

dr hab. prof. UZ Katarzyna Baldy-Chudzik
Kierownik Katedry Mikrobiologii i Genetyki
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Zielonogórski

Zielona Góra 21.08.2018r

OCENA

Pracy doktorskiej Pana mgr. Emila Palucha

**pt. "Biologiczna aktywność nowo zsyntetyzowanych kationowych surfaktantów
wielofunkcyjnych wobec wybranych mikroorganizmów"**

Wzrastająca oporność drobnoustrojów na powszechnie stosowane antybiotyki i chemioterapeutyki, coraz częściej, powoduje trudności w osiągnięciu sukcesu terapeutycznego w leczeniu infekcji u ludzi i zwierząt. Problem ten generuje dążenia do poszukiwania nowych substancji o charakterze bakterio- i grzybobójczym. Kationowe surfaktanty należą do związków szeroko wykorzystywanych w różnych obszarach medycyny oraz jako dezynfektanty.

Praca doktorska Pana mgr. Emila Palucha pt.: Biologiczna aktywność nowo zsyntetyzowanych kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych wobec wybranych mikroorganizmów, została przedstawiona w formie manuskryptu książki. Rozprawa liczy łącznie 195 stron i jest przygotowana w sposób tradycyjnie przyjęty dla tego typu opracowań, czyli podzielona na klasyczne rozdziały, takie jak: Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie, Literatura i Abstrakt.

Przedstawiona do oceny praca doktorska koncentruje się na problematyce biologicznej aktywności nowo zsyntetyzowanych kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych. Autor w sposób kompleksowy charakteryzuje przeciwbakteryjną i przeciwgrzybową aktywność kationowych surfaktantów. Część doświadczalna pracy jest poprzedzona dobrze

przemysłanym wstępem literaturowym, obrazującym obecny stan wiedzy obejmującej zagadnienia związane z budową, klasyfikacją i aktywnością biologiczną kationowych surfaktantów oraz możliwością potencjalnego ich zastosowania w medycynie. W dalszej części wstępu ze względu na postawione cele pracy, Autor w sposób szczegółowy zapoznaje czytelnika z etapami powstawania i strategią zwalczania biofilmu tworzonego przez patogeny oportunistyczne. Następnie opisuje strukturę i właściwości błony komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako organizmu modelowego, uwzględniając szczegółową kompozycję lipidową i białka błony komórkowej drożdży, oraz stres oksydacyjny w komórkach drożdży. „Wstęp” pracy jest napisany przejrzystym językiem naukowym, dostarcza czytelnikowi wszystkich informacji koniecznych dla właściwej oceny pozostałych części pracy. Dobór zagadnień omawianych we „Wstępie” pracy jest również dobrze/głęboko przemysłany i ściśle związany z prezentowanymi w dalszych rozdziałach wynikami własnymi Autora.

Cel główny pracy dotyczący określenia : „biologicznej aktywności nowo zsyntezowanych kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych, pochodnych dimetyloaminy oraz czwartorzędowych soli amoniowych” został przedstawiony w sposób jasny, a następnie został uszczegółowiony przedstawieniem planu badawczego Doktoranta.

W rozdziale „Materiały” Autor charakteryzuje strukturę chemiczną stosowanych w pracy kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych, wymienia wykorzystywane w badaniach szczepy bakteryjne i grzybowe, podłoża mikrobiologiczne, stosowane bufony i odczynniki chemiczne oraz barwniki i materiały dodatkowe. W tym rozdziale Autor podaje skąd pochodzą uzyskane do badań surfaktanty i odsyła czytelnika do pozycji literaturowych: Wilk i wsp., 2010 oraz Skrzela i wsp., 2010, które nie występują w spisie literatury.

W rozdziale „Metody” Doktorant zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Autor wykorzystywał 22 rodzaje procedur dla zrealizowania celów badawczych. Ponadto niektóre spośród procedur były dodatkowo rozbudowane o liczne metodyki dodatkowe. Na przykład punkt 14. w rozdziale „Metody” pt.: Wpływ kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych na kompozycję kwasów tłuszczowych i steroli drożdży *S. cerevisiae*, obejmował procedurę uzyskiwania sferoplastów, izolację błon komórkowych, izolację kropli lipidowych, estryfikację kwasów tłuszczowych do estrów metylowych kwasów tłuszczowych i analizę estrów kwasów tłuszczowych. Podobnie punkt 16. „Techniki

mikroskopowe”, obejmuje procedury mikroskopii fluorescencyjnej, kontrastowo-fazowej i elektronowej z podpunktami. Tak szeroki wachlarz wykorzystanych metod (w sumie ponad 30) dowodzi, że Doktorant w czasie realizacji pracy zdobył szerokie doświadczenie w pracy laboratoryjnej. Wszystkie procedury zostały dokładnie opisane w sposób umożliwiając ich odtworzenie w innym laboratorium. Każda z metod została wykorzystana w sposób zasadny dla rozstrzygnięcia założonego celu pracy.

W moim odczuciu zastosowanie ogólnych schematów obrazujących wykorzystanie poszczególnych metod do analiz na poziomie komórkowym jako jeden schemat oraz analiz na poziomie subkomórkowym jako drugi schemat i zamieszczenie ich w formie „przewodnika” znacznie ułatwiłoby odbiór treści tego rozdziału.

Materiałem do badań Doktoranta były kationowe surfaktanty wielofunkcyjne (KSW), pochodne czwartorzędowych soli amoniowych (CSA) o zmiennym łańcuchu alkilowym oraz pochodne dimetyloaminy o zmiennym łańcuchu alkilowym. Otrzymane w trakcie przeprowadzonych badań wyniki dowodzą skutecznej realizacji celów pracy. Wszystkie eksperymenty opisane w rozdziale „Wyniki” zostały w sposób logiczny i fachowy zaplanowane, wykonane i opisane przez Doktoranta.

Analizując aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybową kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych Doktorant wyznaczył minimalne stężenie hamujące MIC i minimalne stężenie bójące badanych surfaktantów wobec wybranych bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz grzybów. Przeanalizował wpływ wybranych wielofunkcyjnych surfaktantów kationowych na proces filamentacji u *Candida albicans*. Przeanalizował działanie przeciwadhezyjne kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych wobec wybranych mikroorganizmów na różnych powierzchniach abiotycznych w tym adhezję wybranych drobnoustrojów do powierzchni polistyrenowej, metalowej, silikonowej oraz do powierzchni szklanej. Zbadał działanie przeciwbiofilmowe kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych wobec wybranych drobnoustrojów, a w tym ich wpływ na produkcję biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*. Zbadał wpływ wybranych kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych na eradykację biofilmu *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* i *C. albicans*. Analizował wpływ badanych kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych na przeżywalność *C. albicans* oraz ich oddziaływanie na wybrane czynniki wirulencji *P. aeruginosa*. Ten etap badań, obejmujący relacje : komórka - surfaktant – powierzchnie abiotyczne z różnych materiałów, w moim odczuciu, powinien znaleźć

podsumowanie np. w formie tabeli porównawczo-zbiorczej ukazującej sposób oddziaływania testowanych związków. Takie porównanie pozwoliłoby na uzyskanie jasnego obrazu, który z badanych surfaktantów wywierał pożądany efekt (tj. niwelował adhezję do różnych powierzchni abiotycznych, wpływał hamująco na zdolność tworzenia biofilmu czy też wpływał na jego eradykację) i w jakim układzie badania.

Aktywność przeciwgrzybową kationowych surfaktantów wielofunkcyjnych Doktorant badał wobec komórek *C. albicans* i *S. cerevisie*. To kolejny etap badań obejmujący kompleksową analizę na poziomie struktury komórkowej. Badania obejmowały wpływ KSW na integralność i przepuszczalność błony komórkowej drożdży jako organizmu modelowego. Następnie dokonano oceny wpływu DNA oraz jonów potasu i wapnia z komórek drożdży pod wpływem badanych związków. Wykorzystując techniki mikroskopii fluorescencyjnej przeprowadzono analizę ciągłości błon komórkowych drożdży i akumulacji kropli lipidowych. Następnie analizowano wpływ badanych surfaktantów na skład i kompozycję kwasów tłuszczowych i steroli w błonie komórkowej i kroplach lipidowych drożdży z wykorzystaniem chromatografii gazowej. Kolejną fazę badań stanowiła analiza stresu oksydacyjnego w komórkach drożdży pod wpływem KSW przy wykorzystaniu metody spektrofotometrycznej i mikroskopii fluorescencyjnej. Autor wykazał, że wybrane KSW powodują stres oksydacyjny w komórkach wybranych szczepów drożdży. Przeprowadził analizę produkcji wewnątrzkomórkowego anionorodnika ponadtlenkowego i dokonał oceny wpływu KSW na inicjację mitochondrialnego stresu oksydacyjnego w komórkach *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisie*. W celu określenia działania badanych surfaktantów na komórki mikroorganizmów Doktorant przeprowadził ich obserwacje w transmisyjnym mikroskopie elektronowym zarówno w warunkach kontrolnych jak i w obecności testowanych związków. Uważam, że podsumowaniem tego etapu badań, tak jak wcześniejszego, powinna być tabela porównawcza. Końcowy etap badań to, zgodnie z założonym celem pracy, analiza możliwości wykorzystywania badanych surfaktantów jako nośników leków. W tym celu przeprowadzono analizy zdolności wybranych surfaktantów, wykazujących niską aktywność przeciwdrobnoustrojową, do kondensowania DNA i tworzenia struktur lipopleksów. Następnie Doktorant dokonał oceny właściwości mutagennych, genotoksycznych i hemolitycznych badanych surfaktantów, co stanowi istotny element analiz podczas szacowania bezpieczeństwa stosowania substancji o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym lub przeciwgrzybowym.

Dyskusja pracy została napisana dojrzałe, a Doktorant w sposób krytyczny odnosi swoje wyniki do danych literaturowych. Ponadto dyskusja wskazuje na dogłębną znajomość problematyki podjętej w pracy i dobrą znajomość szerokiej gamy literatury, co spowodowało, że jest obszerna, ale też merytoryczna. Pracę doktorską kończy podsumowanie składające się z 13 trafnie formułowanych wniosków, związanych z założonymi celami.

Za ważny element uważam też fakt opublikowania części wyników zawartych w rozprawie doktorskiej w postaci artykułu naukowego w czasopiśmie *Colloids and surfaces: biointerface* (vol.164 p.34-41,2018), gdzie Doktorant jest pierwszym autorem.

W spisie literatury zauważyłam dużo nieścisłości. Doktorant wymienia 272 pozycje literatury, spośród których pozycja 16 i 17 to ta sama praca, powtórzeniem są też pozycje 130 i 131. Ponadto pozycje 76 i 227 są bezimienne, a pozycje 3,7,91,93,182,258 i 265 nie są cytowane w tekście. W spisie literatury brakuje natomiast prac, które są cytowane w tekście: Khachane i wsp., 2014 (str.33); Mattick, 2002 (str.35); Caetano i wsp., 2010 (str.36); Frąckowiak i wsp., 2012 (str.54); Skrzela i wsp., 2010 (str.54); Wilk i wsp. 2010 (str.54); McPhee i wsp. 2003 (str.152); Böcking i wsp., 2000 (str.159); Guerin-Mechin i wsp., 1999 (str.161).

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pana mgra Emila Palucha uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w art.13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dn.14.03.2003r (Dz.U. nr 65 poz.595) z późniejszymi zmianami. Jestem przekonana, że cele rozprawy doktorskiej zostały osiągnięte, a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i wartościowe, o znacznych walorach poznawczych. W związku z tym, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgra Emila Palucha do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry Mikrobiologii i Genetyki
Wydziału Nauk Biologicznych
dr hab. Katarzyna Baldy-Chudzik, prof. UZ