

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**mgr. inż. WOJCIECHA TABORA****p.t. „Inhibicja aktywności ureaz o zróżnicowanym pochodzeniu mikrobiologicznym”**

Oceniana rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Chemii Bioorganicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. inż. Artura Muchy oraz promotora pomocniczego dr Agnieszki Grabowieckiej. Podstawą opracowania recenzji jest uchwała Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej z dnia 14 czerwca 2023 roku. Recenzję przygotowałam w oparciu o obowiązujące przepisy wynikające z Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm.) oraz dostarczony egzemplarz rozprawy doktorskiej.

Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Antybiotyki uważane są za jedno z najważniejszych odkryć człowieka. Ich wprowadzenie do leczenia zakażeń bakteryjnych stało się przełomem i na wiele lat ograniczyło śmiertelność z powodu zakażeń bakteryjnych. Jednak końcem XX. wieku problem antybiotykooporności zaczął wymykać się spod kontroli i jest on coraz częstszym i większym zagrożeniem dla pacjentów. Z tego też względu konieczne są prace nad wprowadzaniem nowych leków i strategii terapeutycznych, mogących przeciwdziałać narastającej antybiotykooporności. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej mgr. inż. Wojciecha Tabora stanowią odpowiedź na to zapotrzebowanie, gdyż ureaza, obiekt badań Doktoranta, jest jednym z czynników wirulencji patogenów wywołujących zakażenia układu moczowego, pokarmowego, czy oddechowego. Stąd opracowanie efektywnych i bezpiecznych dla pacjenta inhibitorów ureaz może przyczynić się do ograniczenia zjawiska antybiotykooporności, gdyż będą one mogły stanowić skuteczną alternatywę dla antybiotyków.

Ocena rozprawy doktorskiej

Praca doktorska Pana mgr. inż. Wojciecha Tabora zatytułowana „Inhibicja aktywności ureaz o zróżnicowanym pochodzeniu mikrobiologicznym” została zrealizowana w formie klasycznej monografii. Pracę rozpoczyna wykaz stosowanych skrótów. Następnie na kolejnych 38 stronach przedstawiono przegląd literatury, który porusza wszystkie niezbędne informacje dotyczące ureazy, poczynając od przedstawienia ureazy jako czynnika wirulencji, poprzez opis molekularnej struktury badanego enzymu, a kończąc na omówieniu mechanizmów działania inhibitorów ureaz. Przygotowanie tej części rozprawy wymagało niewątpliwie bardzo dużego nakładu pracy podczas wyboru najbardziej istotnych informacji dotyczących prezentowanego tematu, co było niezmiernie trudne, mając na względzie obszerność zagadnienia.

Cel pracy oraz zadania badawcze Autor przedstawił bardzo czytelnie w odrębnym podrozdziale. Celem pracy było zidentyfikowanie nowych związków chemicznych hamujących aktywność ureaz pochodzenia mikrobiologicznego. Aby go zrealizować wyizolowano i oczyszczono ureazy szczepów *Cryptococcus neoformans* oraz *Sporosarcina pasteurii* oraz przebadano kilkanaście grup związków chemicznych pod kątem ich aktywności inhibującej względem zarówno czystej ureazy, jak również mikroorganizmów ureolitycznych. Następnie określono skuteczność pochodnych ebselenu w inhibicji systemu reduktazy tioredoksyny i pośrednim generowaniu stresu oksydacyjnego u mikroorganizmów oraz określono zdolność wybranych inhibitorów ureaz do hamowania wzrostu biofilmu bakteryjnego.

Sekcję Materiały i Metody zawarto na 29 stronach. Opis jest szczegółowy i pozwala na pełne zaznajomienie się z metodyką badawczą zastosowaną do realizacji eksperymentów. W niektórych miejscach zabrakło w nim jednak odnośników do źródeł literaturowych (np. pomiar aktywności ureolitycznej z użyciem czerwień krezolowej, pomiar białka metodą Bradforda).

Przedstawienie wyników badań oraz ich dyskusja obejmują kolejne 82 strony tekstu wraz z rysunkami i tabelami. Doktorant w swojej rozprawie doktorskiej nie tylko zaprezentował wyniki, ale co najważniejsze, przedyskutował ich znaczenie w odniesieniu do literatury. Zdaniem recenzentki, tak powinna wyglądać dojrzała dyskusja naukowa. Doktorant ma poświadczać umiejętność prowadzenia badań i interpretacji uzyskanych wyników, czyli kluczowym elementem każdej pracy doktorskiej ma być rozbudowana i dojrzała dyskusja wyników. Pan mgr inż. Wojciech Tabor dobrze wywiązał się z tego zadania.

Podsumowanie uzyskanych wyników zawarto na dwóch stronach, trafnie wybierając najbardziej interesujące dla środowiska naukowego osiągnięcia będące efektem realizacji doktoratu. Następnie zamieszczono listę 99 źródeł literaturowych, dorobek naukowy Doktoranta oraz streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim. Całość rozprawy doktorskiej zawarto na 181 stronach.

Praca napisana jest poprawnym stylistycznie językiem, z niewielką liczbą literówek, niezręczności stylistycznych oraz drobnych błędów rzeczowych. Pewne niewielkie uchybienia podano poniżej:

- str. 23 – „[...] geny URE4, URE6 i URE7 [...]” – nazwy genów należy pisać kursywą;
- str. 25 – „[...] gatunek ten charakteryzuje relatywnie niska odporność na działanie antybiotyków [...]” – należy używać terminu *oporność*, a nie *odporność*, za którą u organizmów odpowiada układ immunologiczny, nie należy tych terminów stosować zamiennie;
- str. 65 – poniżej zamieszczonego równania powinny się znaleźć rozwinięcia wszystkich zastosowanych w nim skrótów;
- str. 87 – w podpisie osi X na rysunku 21 zamiast „[S] [mM]” powinno być raczej „S [mM]”, analogicznie do osi Y, gdzie Doktorant w nawiasie umieścił jednostkę, a parametr poza nim;
- str. 90-94 – w nagłówku tabeli 1 powinny zostać wskazane oznaczenia odnoszące się do konkretnych podgrup badanych inhibitorów;
- str. 95 – do rysunku 23 powinna zostać zamieszczona legenda wskazująca, do których stężeń inhibitora odnoszą się konkretne proste zamieszczone na wykresie;

Doktorant zrealizował dobrze przemyślane i zaplanowane badania inhibicji ureaz pochodzących zarówno z bakterii, jak i grzybów, w kontekście potencjalnego wykorzystania inhibitorów jako leków. W tym celu Doktorant przeprowadził wielokierunkowe badania, słusznie nie ograniczając się tylko do określenia stopnia inhibicji wolnej ureazy, ale przede wszystkim oceniając skuteczność badanych inhibitorów względem aktywności ureolitycznej żywych komórek mikroorganizmów. Osiągnięcie założonych celów badań było możliwe dzięki przeprowadzeniu przez Doktoranta szeregu logicznie wynikających z siebie eksperymentów z zastosowaniem licznych analiz z zakresu chemii, enzymologii i mikrobiologii. Ponadto Doktorant wykazał się umiejętnością poprawnej analizy wyników i wyciągania wniosków. Za najważniejsze osiągnięcia niniejszego doktoratu uważam:

- przeanalizowanie ponad 200 związków chemicznych, w tym związków fosfonianowych, analogów katecholu, ebselenu, mocznika oraz ich pochodnych hybrydowych, pod kątem zdolności tych związków do inhibicji ureolizy, zarówno przez oczyszczoną ureazę, jak również w całych komórkach patogennych mikroorganizmów i wskazanie *o*-metoksylowej pochodnej ebselenu SF14 oraz *para*-dietylofosfonowej pochodnej ebselenu SP1 jako najskuteczniejszych inhibitorów ureaz;
- wykazanie, że wybrane pochodne ebselenu, które w komórkach ssaczy pełnią rolę antyoksydantów, mogą generować nadmierny stres oksydacyjny w komórkach mikroorganizmów poprzez inhibicję ich reduktazy tioredoksyny; czyni je to obiecującymi związkami do zastosowania w leczeniu infekcji mikroorganizmami ureolitycznymi, które jako główny mechanizm kontrolujący stres oksydacyjny w komórkach wykorzystują system reduktazy tioredoksyny;
- wykazanie, że niektóre związki selenoorganiczne, będące jednocześnie inhibitorami ureaz, są zdolne do hamowania rozwoju biofilmu tworzonego przez komórki *Helicobacter pylori* Tx30a.

Analizując niniejszą rozprawę doktorską pod kątem aktualności podjętych badań można z całą pewnością stwierdzić, że Autor z sukcesem odnalazł swoją niszę badawczą, a realizowane przez Niego badania będą interesujące dla szeregu naukowców, zarówno tych zainteresowanych zwalczaniem antybiotykooporności, jak również tych zainteresowanych enzymologią jako nauką podstawową.

Uwagi i pytania

1. Jedną ze strategii stosowanych w badaniach nad zwalczaniem antybiotykooporności jest poszukiwanie inhibitorów tzw. „non-essential targets”, które Doktorant zdefiniował jak struktury komórkowe. Jednocześnie Doktorant podaje, że jednym z „non-essential targets” jest ureaza. Bardzo proszę Doktoranta o rozwinięcie tematu tzw. „non-essential targets” z uwzględnieniem ich pełnej definicji.
2. Ureaza uznawana jest za czynnik wirulencji u mikroorganizmów patogennych, stąd uzasadnionym jest poszukiwanie inhibitorów tego enzymu. W poszukiwaniach skutecznych inhibitorów ureazy konieczne jest, jak pisze Doktorant, określenie aktywności inhibitora względem enzymu, jego zdolności przenikania przez osłony komórkowe mikroorganizmu oraz

trwałości po podaniu pacjentowi. Wydaje się jednak, że równie istotne jest określenie bezpieczeństwa stosowania inhibitora u ludzi, a więc określenie jego toksyczności. Proszę o przedstawienie informacji na temat toksyczności badanych przez Doktoranta inhibitorów ureazy.

3. Badania aktywności ureolitycznej prowadzono metodą indofenolową oraz poprzez monitorowanie zmian pH z użyciem czerwieni krezolowej zarówno dla czystych preparatów enzymatycznych, jak również dla całych komórek mikroorganizmów. Obie metody opierają się na pomiarze absorpcji światła przez badaną próbę. Wprowadzanie zawiesiny komórek mikroorganizmów do mieszaniny reakcyjnej powoduje jej mętnienie, co wpływa na rozproszenie światła podczas pomiaru. Z tego względu nie zaleca się dla takich prób wykonywania pomiaru absorbancji. W jaki sposób standaryzowano pomiary, aby uniknąć błędów pomiaru dla takich prób?
4. Wyznaczanie wartości IC_{50} dla badanych związków prowadzono między innymi w syntetycznym moczu. Czy jego składniki mogły mieć wpływ na aktywność ureazy? Na stronie 73 rozprawy doktorskiej napisano, że badano wpływ dodanych inhibitorów na stabilność syntetycznego moczu. Jaki był cel tych badań?
5. Ile powtórzeń biologicznych przeprowadzono podczas ustalania optymalnych warunków hodowli *Cryptococcus neoformans* dla indukcji ureazy? Doktorant bardzo kategorycznie wskazuje optymalne warunki dla indukcji ureolizy przez badane mikroorganizmy. Dla wyników z badań nad wpływem rodzaju podłoża hodowlanego na intensywność ureolizy można to uzasadnić dodatkowymi wynikami z obserwacji mikroskopowych przeżywalności mikroorganizmów w badanych podłożach hodowlanych. Nie jest to już takie oczywiste dla wyników badań nad optymalnym stężeniem mocznika i niklu dla indukcji ureazy w komórkach *Cryptococcus neoformans*. Bez analizy odchyień standardowych i istotności statystycznej trudno jednoznacznie stwierdzić, które z badanych stężeń mocznika i niklu powoduje znaczący wzrost aktywności ureolitycznej, czy znaczące zahamowanie wzrostu.
6. Jaką wydajność oraz stopień oczyszczenia uzyskano podczas izolacji i oczyszczania ureazy z komórek szczepów *Sporosarcina pasteurii* CCM 2056 i *Cryptococcus neoformans*? W rozprawie zabrakło mi tabelarycznego zestawienia aktywności, wydajności i stopnia

oczyszczenia ureazy w poszczególnych frakcjach uzyskiwanych podczas izolacji enzymu z badanych mikroorganizmów.

7. Doktorant uzyskał wartość K_m dla ureazy izolowanej z *C. neoformans* porównuje z enzymem *S. pasteurii* – „[...] ureaza z komórek *C. neoformans* charakteryzuje się wyższą specyficnością wobec substratu reakcji ureolizy niż w przypadku enzymu [...] *S. pasteurii*. Dla tego ostatniego zwykle stwierdzano wartości stałej Michaelisa w przedziale 16-18 mM.” Czy podany zakres stężeń został wyznaczony przez Doktoranta czy pochodzi z danych literaturowych? Czy Doktorant wyznaczył wartości K_m i V_{max} dla ureazy szczepu *Sporosarcina pasteurii* CCM 2056?
8. Spośród wszystkich omówionych i przebadanych przez Doktoranta grup potencjalnych inhibitorów ureaz, którą Doktorant uważa za najbardziej obiecującą dla zastosowania klinicznego i dlaczego?

Wymienione powyżej uwagi i komentarze mają formę sugestii, będą stanowić początek dyskusji w trakcie obrony rozprawy doktorskiej i w żaden sposób nie podważają mojej wysokiej oceny dla wartości naukowej ocenianej rozprawy.

Ocena końcowa

Swoją rozprawą doktorską mgr. inż. Wojciech Tabor, napisaną w formie klasycznej monografii, udowodnił samodzielność w prowadzeniu badań naukowych. Zrealizował On szeroko zakrojone, dobrze przemyślane i zaplanowane badania nad identyfikacją skutecznych inhibitorów ureaz pochodzenia mikrobiologicznego. Doktorant przeprowadził szereg logicznie połączonych ze sobą eksperymentów, stosując szeroki wachlarz analiz łączących wiedzę z zakresu chemii, biochemii i mikrobiologii. Ponadto wykazał się umiejętnością poprawnej analizy uzyskanych wyników i właściwego formułowania wniosków. Liczba moich uwag/sugestii jest niewielka i nie wpływa na ogólną bardzo dobrą ocenę pracy. Należy również podkreślić, że uzyskane przez Doktoranta wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale również aplikacyjną. Wytypowane przez mgr. inż. Wojciecha Tabora inhibitory ureaz mają szansę stać się kiedyś skutecznymi zamiennikami antybiotyków w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr. inż. Wojciecha Tabora spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm.) i wnoszę o

dopuszczenie Pana mgr. inż. Wojciecha Tabora do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Z poważaniem
dr hab. Urszula Guzik, prof. UŚ

Urszula Guzik