

Prof. Dr hab. Joanna Rytka

Zakład Genetyki

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Piecuch

**pt. „Biologiczna aktywność czwartorzędowych soli amoniowych gemini wobec mikroorganizmów”**

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

W Zespole kierowanym przez dr hab. Ewę Obłąk prowadzone są badania nad zjawiskiem wielolekowej oporności i ściśle z tym związanym poszukiwaniem nowych związków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych. Są to bardzo ważne badania i na dowód pozwolę sobie w tym miejscu zacytować temat Światowego Dnia Zdrowia z 2011 roku: „W trakcie Światowego Dnia Zdrowia 2011 Światowa Organizacja Zdrowia będzie wzywać do działania na rzecz powstrzymania rozwoju oporności na antybiotyki. Światowa Organizacja Zdrowia wzywa wszystkich decydentów i projektantów systemów ochrony zdrowia, opinię publiczną i pacjentów, lekarzy, farmaceutów i przedstawicieli przemysłu farmaceutycznego do działania i odpowiedzialnej walki z lekoopornością”. Praca doktorska mgr Agaty Piecuch jest ściśle związana z tą tematyką.

Do związków niespokrewnionych z antybiotykami o bójącym działaniu wobec drobnoustrojów należą czwartorzędowe sole amoniowe (CSA) od wielu lat wykorzystywane między innymi jako środki dezynfekcyjne. Do nowej grupy pochodnych CSA należą ich dimeryczne formy tzw. CSA gemini, które charakteryzują się szerszym spektrum działania i zwiększoną aktywnością biologiczną w porównaniu do form monomerycznych.

W oparciu o wcześniejsze wyniki prac prowadzonych przez profesora Tadeusza M. Lachowicza i dr hab. Ewę Obłąk nad oddziaływaniem CSA na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej zaprojektowano i zsyntetyzowano 18 nowych soli CSA gemini. Przetestowanie aktywności biologicznej tych związków i wykazanie efektywności ich działania zależnie od struktury chemicznej było głównym zadaniem mgr Agaty Piecuch. Ponadto Doktorantka rozpoczęła badania nad molekularnym mechanizmem działania wybranych CSA gemini co ma istotne znaczenie dla ewentualnego wykorzystania tych związków jako nośników leków lub DNA w procesie transfekcji.

Przedstawiona do oceny dysertacja ma układ typowy dla prac eksperymentalnych i w jej skład wchodzi następujące rozdziały: Wprowadzenie, Wstęp, Cele pracy, Materiały, Metody, Wyniki,

Dyskusja, Wnioski, Spis Literatury (203 pozycje), Abstract w języku angielskim Ponadto jest ona zaopatrzona w listę źródeł finansowania badań prowadzonych w ramach prezentowanej rozprawy, spis publikacji powstałych w trakcie realizacji studiów doktoranckich z zaznaczeniem wkładu pracy Doktorantki, spis doniesień konferencyjnych i zgłoszeń patentowych oraz wykaz skrótów używanych w tekście. Praca liczy 154 strony.

**Rozdział II. Wstęp** stanowi dobre wprowadzenie do dalszych części pracy. Doktorantka przedstawiła w nim dotychczasowy stan wiedzy dotyczący struktury chemicznej, właściwości i występowania czwartorzędowych soli amoniowych (CSA) w przyrodzie oraz ich różnorodnego wykorzystania w medycynie i w przemyśle. Omówiła fizykochemiczne właściwości kationowych powierzchniowo czynnych (surfaktantów) CSA gemini ze szczególnym uwzględnieniem ich aktywności biologicznej i możliwości wykorzystania tych związków jako syntetycznych nośników DNA w procesie transfekcji. Kolejny rozdział dotyczy formowania biofilmów oraz strategii ich zwalczania - w tym miejscu pozwolę sobie na uwagę, że muszą być co najmniej dwa podrozdziały- jeden nie ma sensu (rozdział 3 „Biofilm” podrozdział 3.1 „Strategie zwalczania biofilmu”). W związku z podjęciem badań zmierzających do poznania molekularnych mechanizmów działania CSA gemini wykorzystując drożdże *S. cerevisiae* jako modelowy organizm ostatni rozdział wstępu traktuje o strukturze i właściwościach błony komórkowej drożdży.

**Rozdział III Cele pracy** zostały jasno sformułowane. Doktorantka przedstawiła konkretne zadania badawcze, które konsekwentnie realizowała. Zadaniem mgr Agaty Piecuch była ocena właściwości bakterio- i grzybobójczych serii nowo zsyntetyzowanych czwartorzędowych soli amoniowych gemini (CSA gemini). Ponadto, wykorzystując komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, Doktorantka podjęła badania zmierzające do poznania molekularnych mechanizmów działania tych soli. Kolejnym zadaniem było zbadanie zdolności wybranych CSA gemini do tworzenia liposomów celem ich wykorzystania do transfekcji ludzkich komórek.

**Rozdział IV. Materiały** Tabela I w tym rozdziale zatytułowana „Szczepy bakteryjne i grzybowe” zawiera kolumnę Genotyp. Określenie szczep kliniczny dla *Staphylococcus epidermidis* B374, *Staphylococcus aureus* R99, *Enterococcus faecalis* 30VRE nie jest genotypem. Brak również danych dotyczących *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *E.coli* ATCC10536 i *Candida albicans* ATCC90028. Poza tabelą w tym rozdziale umieszczono opisy stosowanych pożywek mikrobiologicznych, buforów i barwników oraz przedstawiono strukturę chemiczną badanych czwartorzędowych soli amoniowych gemini.

W kolejnym rozdziale (**Rozdział V**) **Metody** Doktorantka wyczerpująco opisała zastosowane procedury, które zostały prawidłowo dobrane do postawionych zadań badawczych.



**Rozdział VI Wyniki** obejmujący część doświadczalną pracy jest podzielony na jedenaście głównych podrozdziałów odpowiednio do postawionych zadań. Każdy podrozdział zawiera opis celu eksperymentu, wyniki doświadczeń zestawione w tabelach, w postaci diagramów lub zdjęć mikroskopowych i jest zakończony krótkim wnioskiem. Większość wyników odnosząca się do badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej nowosyntetyzowanych CSA gemini (trzy podrozdziały) została opublikowana w czterech recenzowanych, międzynarodowych czasopismach z listy filadelfijskiej. W jednej publikacji mgr Agata Piecuch jest pierwszym autorem, a w trzech drugim. Wszechstronnie przebadany wpływ glicyno- i alanino- pochodnych CSA gemini pozwolił na ocenę zależności efektywności działania poszczególnych soli na ich aktywność przeciwadhezyjną do różnych powierzchni oraz ich wpływu na przeżywalność oraz eradykację biofilmu bakteryjnego i *Candida albicans*. (uwaga dotyczy wykresów 19 i 20 -eradykacja biofilmów, umieszczenie na osi rzędnych wartości 120% nie ma sensu). Autorka ustaliła zależność wyżej wymienionych aktywności od struktury chemicznej badanych surfaktantów. O wartości otrzymanych wyników świadczy nie tylko ich opublikowanie w 4 naukowych czasopismach, ale również dwa zgłoszenia patentowe, które świadczą o potencjalnym znaczeniu praktycznym prowadzonych badań.

Wyniki przedstawione w drugiej części rozprawy (rozdziały VI4-VI7) stanowią istotny element badań ukierunkowanych na wyjaśnienie molekularnych mechanizmów cytotoksycznego działania CSA gemini. Wybranim organizmem w tych badaniach są drożdże *S. cerevisiae*. Doktorantka sprawdziła cytotoksyczność wybranych glicyno- i alanino pochodnych CSA gemini wobec komórek drożdży i wyznaczyła minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC-Minimal Inhibitory Concentration). Stosując inhibitory o stężeniu MIC Autorka zbadała wpływ CSA gemini na przepuszczalność błony komórkowej *S. cerevisiae* i wykazała, że zależnie od długości hydrofobowego łańcucha alkilowego badane surfaktanty zwiększają przepuszczalność błony komórkowej, a nawet przerywają jej ciągłość. Ponadto okazało się, że pochodne o 10- i 12- węglowych łańcuchach alkilowych powodują zmiany w składzie lipidowym błony komórkowej. Moim zdaniem dane przedstawione w Tabeli 11-ej i w postaci diagramu (Rys.38) mają charakter wstępny. Przed opublikowaniem wyników doświadczenia powinny być powtórzone tak, żeby zaobserwowane różnice w zawartości kwasów tłuszczowych i ergosterolu w błonie komórkowej komórek drożdży traktowanych CSA geminid były statystycznie istotne. Poza tym warto potwierdzić wyniki używając inne szczepy nie będące pochodnymi szczepu  $\Sigma 1278b$ . Istotne znaczenie tych badań wynika z faktu, że skład błony komórkowej *S. cerevisiae* jest taki jak grzybów patogennych zatem wyniki dotyczące wpływu CSA gemini na przepuszczalność błony komórkowej *S. cerevisiae* mogą przyczynić się do poznania mechanizmów bójczych właściwości tych związków wobec ludzkich patogenów, takich jak *Candida*.

Eksperymenty opisane w rozdziałach VI8-VI11 dotyczyły sprawdzenia zdolności wybranych CSA gemini do tworzenia lipopleksów celem ich wykorzystania do transfekcji ludzkich komórek. Od lat 90 tych ubiegłego wieku trwają intensywne badania nad opracowaniem systemów transfekcji komórek ssaczych warunkujących wydajną i bezpieczną terapię genową. Surfactanty gemini zaliczono do grupy

obiecujących syntetycznych nośników DNA. W swojej pracy mgr Agata Piecuch zbadała zdolność wybranych CSA gemini do formowania liposomów. Dla 16 glicyno- i alanino-pochodnych CSA gemini o różnej długości łańcuchów alkilowych wyznaczono zdolność do samo agregacji mierzoną jako krytyczne stężenia micelarne - CMC. Cztery surfaktanty o niskiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej zbadano pod kątem zdolności tworzenia liposomów, kondensacji DNA i tworzenia lipopleksów. Okazało się, że tylko jeden związek TMEAL-12Cl tworzył lipopleksy, dwa surfaktanty wykazywały zdolność kondensacji DNA przez micelle, a badany CSA gemini TMEAL-14 Br nie wiązał plazmidowego DNA. Niestety pomimo zdolności do kondensacji DNA przez CSA gemini nie zdały one egzaminu jako możliwe nośniki genów poprzez transfekcję, bowiem jak wykazała Doktorantka są one dla ludzkich komórek cytotoksyczne nawet w niskich stężeniach. Pomimo negatywnego wyniku uważam, że należy nadal poszukiwać odpowiednich warunków transfekcji, które nie prowadziłyby do śmierci komórek.

Podczas czytania rozdziału **Wyniki** odczułam brak szczegółowych podpisów pod rysunkami i tabelami i co powodowało konieczność nieustannego sięgania do rozdziału **Metody**.

Konsekwentna i logiczna **dyskusja** wyników jest przeprowadzona na podstawie aktualnego piśmiennictwa i podobnie jak wstęp świadczy o dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktorantki.

Najważniejsze osiągnięcia Autorki obrazuje sześć zwięzłych wniosków.

Dobre metody, przeprowadzone doświadczenia oraz uzyskane wyniki dobitnie świadczą o dużej pomysłowości, pracowitości i dojrzałości naukowej magister Agaty Piecuch.

Mgr Agata Piecuch jest współautorką ośmiu publikacji:

**Piecuch A**, Obłąk E, Guz-Regner K. Antibacterial Activity of Alanine-Derived Gemini Quaternary Ammonium Compounds. *J Surfactants Deterg.* 2016,19:275-282

**Piecuch A**, Lamch Ł, Paluch E, Obłąk E, Wilk KA. Biofilm prevention by dicephalic cationic surfactants and their interactions with DNA. *J Appl Microbiol.* 2016,121:682-692.

Obłąk E, **Piecuch A**, Dworniczek E, Olejniczak T. The influence of biodegradable gemini surfactants, N,N'-bis(1-decyloxy-1-oxopronan-2-yl)-N,N,N',N' tetramethylpropane-1,3-diammonium dibromide and N,N'-bis(1-dodecyloxy-1-oxopronan-2-yl) N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dibromide, on fungal biofilm and adhesion. *J Oleo Sci.* 2015,64:527-537.

Obłąk E, **Piecuch A**, Guz-Regner K, Dworniczek E. Antibacterial activity of gemini quaternary ammonium salts. *FEMS Microbiol Lett.* 2014, 350:190-198.

Obłąk E, **Piecuch A**, Krasowska A, Luczyński J. Antifungal activity of gemini quaternary ammonium salts. *Microbiol Res.* 2013, 168:630-138.

**Piecuch A**, Lamch Ł, Paluch E, Obłąk E, Wilk KA. Biofilm prevention by dicephalic cationic surfactants and their interactions with DNA. *J Appl Microbiol.* 2016,121:682-692



**Piecuch A**, Obłąk E. Yeast ABC proteins involved in multidrug resistance. *Cell Mol Biol Lett*. 2014 ,19:1-22.

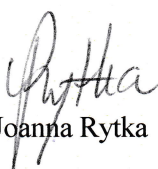
**Piecuch A**, Obłąk E. Mechanisms of yeast resistance to environmental stress. *Postępy Hig Med Dosw* . 2013, 67:238-254

**Jarmuła A.**, Obłąk E., Wawrzycka D., Gutowicz J. (2011) Oporność wielolekowa związana z aktywnym usuwaniem leków z komórek drobnoustrojów. *Postępy Hig Med Dosw* 65: 216-227.

Sześć prac doświadczalnych opublikowane w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej. W czterech publikacjach Dwie prace przeglądowe opublikowano w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej*.

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 tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.z 2014r poz. 1852 oraz z 2015r poz. 249 i 1767) dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Agaty Piecuch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

. Warszawa 10-10-2016

  
prof. dr hab. Joanna Rytko