. aureginosa* oraz *C. glabrata,* wskazując wartości minimalnego stężenia inhibującego wzrost komórek drobnoustroju (MIC); ii) stabilności enzymatycznej związków w surowicy z wykorzystaniem kwadrupolowej spektrometrii mas czasu przelotu; iii) aktywności antybiofilmu oraz w przypadku wybranych lipopeptydów, w zależności od ich stężenia i czasu inkubacji – przepuszczalności bakteryjnej błony wewnętrznej i zewnętrznej. W pracy zaprezentowano ponadto symulację potencjalnych interakcji mogących mieć miejsce między wybranym surfaktantem a błoną bakteryjną bakterii Gram-dodatnich stosując dynamikę molekularną z wykorzystaniem elementów takich pakietów oprogramowania, jak: AMBER czy GROMACS.

Jako jeden z pierwszych rezultatów przeprowadzonych przez Doktoranta badań było potwierdzenie hipotezy jakoby dimeryzacja lipopeptydów, tworząc ostatecznie surfaktanty *gemini*, korzystnie wpływała na ich aktywność biologiczną. Dodatkowo, bazując na wcześniejszych ustaleniach wynikających z pracy nr 1 wykazano, że struktury charakteryzujące się obecnością krótkiego rozgałęzionego kwasu tłuszczowego wraz z *N*-końcową hydrofobową resztą aminokwasową indukują zdecydowanie silniejszą selektywność oraz efekt przeciwdrobnoustrojowy obserwowany z równoczesnym działaniem proteaz surowicy krwi czy skierowany przeciwko biofilmowi bakteryjnemu.

Kolejnym istotnym odkryciem było zaprezentowanie diamidu L-cystyny jako *spacera* bardziej korzystnego w aspekcie właściwości cytotoksycznych i hemolitycznych w porównaniu z dimerami zawierającymi amid lizyny, pomimo braku wpływu na aktywność przeciwdrobnoustrojową i stabilność w surowicy, ale nie działanie przeciwdrobnoustrojowe w obecności dodatku do medium hodowlanego określonego stężenia surowicy. Natomiast analizując wyniki badań przeprowadzonych w kierunku określenia zdolności permabilizacji błony komórkowej bakterii *E. coli*, mgr Damian Neubauer wykazał, że wszystkie wybrane związki posiadają tę zdolność.

Posiłkując się informacjami dotyczącymi możliwości zwiększenia stabilności enzymatycznej antybiotyków lipopeptydowych na degradacyjne działanie enzymów poprzez wprowadzenie do łańcucha peptydowego np. wiązania disulfidowego, w ostatniej pracy (Neubauer et al. Int. J. Mol. Sci. 2021; 21: 7208) wchodzącej w skład zaprezentowanej do oceny dysertacji, Doktorant prezentuje potencjał terapeutyczny (przeciwdrobnoustrojowy) lipopeptydów jednak charakteryzujących strukturą cykliczną. W tym przypadku jako związek wyjściowy zastosowano liniowy koniugat kwasu palmitynowego C16-KKKK-NH_2, który poddano następującym modyfikacjom: 1) cyklizacja łańcucha typu „głowa-ogon"; 2) redukcja reszt L-lizyny; 3) redukcja reszt L-lizyny z jednoczesną cyklizacją łańcuch poprzez wprowadzenie mostka disulfidowego; 4) substytucja reszty L-lizyny dodatnio naładowaną resztą L-argininy w zależności od miejsca, zarówno dla liniowych, jak i cyklicznych form lipopeptydów.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że wszystkie z badanych struktur wykazywały aktywność przeciwdrobnoustrojową. Porównując otrzymane związki pod względem ich struktury zauważono, że cyklizacja prowadziła do uzyskania podobnej aktywności wobec szczepów Gram-dodatnich. W przypadku natomiast bakterii Gram-ujemnych, te okazały się być bardziej oporne na lipopeptydy niż bakterie Gram-dodatnie i grzyby, co potwierdziło wcześniejsze badania nad lipopeptydami, prowadzone przez grupę Profesora Kamysza. Dodatkowo, lipopeptydy cykliczne wykazywały zauważalnie niższą aktywność przeciwdrobnoustrojową niż analogi liniowe (nawet czterokrotnie). Wartości MIC lipopeptydów wobec szczepów Gram-ujemnych mieściły się w zakresie od 8 do 512 μg/ml. Autor wykazał również, że wprowadzenie w strukturę związku reszty argininy skutkuje obniżeniem aktywności przeciwdrobnoustrojowej, zwłaszcza w przypadku analogów cyklicznych i względem bakterii *P. aureginosa*. Analizując z kolei aktywność przeciwgrzybiczą mgr Damian Neubauer stwierdził, że podstawienie lizyny resztą(ami) argininy indukuje efekt zależny od pozycji substytucji.

Nowe zsyntetyzowane struktury cykliczne krótkich kationowych lipopeptydów okazały się ponadto posiadać zdolność do eradykacji biofilmu szczepów *Candida* zdecydowanie silniej niż w przypadku analogów liniowych, jednak poza związkami o ładunku wypadkowym +3, wskazując ponownie na powagę tego elementu.

Interesującym wynikiem było wskazanie wszystkich zaprojektowanych i zsyntetyzowanych w ramach pracy cyklicznych krótkich kationowych lipopeptydów jako związków o istotnie zredukowanych właściwościach cytotoksycznych względem linii prawidłowych keratynocytów (HaCaT) czy ludzkiej linii komórkowej gruczolakoraka szyjki macicy (HeLa S3) w porównaniu do struktur liniowych. Natomiast wpływ cyklizacji na hemolizę wydaje się być zależny od lokalizacji reszt(y) argininy.

Zaletą tej części omawianej pracy mgr Damiana Nuebauera jest fakt zastosowania techniki mikroskopii fluorescencyjnej (FM) i transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) celem wizualizacji zaburzeń komórek *Candida,* indukowanych działaniem wybranych lipopeptydów cyklicznych. Przeprowadzone badania pozwoliły wysunąć wniosek, że żaden z cyklicznych koniugatów peptydów nie powodował uszkodzenia ściany komórkowej, przeciwnie – miały miejsce rozpad cytoplazmy i organelli komórkowych.

Reasumując, podjęta przez Doktoranta tematyka pracy w pełni wpisuje się w aktualne kierunki badań współczesnej chemii medycznej, ale także farmakologii. Ponadto ma ogromne znaczenia poznawcze i stanowi doskonałe źródło wiedzy, które dalej może być skutecznie wykorzystane w projektowaniu nowych efektywnych i bezpiecznych związków lipopeptydowych o wymaganych właściwościach fizykochemicznych i aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Na szczególna uwagę zasługuje również dorobek naukowy Doktoranta, gdzie obok nagród i stypendiów, jak również udziału w wielu konferencjach i sympozjach naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym, mgr Damian Neubauer jest autorem lub współautorem 25 publikacji z listy czasopism Journal Citation Report oraz 5 publikacji spoza listy JCR, przy czym całkowity *Impact Factor* osiągnięty przez Autora wynosi 84,90, zaś Indeks Hirscha H = 9. Wprawdzie Doktorant jedynie w 7 z prac jest pierwszym autorem, nie umniejsza to jednak ogromu pracy naukowej, jego wszechstronności i zaangażowaniu w samorozwój. Istotnie bowiem Doktorant musiał wykazać się nie tylko dobrymi podstawami teoretycznymi, ale również doświadczeniem w pracach syntetycznych, analitycznych i biologicznych.

Z kolei mając na uwadze niniejszą dysertację, chciałabym zauważyć, że wyniki badań ją stanowiących zostały opublikowane w trzech publikacjach oryginalnych o łącznym współczynniku *Impact Factor* 12,379. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, zaś jego udział procentowy zdecydowanie wskazuje na wiodącą rolę zarówno w opracowaniu koncepcji, wykonaniu badań, jak również w analizie i interpretacji uzyskanych wyników i ostatecznie postawieniu wniosków końcowych.

Pomimo, iż prace wchodzące w skład ocenianej rozprawy doktorskiej mgr Damiana Neubauera zostały już ocenione przez niezależnych ekspertów danego czasopisma, z obowiązku recenzenta mam kilka drobny uwag i pytań, choć i te ostatecznie nie mają wpływu na wysoką wartość merytoryczną niniejszej pracy. Niemniej jednak:

1. W pracy wskazano, iż wykonane zostały badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej surfaktantów *gemini* w obecności różnego stężenia surowicy ludzkiej w zależności od czasu inkubacji. W tym miejscu chciałabym zapytać, jakim kryterium kierował się Doktorant wybierając wskazane w pracy wartości stężenia surowicy? Ponadto proszę o informację co było powodem wyboru surowicy zamiast osocza? Dlaczego Doktorant nie wykonał badania porównawczego surowica *vs.* osocze mając na uwadze fakt, iż w obu przypadkach mają miejsce istotne różnice w aspekcie rodzaju zaangażowania enzymów degradujących, które dalej mogą wpływać na trwałość czy aktywność biologiczną badanego związku.

2. Podobne uwagi tyczą się badań stabilności enzymatycznej w surowicy krwi (praca 2 i 3). Tu jednak dodatkowym istotnym elementem wydaje się wskazanie czasu połowicznego rozpadu badanych związków oraz potencjalnych produktów degradacji. Stąd moje pytanie czy Doktorant dysponuje takimi wynikami?

3. Wybrane związki badane były pod kątem zdolności przenikania błony bakteryjnej *E. coli* w zależności od czasu. Dlaczego nie zastosowano w doświadczeniu zmiennego

parametru wartości pH, które samoistnie może wpływać na żywotność organizmu drobnoustroju?

4. W pracy charakteryzującej surfaktanty *gemini* (praca nr 2) w podrozdziale opisującym wyniki aktywności przeciwbakteryjnej w obecności określonego stężenia surowicy, Doktorant błędnie wskazuje, iż badania przeprowadzone były celem określenia wpływu wiązania lipopeptydu z białkami surowicy na jego aktywność przeciwdrobnoustrojową. Takie badania nie zostały przeprowadzone, natomiast w tekście wprowadzone zostały jedynie domniemania dot. obserwowanego spadku aktywności wraz ze wzrostem stężenia serum.
5. Czy według Doktoranta otrzymane rodzaje związków mogą być zastosowane w klinice? Jeśli tak, jaka byłaby preferowana droga podania?
6. W pracy odnaleźć można drobne błędy interpunkcyjne, np. „zarówno….., jak i".
7. Wydaje się poprawnym stwierdzenie „błona komórkowa grzyba" zamiast „błona grzybowa" (str. 36 dysertacji).

WNIOSEK KOŃCOWY

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Damiana Neubauera pt. *"Synteza i badanie aktywności biologicznej liniowych i cyklicznych lipopeptydów"* spełnia wymagania ustawowe dotyczące rozpraw doktorskich, określone przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020 r., poz. 85 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Damiania Neubauera do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze zaprezentowanie przez Doktoranta wysokiego poziomu merytorycznego, obszerny interdyscyplinarny zakres przeprowadzonych badań oraz publikowanie wyników pracy w formie trzech bardzo wartościowych publikacji, jak również istotne znaczenie poznawcze uzyskanych wyników, wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnieni rozprawy doktorskiej mgr Damiana Neubauera.

Zakład Farmakodynamiki

dr hab. n. med. inż. Patrycja Kleczkowska

WARSZAWSKI
UNIWERSYTET MEDYCZNY
Zakład Farmakodynamiki
02-097 Warszawa, ul. Banacha 1b
Tel. 22 116-61-26

Pieczątka jednostki organizacyjnej recenzenta

PATRYCJA KLECZKOWSKA
Imię i nazwisko recenzenta

DR HAB. N. MED. I N. OZDR. INŻ.; ADIUNKT
Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko doktoranta: DAMIAN NEUBAUER

Tytuł pracy doktorskiej: „SYNTEZA I BADANIE AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ LINIOWYCH I 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:

Magister Damian Neubauer reprezentował pracę stanowiącą źródło o istotnym znaczeniu poznawczym, dotyczącą w dobie trwającej lekooporności bakterii i innych drobnoustrojów.
Praca stanowiła ponadto cykl 3 oryginalnych publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach bardzo wysokich o wysokim współczynniku oddziaływania. Co ważne i warte podkreślenia w każdej z przedstawionych publikacji Doktorant jest pierwszym i korespondującym autorem.
Pan Mgr Damian Neubauer cechuje się ponadto dużym wkładem merytorycznym, ale również w zakresie opanowanych technik laboratoryjnych.

Zakład Farmakodynamiki

dr hab. n. med. inż. Patrycja Kleczkowska