

dr hab. inż. Hubert Cieśliński, prof. uczelni
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
email: hcieslin@pg.gda.pl
tel. 58 3471605

Gdańsk, 28-31 sierpnia 2023

Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr inż. Wojciecha Tabora pt. „Inhibicja aktywności ureaz o różnicowanym pochodzeniu mikrobiologicznym”

Wprowadzenie antybiotyków do racjonalnego zastosowania, datowane od opracowania na początku lat 40 ubiegłego wieku metody przemysłowej produkcji pierwszego antybiotyku penicyliny i jej zastosowania w leczeniu rannych żołnierzy przez aliantów w czasie II Wojny Światowej, niezaprzeczalnie przyczyniło się do zmiany oblicza medycyny od początku lat 50 XX wieku. Zastosowanie antybiotyków pozwoliło na rozwój chirurgii (przez ograniczenie zakażeń i posocznicy pooperacyjnych) oraz transplantologii (ochrona organizmu przed patogenami, których układ odpornościowy osłabiony przez podawanie leków immunosupresyjnych nie jest zdolny efektywnie zwalczać). Jednakże, główną korzyścią płynącą z ich zastosowania było ograniczenie negatywnego wpływu chorób zakaźnych na populację ludzką, które uprzednio przez stulecia je dziesiątkowały. Do dnia dzisiejszego, waga zastosowania antybiotyków w zaprezentowanych obszarach medycyny jest niezaprzeczalna. Jednakże, cieniem kładącym się na sukces antybiotyków jest stale narastający problem pojawiania się szczepów opornych na stosowane w medycynie antybiotyki. Obecnie wykonane analizy wskazują, że problem ten będzie wpływał na obserwowany na całym świecie wzrost liczby zgonów wywołanych przez różnorodne mikroorganizmy patogenne. Narastająca świadomość problemu lekooporności zainicjowała szereg projektów badawczych poszukujących nowych strategii zwalczania mikroorganizmów patogennych. Jedną z takich strategii jest poszukiwanie związków mogących wpływać na funkcjonowanie struktur komórkowych bądź enzymów tzw. „non-essential targets” (skrót. NET), które w przeciwieństwie do celów molekularnych dla stosowanych antybiotyków, nie są niezbędne dla wzrostu patogennego mikroorganizmu. NET są kluczowe np. w procesie kolonizacji organizmu

atakowanego przez patogen i ochronie patogenu zasiedlającego zainfekowany organizm przed działaniem jego układu odpornościowego. W zastosowaniu m.in. inhibitorów enzymów zaangażowanych w procesy np. tworzenia biofilmu przez patogeny, szczególnie tych które będą zdadne do synergistycznego działania i przywracania aktywności biobójczej dotąd stosowanych antybiotyków, upatruje się obecnie szans na opracowanie nowych leków przeciw patogenom bakteryjnym i grzybowym. Z lektury pracy Pana mgr inż. Wojciecha Tabora wykonanej w Katedrze Chemii Bioorganicznej, Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. inż. Artura Muchy oraz promotora pomocniczego dr Agnieszki Grabowieckiej wnoszę, że przedstawiona do oceny praca wpisuje się swoim tematem w badania nad wykorzystaniem NET do rozwoju nowych terapii przeciw lekoopornym patogenom. W rozdziale pierwszym swojej pracy doktorskiej zatytułowanym „Studia literaturowe” Pan Wojciech zaprezentował moim zdaniem przekonująco przyczynę podjęcia przez niego badań nad poszukiwaniem inhibitorów bakteryjnych lub grzybowych ureaz, stanowiących obiecujący NET ze względu na różnoraki mechanizm wykorzystania przez mikroorganizmy patogenne tego enzymu jako czynnik wirulencji. Jednakże, po lekturze podrozdziału 1.1 „Oporność antybiotykowa i czynniki wirulencji mikroorganizmów patogennych” odczułem niedosyt w postaci braku zwięzłego zaprezentowania w tym rozdziale jakie inne niż ureaza „non-essential targets” mikroorganizmów patogennych są obecnie badane pod kątem opracowania nowych strategii leczenia zakażeń mikroorganizmami opornymi na antybiotyki stosowane w medycynie.

Uznaje sposób i zakres zaprezentowania przez autora danych literaturowych na temat różnorodnych mechanizmów wirulencji, w których opisane przez autora mikroorganizmy angażują produkowane przez siebie ureazy (podrozdział 1.1) za bardzo dobrze wyjaśniający kryteria wyboru przez doktoranta do badań ureaz takich organizmów ureolitycznych jak bakterie *Helicobacter pylorii*, *Proteus mirabilis* czy też drożdże *Cryptococcus neoformans*. Jednakże w rozdziale 1 nie znalazłem w mojej ocenie informacji wyjaśniających czemu autor podjął się pracy nad otrzymaniem aktywnych i wysoce homogennych preparatów ureazy *Sporosarcina pasteurii* (podrozdział 4.1.1.) i zastosowaniem tego enzymu w badaniach możliwej jego inhibicji przez wybrane związki chemiczne? Z informacji w podrozdziale 1.1 wynika, że ta ureaza nie jest rozpatrywana jako czynnik wirulencji, natomiast z pojawiających się informacji w podrozdziale 1.3 wynika, że enzym ten był wcześniej wykorzystywany do badania jego

inhibicji przez wybrane związki chemiczne, ale nie zostało wyjaśnione przez autora w studium literaturowym jakie kryterium w dotąd opublikowanych badaniach naukowych zaważyło o jego wyborze?

Kontynuując recenzję, w mojej ocenie treść podrozdziału 1.2 „Ureazy – informacje ogólne i struktura” dobrze przygotowują w warstwie merytorycznej czytelnika do zrozumienia wyników badań zaprezentowanych w rozdziale 4. Szkoda jednak, że autor nie pokusił się o zamieszczenie w oparciu o dostępne dane krystalograficzne (wzmianka w tekście na stronie 31, rozdział 1.3) przedstawień graficznych ukazujących położenie i oddziaływanie poszczególnych elementów struktury substratu jak i wybranych inhibitorów z kluczowymi resztami aminokwasowymi ureaz zaangażowanych w proces katalizy. W moim odczuciu przedstawienie w pracy tych grafik ułatwiało by, dzięki możliwemu zaangażowaniu wyobraźni czytelnika, łatwiejsze zrozumienie dyskusji wyników, także założeń dotyczących wyboru podstawników wprowadzanych do badanych związków chemicznych, szczególnie tam gdzie autor odwołuje się do znanych mu wyników badań modelowania molekularnego oddziaływania niektórych z badanych przez niego związków z resztami aminokwasowymi w centrach aktywnych badanych przez niego ureaz. W tej materii, szczególnie użyteczne było by zaprezentowanie wyników badań krystalograficznych przede wszystkim dla tych z ureaz, które autor wykorzystał w swojej pracy doświadczalnej (oczywiście jeśli są one dostępne, czego przyznaje uczciwie, że nie sprawdzałem).

Przechodząc do oceny merytorycznej rozdziału 3 uważam, że nie mam zasadniczych zastrzeżeń do opisu metod doświadczalnych wykorzystanych w pracy. Opis procedur oraz lista materiałów wydaje się mi wystarczająca na potrzeby odtworzenia wykonanych przez doktoranta eksperymentów.

Ocenę zawartości merytorycznej rozdziału 4 „Badania własne” oprę o ocenę realizacji celów badawczych wypunktowanych w rozdziale 2. Podrozdział 4.1 „Pozyskiwanie i właściwości ureaz pochodzenia mikrobiologicznego” przeczytałem ze szczególnym zainteresowaniem. W swojej pracy badawczej niejednokrotnie stawałem przed potrzebą uzyskania wysoce homogennych preparatów enzymów potrzebnych do badań ich właściwości enzymatycznych. Patrząc z tej perspektywy bardzo dobrze oceniam pracę nad ustaleniem optymalnych warunków hodowli mikroorganizmów ureolitycznych umożliwiającą pozyskanie dużej biomasy, co ważne, z zaindukowaną uprzednio mocznikiem produkcją pożądanego enzymu.

Odnosnie procesu oczyszczania ureaz opisanego w rozdziale 4.1.3 z wykorzystaniem zaproponowanej metody oczyszczania w rozdziale 3, zabrakło jak dla mnie informacji w postaci tabeli zawierającej dane o m.in. ilości w mg (na litr hodowli) otrzymanego oczyszczonego i aktywnego enzymu, jego aktywności całkowitej i aktywności specyficznej na kolejnych etapach oczyszczania (dla każdego badanego mikroorganizmu z osobna). Takie dane uważam za ważne dla możliwości oceny wydajności oczyszczania aktywnego enzymu z zastosowaniem opisanej metodyki (rozdział 3).

Odnosząc się do drugiego z celów badawczych pracy tj. zbadanie kilkunastu grup związków pod kątem potencjalnej aktywności jako inhibitory ureolizy, dostrzegam i doceniam zakres wykonanych prac doświadczalnych przez autora. Tym bardziej, że badania te uwzględniały rozwiązanie szeregu problemów, które nie jako z założenia znacząco utrudniały oznaczenie inhibitującego wpływu oraz mechanizmu inhibicji badanych związków np. badania wymagały w niektórych przypadkach ustalenia warunków preinkubacji enzymu z inhibitorem. Wnioski wysnute przez autora z wykonanych badań dla poszczególnych grup przebadanych związków i ich inhibitującego wpływu na ureolizę lub aktywność enzymatyczną wybranych ureaz są jak dla mnie, osoby która nie uważa się za eksperta w badaniach inhibicji enzymów, przekonujące w warstwie merytorycznej. Spośród pytań, które jednak nasunęły mi się podczas lektury rozdziału proszę o odpowiedź na dwa pytania. W Tabeli 10 ukazującej m.in. wyniki badania aktywności N-podstawionych benzisoselenazol-3(2H)-onów oraz ich otwartych analogów diselenidowych na przebieg ureolizy prowadzonej przez całe komórki *P. mirabilis* PCM 543, *H. pylori* Tx30a istnieje znacząca różnica w ilości danych prezentujących uzyskane wartości IC_{50} dla wymienionych szczepów badanych gatunków bakterii. Proszę wyjaśnić skąd ta opisana różnica? Ta różnica, w moim odczuciu może mieć wpływ na merytoryczną poprawność przeanalizowanych danych tam gdzie autor odnosi wzajemnie do siebie uzyskane wyniki opisujące wpływ tych samych pochodnych na ureolizę obu testowanych mikroorganizmów wyrażoną wartościami IC_{50} (strona 124). Pozostając przy Tabeli 10 proszę o wyjaśnienie, czemu dla pochodnej SF3 nie została podana wartość IC_{90} dla *P. mirabilis* PCM 543?

Odnosnie celów badawczych zaprezentowanych w 3 i 4 punkcie rozdziału 2, wyniki i wnioski zaprezentowane w rozdziale 4, w mojej ocenie świadczą o ich udanej realizacji. Po przemyśleniu podzielam pogląd zaprezentowany przez autora w podsumowaniu (rozdział 5) dotyczący tych z przebadanych pochodnych ebselenu, które są obiecujące w badaniach nad

możliwością ich zastosowania w terapiach, których celem jest eradykacja z organizmu ureolitycznych mikroorganizmów chorobotwórczych, wykorzystujących system reduktazy tioredoksyny do kontrolowania stresu oksydacyjnego w ich komórkach. Za ważną nowość naukową pracy wpisującą się w dynamicznie rozwijający się na świecie nurt badań, uważam zaprezentowanie wyników badań nad możliwością wykorzystania wybranych związków w zwalczaniu mikroorganizmów w postaci biofilmu. Niektóre z badanych przez doktoranta związków okazały się zdolne do zahamowania i ograniczenia żywotności biofilmu *H. pylori* Tx30a. W tym względzie za szczególnie ważne uważam aby podkreślić wagę uzyskanych wyników wskazującą, że efekt ten obserwowano w stężeniach, które nie były większe niż minimalne stężenie hamujące wzrost tych bakterii w formie planktonicznej. Jest to wynik zachęcający do dalszych badań nad wybranymi pochodnymi ze względu na wagę jaką wzrost mikroorganizmów chorobotwórczych w postaci biofilmu odgrywa dla kolonizacji organizmu i wywoływania przewlekłych stanów chorobowych, dziś często bardzo trudnych do wyleczenia z wykorzystaniem dostępnych antybiotyków. Z drugiej strony, odnośnie podrozdziału 4.2.4.1. opisującego wyniki badania naryngeniny, jej pochodnych oraz oksymów na wzrost biofilmu wybranych gatunków bakterii patogennych, pragnę uczulić autora, że zastosowanie słów zaznaczonych podkreśleniem w następujących fragmentach zdań, cytuje: „...wzrost komórek bakteryjnych był znikomy w przypadku wszystkich badanych szczepów” (strona 155) oraz „... wobec biofilmu obydwu badanych szczepów Gram-ujemnych” (strona 158) jest nie poprawny. Z opisu metodyki badań (rozdział 3) i tekstu wspomnianego rozdziału wnioskuję, że w tych miejscach autor powinien pisać o gatunkach (strona 155) lub ewentualnie o wybranych szczepach badanych gatunków bakterii Gram-ujemnych (strona 158).

Podsumowując ocenę warstwy merytorycznej pracy doktorskiej Pana Wojciecha Tabora postanowiłem podzielić się kilkoma spostrzeżeniami. Po pierwsze autor opanował szeroki warsztat różnych umiejętności prowadzenie eksperymentów zarówno z zakresu mikrobiologii (optymalizacja hodowli mikroorganizmów jak i wpływu badanych związków chemicznych na ich wzrost zarówno w postaci planktonicznej jak i biofilmu) oraz szeroko pojętej enzymologii (metody oczyszczania enzymów i badania ich aktywności enzymatycznej). Po drugie nie tylko opanował ale też uzyskał w przeprowadzonych eksperymentach szereg wyników, z których wysnute wnioski przekonują mnie, że w ramach tej pracy doktorskiej została osiągnięta nowość naukowa. W mojej ocenie, uzyskana w ten sposób wiedza pozwala łączyć obiecujące

właściwości kilku zidentyfikowanych związków o właściwości inhibitorów badanych ureaz, z możliwością wykorzystania ich do dalszych badań w kierunku rozwoju być może nawet nowych leków działających na ureolityczne mikroorganizmy patogenne. Wskazane braki pracy z obowiązku wykonywanej przez mnie roli recenzenta w mojej ocenie nie umniejszają znacząco pozytywnego odbioru ocenianej rozprawy.

W tym miejscu pozwolę sobie z oceny merytorycznej pracy doktorskiej Pana Wojciecha przejść do oceny jej od strony zaprezentowanej formy pracy oraz zastosowanego w niej języka i graficznej prezentacji danych doświadczalnych. Praca doktorska Pana Wojciecha Tabora liczy 181 stron obejmujących 9 rozdziałów wliczając do tej liczby streszczenie pracy w języku polskim i angielskim. W mojej ocenie zaprezentowany układ pracy tj. podział treści w pracy na rozdziały zawierające przegląd literaturowy, materiały metody i osobny rozdział poświęcony prezentacji i dyskusji wyników jest przejrzysty i spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim przygotowywanym w postaci klasycznej rozprawy doktorskiej. Praca jest napisana poprawnym językiem polskim. Pracę łatwo się czytało i podczas lektury nie natrafiałem na poważne problem aby śledzić tok analizy wyników zaprezentowany przez autora w treści rozdziału 4. Jeśli miałem z tym problemy to wtedy gdy ze względu na brak szczegółowości opisu musiałem więcej poświęcić czasu na ocenę wniosków prezentowanych przez autora np. na stronie 96 autor pisze, cytuje „Jedynym wyjątkiem był inhibitor charakteryzujący się najbardziej rozgałęzioną strukturą”. Niestety autor w tekście nie podał o jaki konkretnie związek z badanej stosunkowo licznej grupy związków o podobnej strukturze mu chodziło. Przechodząc dalej w swojej ocenie, zaprezentowane w pracy tabele i rysunki są czytelne a treści przekazywane w legendach i tytułach są wystarczające dla ich zrozumienia. Forma, wybór i liczba cytowań (99 pozycji literaturowych) zaprezentowanych w rozdziale 6 nie budzi moich zastrzeżeń.

Mój pozytywny odbiór pracy i w jej świetle osoby doktoranta jako młodego naukowca dopełniła analiza załączonego przez niego w rozdziale 7 jego dorobku naukowego. Pan Wojciech Tabor jest współautorem 4 publikacji naukowych powiązanych z tematyką pracy doktorskiej, opublikowanych w recenzowanych czasopismach o ustalonej renomie naukowej. Prezentował, często jako pierwszy autor, wyniki swoich prac naukowych w postaci doniesień naukowych na konferencjach krajowych i zagranicznych. Pan Wojciech zdobył również doświadczenie jako wykonawca w grantie przyznanym w konkursie OPUS16 Narodowego Centrum Nauki.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr inż. Wojciecha Tabora zatytułowana „Inhibicja aktywności ureaz o zróżnicowanym pochodzeniu mikrobiologicznym” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Wojciecha Tabora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



(podpis)