

Lublin, 18 lipca 2023

Monika Janczarek
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
tel. 81-537-59-09
monika.janczarek@mail.umcs.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Wojciecha Tabora

pt. „Inhibicja aktywności ureaz o zróżnicowanym pochodzeniu mikrobiologicznym”,
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne

Rozprawę doktorską wykonano w Katedrze Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. inż. Artura Muchy oraz promotora pomocniczego dr Agnieszki Grabowieckiej.

Recenzję rozprawy doktorskiej wykonano w odpowiedzi na pismo nr 234/RDND10/2023 z dnia 21 czerwca 2023 przesłane przez Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej „Nauki Chemiczne” dr. hab. inż. Roberta Górę, prof. uczelni, informujące o powołaniu mnie w dniu 14 czerwca 2023 na recenzentkę rozprawy doktorskiej mgr. inż. Wojciecha Tabora.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma postać monografii liczącej 181 stron, łącznie z podsumowaniem, literaturą, streszczeniem i abstraktem. W pracy dołączono również informacje o dorobku naukowym Autora. Monografia to bardzo wymagająca forma prezentowania pracy naukowej, która wymusza konieczność panowania nad całością tekstu przez jedną osobę. Ale niewątpliwą zaletą tej formy prezentacji jest możliwość poznania indywidualnego spojrzenia Autora na swoje badania i uzyskanie z nich wyniki. Pan mgr inż. Wojciech Tabor, mając wsparcie w swoim Promotorze oraz Promotorze pomocniczym, perfekcyjnie sprostął podjętemu zadaniu. Doktorant miał również wyjątkową sytuację, bo wykonywał swoje badania w ramach grantu NCN OPUS16 pt. „Inhibitory ureazy o podwójnym mechanizmie działania i ich aktywność przeciwrulentna względem *Helicobacter pylori* i *Cryptococcus neoformans*” (2018/31/B/NZ6/02017), którego był stypendystą. Warto

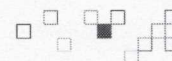
podkreślić, iż mgr inż. Wojciech Tabor posiada bardzo dobry dorobek naukowy, biorąc pod uwagę Jego obecny etap kariery naukowej, jest bowiem współautorem 4 publikacji w czasopiśmie: J. Med. Chem. (2021, 2023), Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem. (2022) i Eur. J. Med. Chem. (2023) oraz dziesięciu prezentacji na konferencjach naukowych.

Problem badawczy

Temat rozprawy doktorskiej mgr. inż. Wojciecha Tabora jest ściśle związany z tytułem projektu OPUS16, którego promotor prof. dr hab. inż. Artur Mucha był kierownikiem. Tematyka badawcza podjęta przez Doktoranta jest bardzo ważna i wciąż aktualna, ze względu na rosnący problem wielolekooporności mikroorganizmów patogennych. Problem ten wynika m.in. z narastającej oporności antybiotykowej patogenów spowodowanej stosowaniem zbyt dużych stężeń antybiotyków lub ich nieodpowiednim rodzajem, jak również niekontrolowanym dostępem do antybiotyków i niewystarczającej świadomości społecznej, szczególnie w krajach rozwijających się. Opracowania naukowe z 2019 r. wskazują, że wśród infekcji wywołanych przez szczepy bakteryjne odporne na dostępne obecnie antybiotyki najczęściej doprowadzające do śmierci pacjenta, znajdują się zakażenia układu moczowego, które zajmują w tej statystyce miejsce wyższe od gruźlicy. Do istotnych patogenów odpowiedzialnych za infekcje układu moczowego należy m.in. ureolityczny gatunek bakterii *Proteus mirabilis*, dla którego wykazano oporność nawet na kilka klas antybiotyków jednocześnie. Z tych powodów istnieje potrzeba intensywnego poszukiwania nowych strategii zwalczania patogenów wielolekoopornych i opracowania produkcji nowych terapeutyków skutecznych w eliminacji tych mikroorganizmów. Stąd tematyka badawcza podjęta przez Doktorantka i zespół Profesora Artura Muchy idealnie wpisuje się w aktualne potrzeby terapeutyczne mające na celu poszukiwanie nowych leków przeciw bakteriom ureolitycznym, stanowiącym istotne zagrożenie dla ludzi.

Ocena formalna rozprawy

Oceniana praca spełnia wymogi formalne. Tytuł pracy odpowiada treściom w niej zawartym, a opisywane w pracy zagadnienia dotyczą aktualnych trendów w zakresie poszukiwania nowych leków o działaniu przeciwbakteryjnym. Autor rozprawy uzyskał wiele ważnych i nowatorskich wyników w tej tematyce badawczej, które posiadają istotny walor poznawczy, ale także bardzo duży potencjał aplikacyjny. Ogółem dysertacja (181 stron) jest podzielona na dziewięć rozdziałów i zawiera 20 tabel oraz 34 rysunki. Struktura przedstawionej mi do oceny pracy odbiega nieco od klasycznego układu z powodu braku dwóch rozdziałów „Wnioski” i „Dyskusja”, które standardowo zawierają wnioski oraz dyskusję uzyskanych wyników na tle aktualnej wiedzy naukowej w tym zakresie. W mojej opinii

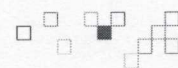


rozdziały takie powinny znaleźć się w takim opracowaniu naukowym. Pięć rozdziałów dysertacji ma charakter merytoryczny (Studia literaturowe, Cel pracy, Materiały i metody, Badania własne, Podsumowanie) a cztery rozdziały charakter pomocniczy (Streszczenie, Abstrakt, Literatura, Dorobek naukowy Autora). Dodatkowy podział tych rozdziałów na wiele podrozdziałów sprawia, że praca jest przejrzysta i czytelna. Co należy podkreślić, praca została przygotowana w sposób bardzo staranny, zarówno pod względem merytorycznym, jak też graficznym oraz napisana bardzo dobrym językiem, z prawidłowym zastosowaniem terminów naukowych, dzięki czemu czytało się ją z ogromną przyjemnością.

W pracy rozdział „Studia literaturowe” (38 stron) jest bardzo bogatym przeglądem literatury obejmującym aktualne zagadnienia dotyczące oporności antybiotykowej i czynników wirulencji mikroorganizmów patogennych, w tym bakteryjnych ureaz, jak też opis głównych mechanizmów działania różnego typu inhibitorów tych enzymów. Rozdział został napisany bardzo szczegółowo, precyzyjnie i wzbogacony o wzory strukturalne opisywanych związków. Treść tego rozdziału zawiera wiele szczegółowych danych, które są bardzo dobrym wprowadzeniem do tematyki badawczej Doktoranta. W źródłach literaturowych jest obecnie niewiele informacji dotyczących mechanizmów funkcjonowania ureazy *Cryptococcus neoformans* oraz systemów kontroli aktywności tego enzymu. *C. neoformans* jest gatunkiem grzyba będącym oportunistycznym patogenem wywołującym infekcję dróg oddechowych, która może doprowadzić do śmierci pacjentów o obniżonej odporności. Z tych powodów, Doktorant podjął się ambitnego zadania szczegółowego scharakteryzowania tego enzymu oraz jego funkcjonowania.

Celem rozprawy doktorskiej było poszukiwanie nowych struktur chemicznych wykazujących aktywność inhibitorową wobec ureaz pochodzenia mikrobiologicznego. Rozdział „Cel pracy” został jasno i precyzyjnie sformułowany. Cel ten osiągnięto w pełni, realizując następujące zadania badawcze:

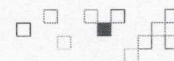
- (i) pozyskanie preparatów ureaz z dwóch mikroorganizmów *S. pasteurii* i *C. neoformans* o wysokim stopniu czystości;
- (ii) zbadanie kilkunastu grup związków pod kątem ich aktywności jako inhibitorów ureolizy (badania te prowadzono na oczyszczonych preparatach białkowych oraz całych komórkach mikroorganizmów);
- (iii) badanie zdolności najbardziej obiecujących terapeutycznie związków (tj. pochodnych ebselenu) do inhibicji systemu reduktazy tioredoksyny i pośredniego generowania stresu oksydacyjnego w komórkach mikroorganizmów;
- (iv) określenie zdolności wybranych związków o potwierdzonym działaniu inhibitorowym ureolizy do zahamowania wzrostu bakteryjnego biofilmu.



W rozdziale „Materiały i metody” Doktorant w sposób bardzo dokładny i wyczerpujący opisał zastosowany materiał biologiczny oraz wykorzystane metody i techniki badawcze (29 stron). Na podkreślenie zasługuje bogaty warsztat metodyczny Doktoranta oraz ogromna liczba związków, które zostały poddane analizom.

Podobnie rozdział „Badania własne” został przygotowany przez Doktoranta bardzo szczegółowo (82 strony), a uzyskane wyniki opisano dokładnie i drobiazgowo w dwóch obszernych rozdziałach, które zawierały liczne podrozdziały. Rozdział pierwszy zawiera wyniki dotyczące pozyskiwania i charakterystyki własności ureaz pochodzenia mikrobiologicznego. W tej części pracy Doktorant określił optymalne warunki hodowli bakterii ureolitycznych, jak też indukcji procesu ureolizy oraz izolacji i oczyszczenia ureaz. Wykazano, że minimalne podłoże Christensena jest optymalne do hodowli szczepu *C. neoformans* IHEM3969 oraz potwierdzono negatywny wpływ obecności dodatkowego źródła azotu (tj. peptonu w ilości 1g/L) i łatwo przyswajalnego źródła węgla (glukozy w stężeniu 0,1%) na intensywność ureolizy. Ponadto wykazano, że glukoza eliminuje aktywność ureolityczną komórek grzybowych (24-godz. hodowla), a dodatek mocznika w wyższych stężeniach (2%) znacząco obniża szybkość wzrostu komórek i ich żywotność (o 40-45%). Z tych powodów opracowano skuteczną strategię dwuetapowej hodowli, opierającą się na (i) szybkim namnażaniu biomasy drożdży i (ii) indukcji ureolizy przez dodanie mocznika (1%) i jonów Ni^{2+} (0,1 mM), których wiązanie koordynacyjne z centrum aktywnym enzymu jest bardzo istotne dla aktywności tego biokatalizatora. Doktorant uzyskał oczyszczoną ureazę wyizolowaną z komórek *C. neoformans* IHEM3969 oraz określił własności i parametry kinetyczne tego enzymu ($V_{max} = 0,0193$ mM/min, stałą Michaelisa = 9,57 mM, optymalną temperaturę 55°C) (Rys. 21-22). Aby zredukować intensywność parowania składników mieszanin reakcyjnych, zastosowano w testach enzymatycznych 30°C (co odpowiadało ~50% maksymalnej aktywności enzymu w temp. 55°C). Wyniki uzyskane z tej części badań uważam za bardzo ważne i niezbędne jako wprowadzenie do dalszych analiz. W mojej opinii, warto byłoby wykonać jeszcze analizę SDS-PAGE, w celu wizualizacji stopnia czystości uzyskanych preparatów białkowych oraz określenia masy cząsteczkowej badanej ureazy. Innym zagadnieniem wartym przeprowadzenia dokładniejszej analizy byłoby określenie wpływu szerokiego zakresu stężeń mocznika na żywotność komórek *C. neoformans* IHEM3969. W związku z tym, mam pytanie do Doktoranta czy zastosowane stężenie 1% mocznika nie było zbyt wysokie w kontekście wpływu tego związku na żywotność komórek tego szczepu i jak to mogło wpłynąć na intensywność ureolizy określanej w hodowli całych komórek?

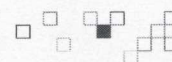
W drugim rozdziale „Badania własne” mgr inż. W. Tabor opisał uzyskane wyniki dotyczące nowych związków i ich pochodnych jako inhibitorów aktywności ureaz pochodzenia mikrobiologicznego. Doktorant wykonał bardzo dużą liczbę analiz i oznaczeń biochemicznych wielu



związków należących do różnych grup: analogów substratu – związków zawierających fragment strukturalny tiomocznika (kilkadziesiąt związków należących do 4 podgrup: tiosemikarbazonów, tiokarbohydrazonów, tiazolilowych pochodnych tiomocznika, pochodnych dipirydynowych), związków fosfinianowych i fosfonianowych, związków selenoorganicznych i flawonoidowych. Docenić należy ogrom pracy włożony przez Doktoranta w tej części badań. Aktywność inhibitorową analogów substratu sprawdzono wykorzystując oczyszczoną ureazę z komórek *S. pasteurii* CCM 2056. Wykazano że spośród 32 badanych związków, znacząca większość jest skutecznymi inhibitorami ureaz i są one inhibitorami szybkowiązącymi (K_i poniżej 100 μM) (tabela 1). Spośród nich, struktury oznaczone jako TA2 i TA5, okazały się najskuteczniejszymi inhibitorami ($K_{i\text{TA}2}=0,998$ i $K_{i\text{TA}5}=0,391$ μM). Natomiast, TB3 okazał się najskuteczniejszym związkiem w grupie pochodnych tiokarbohydrazonowych ($K_i=2,237$ μM), a TC4 wśród tiazolilowych pochodnych tiomocznika, zawierających dodatkowy pierścień aromatyczny ($K_i=2,759$ μM). Podobną skuteczność wykazywał związek TD4 należący do czwartej podgrupy badanych analogów substratu (pochodnych dipirydynowych) ($K_i=5,551$).

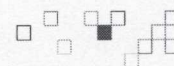
Następnie Doktorant podjął się uzasadnionego w mojej ocenie sprawdzenia efektywności działania tych związków na całych komórkach mikroorganizmów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w celu określenia zdolności ich przenikania przez osłony komórkowe. Badania te zostały powtórzone na szczepach *S. pasteurii* CCM 2056 i *P. mirabilis* PCM 543 (tabela 1). W tym eksperymencie Doktorant zaobserwował, że rodzaj podstawników istotnie wpływa na efektywność inhibicji ureolizy i efekt ten jest niezależny od rodzaju osłon komórkowych mikroorganizmów. Wykazano, że wprowadzenie grupy metoksyłowej prowadziło do znaczącego obniżenia aktywności inhibitorowej związków, zaś dodanie grupy hydroksyłowej do pierścienia aromatycznego zwiększało hamowanie aktywności ureolitycznej. Również w przypadku zastosowania całych komórek, najbardziej skutecznymi inhibitorami były pochodne tiosemikarbazonów: struktura wyjściowa pozbawiona dodatkowych modyfikacji (TA1), pochodna *para*-metylofenylowa (TA20 i pochodna dimetoksyłowa (TA4). W mojej ocenie, wyniki te są bardzo wartościowe i o dużym potencjale aplikacyjnym, gdyż związki te, charakteryzując się wysoką polarnością, sztywnością i strukturą planarną, mogą efektywnie przenikać do komórki przez błony komórkowe, co nadaje im dużą skuteczność działania w niskich zastosowanych stężeniach. Warto byłoby to jednak potwierdzić w sposób bezpośredni, stosując np. wyznakowane inhibitory i ustalić ich stężenie wewnątrzkomórkowe.

W dalszej części pracy Doktorant sukcesywnie poddał analizie kolejną grupę związków jako potencjalnych inhibitorów ureaz, tj. związki fosfonowe oparte na strukturze kwasu cynamonowego. Spośród tych związków jedynie C1 okazał się efektywnym inhibitorem ureazy *S. pasteurii* CCM 2056, działającym według modelu kompetycyjnego (tabela 2). W przypadku fosfonowych i



fosfinowych pochodnych katecholu obliczono dwa parametry dla tych związków, w celu określenia ich aktywności inhibicyjnej (wartość K_i stałej dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor, która daje informacje o specyficzności wiązania oraz wartość k_{inact}/K_i stałej szybkości inaktywacji enzymu przez badany związek, która określa aktywność inhibitora). KA3 okazał się niezwykle skutecznym inhibitorem ureazy spośród tej grupy związków, o mechanizmie działania nieodwracalnej inhibicji poprzez kowalencyjne związanie kluczowej reszty cysteiny Cys322 ($k_{inact}/K_i=10420 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$). Ten związek okazał się wysoce skuteczny, zarówno w przypadku oczyszczonej ureazy *S. pasteurii*, jak też wobec całych komórek bakterii *P. mirabilis*. Doświadczenia z zastosowaniem czynnika protekcyjnego w postaci ditiotretitolu (DTT) potwierdziły znaczenie wiązania grupy tiolowej cysteiny przez strukturę katecholu w mechanizmie inhibicji (tabela 4). Finalnie, przebadano skuteczność tych związków na komórkach *H. pylori*, wykorzystując szcep Tx30a defektywny w syntezie toksyny wakuolizującej, co spowodowało zwiększenie jego przeżywania w warunkach tlenowych. Ze względu na wrażliwość tego szczepu na warunki tlenowe, testowano związki inhibitorowe według procedury pozbawionej etapu 1 godz. preinkubacji. Co ciekawe, wyniki uzyskane dla tego szczepu korelowały z wynikami wcześniej uzyskanymi dla ureazy *S. pasteurii* (SPU), wskazującymi że związki KB4, KB7 i KB2 były najskuteczniejszymi inhibitorami tych enzymów.

W ramach tej dysertacji Doktorant przebadał również 10 pochodnych związków selenoorganicznych zawierających długie nierozgałęzione łańcuchy alifatyczne (powyżej 6 węgli) (tabela 7) i wykazał zależność pomiędzy długością łańcucha węglowodorowego a aktywnością inhibitorową związków. Poczyniono ciekawą obserwację, że wydłużanie łańcucha negatywnie wpływało na zdolność hamowania ureolizy. Najlepszym inhibitorem okazała się struktura SD1 zawierająca łańcuch n-oktylowy. Spośród grupy 28 chiralnych związków selenoorganicznych przetestowanych na oczyszczonej ureazie *S. pasteurii*, najbardziej aktywnym inhibitorem okazała się struktura SC8 zawierająca podstawnik (R)-1-naftyloetylowy (tabela 9). Doktorant przeprowadził również rozszerzone badania na komórkach dwóch bakterii Gram-ujemnych *P. mirabilis* i *H. pylori* dla związków N-arylowych i N-aryloalkilowych pochodnych benzisoselenazolonu, wcześniej scharakteryzowanych przez dr inż. Katarzynę Macegoniuk (tabela 10) na ureazie oczyszczonej z *S. pasteurii*, co pozwoliło na dokonanie analizy porównawczej aktywności tych związków wobec ureaz różnych patogenów. Bardzo ciekawym spostrzeżeniem było wykazanie, że aktywność tych związków jest znacznie niższa w przypadku bakterii *H. pylori* niż *P. mirabilis*, co może wynikać z różnic strukturalnych enzymów u tych bakterii. W mojej ocenie jest to bardzo istotna obserwacja, która mogłaby być zweryfikowana w przyszłości. Ebselen oraz dwie jego pochodne SF14 i SF27 zostały wybrane do określenia wpływu tych związków na żywotność komórek *H. pylori* Tx30a w formie planktonicznej oraz w strukturze biofilmu (Rys. 30-31 i tabela 11). Dodatkowym aspektem badanym



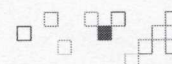
było sprawdzenie czy N-alkilowe i N-fenylowe pochodne benzisoselenazol-3(2H)-nów mają zdolność generowania stresu oksydacyjnego, podobnie jak ebselen. Te badania wykonano wykorzystując komórki *C. neoformans*. Potwierdzono, że testowane pochodne ebselenu wykazują aktywność przeciwutleniającą; najbardziej aktywne były związki SF27 i SF25 (tabela 14).

W ostatnim etapie badań Doktorant określił aktywność inhibitorową N-benzylowych, fosfonowych i N-fosfonoalkilowych pochodnych benzisoselenazo-3(2H)-nu (tabele 16-18), stosując oczyszczoną SPU i całe komórki *H. pylori*. Potwierdzono najwyższą aktywność diestrów, natomiast monoestry były najsłabszymi inhibitorami, a związki pozbawione atomu selenu okazały się całkowicie nieaktywne.

W kolejnych etapach pracy skupiono się na ocenie wpływu związków flawonoidowych (tj. pochodnych naryngeniny i ich oksymów) jako inhibitorów wzrostu biofilmu trzech bakterii patogennych (*P. mirabilis* PCM 543, *P. aeruginosa* PCM 499 i *S. aureus* PCM 2054). Dokonano ważnych obserwacji i potwierdzono negatywny wpływ tych związków (w stężeniu 100 ug/mL), zwłaszcza pochodnych oksymów na wzrost tych bakterii w formie planktonicznej oraz w biofilmie. Dużo bardziej były skuteczne te związki wobec Gram-dodatniej bakterii *S. aureus* PCM 2054 niż wobec Gram-ujemnych bakterii *P. mirabilis* PCM 543, *P. aeruginosa* PCM 499.

W podsumowaniu, Doktorant w ramach tej dysertacji uzyskał bardzo dużo wyników dotyczących różnych grup związków. Dlatego rozdział „Dyskusja” oraz „Wnioski” pomogłyby recenzentowi ustalić jakie wyniki Autor uznaje za najważniejsze i które mają największą szansę wykorzystania terapeutycznego. Ponadto, rozdziały te pozwalają na odniesienie wyników swoich badań w stosunku do aktualnego stanu wiedzy w badanej tematyce i wskazania swoich nowatorskich osiągnięć w tym zakresie. Co prawda Doktorant zawarł bardzo dużo informacji na ten temat w rozdziale „Studia literaturowe” oraz „Badania własne”, jednak w opinii recenzenta dodatkowe opracowanie rozdziałów „Dyskusja” oraz „Wnioski” byłoby znaczącym podsumowaniem własnej pracy i możliwością pokazania swojej dojrzałości naukowej. Niemniej, ta uwaga nie umniejsza znacząco mojej bardzo dobrej całościowej opinii na temat przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Pytania do dyskusji: w odniesieniu do badań zawartych w rozprawie, ze szczególnym uwzględnieniem wyników w drugim rozdziale „Badań własnych” prosiłabym o wyjaśnienie przez Doktoranta, dlaczego sprawdzając inhibitorową aktywność różnych związków nie testował ich wykorzystując ten sam zestaw ureaz, tj. oczyszczony enzym z *S. pasteurii* (SPU) oraz całe komórki szczepów *H. pylori*, *P. mirabilis*, *S. pasteurii* oraz *C. neoformans* (przynajmniej dla najbardziej efektywnych związków reprezentantów poszczególnych grup)? W pracy podczas badania poszczególnych grup związków były wykorzystywane różnego źródła ureazy. Zastosowanie tego samego zestawu ureaz pozwoliłoby na lepsze porównanie aktywności badanych związków z różnych



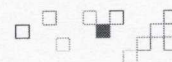
podgrup oraz poszczególnych ureazy ze sobą? Ponadto, dlaczego do badań żywotności komórek *H. pylori* i *P. mirabilis* planktonicznych i w biofilmie wykorzystano tylko pochodne ebselenu (Rys. 30-31), a nie testowano związków z innych grup? Podobnie wpływ naryngeniny i jej pochodnych do hamowania wzrostu i tworzenia biofilmu badano na bakteriach *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* (tabela 19), a nie zbadano wpływu tych związków na *H. pylori* czy *S. pasteurii*, *C. neoformans*? Zbadanie wpływu przedstawicieli związków z różnych grup na żywotność komórek innych mikroorganizmów wykorzystanych w tej rozprawie mogłoby dostarczyć dodatkowych interesujących informacji. W odniesieniu do stabilności struktur badanych związków, czy badane związki w warunkach prowadzonych reakcji były wystarczająco trwałe aby wykluczyć wpływ ich stabilności na zaobserwowane różnice w aktywności inhibicyjnej?

Podsumowując, mgr inż. W. Tabor uzyskał wiele ważnych i wartościowych wyników dotyczących nowych grup związków aktywnych jako inhibitory ureaz pochodzenia bakteryjnego i grzybowego. Wykorzystanie drożdży *Cryptococcus neoformans* jako modelu badawczego do określenia właściwości tego typu enzymu oraz jego mechanizmu działania i inhibicji było bardzo dobrym celem badawczym, którego realizacja dostarczyła wielu istotnych wyników. Przebadanie ponad 200 struktur pod kątem ich aktywności inhibitorowej ureolizy dla oczyszczonego enzymu oraz obecnego w komórkach różnych patogennych bakterii było ogromnym wyzwaniem, z którego Doktorant wywiązał się znakomicie. Z ogromu uzyskanych wyników można wywnioskować, że pochodne ebselenu w większości przypadków były najbardziej aktywnymi związkami w tym procesie (pochodna SF14 wobec *P. mirabilis* oraz SP1 wobec *H. pylori*). Doktorant udowodnił, że pochodne ebselenu mogą prowadzić do generowania stresu oksydacyjnego w komórkach mikroorganizmów, co czyni te związki obiecującymi cząsteczkami bifunkcjonalnymi do eliminacji mikroorganizmów ureolitycznych.

W konkluzji recenzji, chciałabym pokreślić szeroki zakres prac przeprowadzonych przez mgr. inż. Wojciecha Tabora, złożoność i czasochłonność eksperymentów z użyciem wielu związków oraz licznych preparatów mikrobiologicznych. Dzięki dużemu zaangażowaniu, wytrwałości i pracowitości Doktorant zgromadził bardzo dużą ilość wartościowych wyników oraz poczynił wiele ciekawych obserwacji, które przyczyniły się do zwiększenia naszej wiedzy na temat mechanizmów działania ureaz pochodzenia bakteryjnego i grzybowego oraz związków o aktywności inhibitorowej wobec tych enzymów.


Wniosek końcowy

Podsumowując, praca Pana mgr. inż. Wojciecha Tabora **spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim** (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, Dz.U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm.) przede wszystkim ze względu na: (i) aktualny problem



naukowy, którego rozwiązanie jest istotne dla poprawy leczenia infekcji spowodowanych ureolitycznymi bakteriami patogennymi, (ii) dostarczenie nowej wiedzy w temacie inhibicji ureolizy bakterii patogennych i poszukiwania nowych związków będących skutecznymi inhibitorami ureaz pochodzenia mikrobiologicznego, (iii) odkrycie nowych związków o potencjalnych własnościach terapeutycznych, które są efektywne w hamowaniu aktywności ureaz. Doktorant jasno sprecyzował cel swoich badań, opracował metodykę hodowli i oczyszczania ureazy z komórek *C. neoformans*, precyzyjnie wykonał analizy biochemiczne i mikrobiologiczne dla ogromnej liczby związków i kilku mikroorganizmów patogennych, niosących zagrożenie zdrowotne dla człowieka. Uważam, że **Doktorant w pełni opanował warsztat badawczy** niezbędny do rozwiązywania problemów w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie Nauki Chemiczne. Doktorant udowodnił, że jest przygotowany do rozwiązywania wieloaspektowych zadań badawczych. **Składam więc wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej „Nauki Chemiczne” Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie** Pana mgr. inż. Wojciecha Tabora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na zastosowany w pracy bardzo bogaty materiał analityczny oraz nowatorskie wyniki mające charakter poznawczy i aplikacyjny, w mojej ocenie pracę należy uznać za wyróżniającą się. Biorąc także pod uwagę bardzo duże zaangażowanie Doktoranta w opracowanie i obszerne opisanie uzyskanych wyników **wnoszę o wyróżnienie pracy** doktorskiej stosowną Nagrodą przez Radę Naukową Dyscypliny „Nauki Chemiczne” Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.


Prof. dr hab. Monika Janczarek

