

**Prof. dr hab. Maria Koziolkiewicz,**  
*Instytut Biochemii Technicznej*  
*Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności*  
*Politechnika Łódzka*  
ul. Stefanowskiego 4/10  
90-924 Łódź

---

Łódź, 18 stycznia 2019r.

## RECENZJA

**Rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Greli na temat:  
"Inhibitory ureazy ograniczające  
rozwój patogennych szczepów ureolitycznych"**

Praca doktorska mgr inż. Ewy Greli została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej (Zakład Chemii Bioorganicznej) pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Pawła Kafarskiego i doktor Agnieszki Grabowieckiej jako promotora pomocniczego. Badania dotyczyły określenia właściwości antybakteryjnych i antyureolitycznych trzech grup związków: pochodnych kwasu aminometylofosfonowego, pochodnych ebselenu oraz wybranych flawonoidów (łącznie ponad 100 związków chemicznych).

Praca doktorska mgr inż. Ewy Greli wpisuje się w szeroki nurt badań dotyczących nowych związków o działaniu przeciwbakteryjnym, toteż Doktorantka dokonuje na wstępie analizy metod oznaczania żywotności mikroorganizmów, aby w następnym rozdziale przejść do zastosowania soli tetrazolowych w badaniach mikrobiologicznych. Chociaż takie związki jak MTT (bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-tetrazolowy) i MTS (3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-5-(3-karboksymetoksyfenilo)-2-(4-sulfofenilo)-2H-tetrazol) są powszechnie wykorzystywane do oznaczania aktywności metabolicznej komórek eukariotycznych, wiedza o wadach i ograniczeniach opartych na nich testów jest niepełna i fragmentaryczna. Dotyczy to szczególnie zasadności stosowania testu MTT w badaniach mikrobiologicznych. Pani mgr inż. Ewa Greli planując zastosowanie soli tetrazolowych do badania żywotności komórek prokariotycznych, uznała za konieczne przeanalizowanie danych literaturowych na temat różnych wariantów testu MTT, stosowanych rozpuszczalników organicznych, a także czynników odpowiedzialnych za „fałszowanie”

wyników tego testu. Autorka definiuje parametry wpływające na efektywność redukcji soli tetrazolowej przez komórki prokariotyczne. Są to struktura soli i jej zdolność do penetrowania komórek, wiek i warunki hodowli oraz rodzaj szczepu bakterii. Za bardzo wartościowe uważam zebranie w Tabeli 5b czynników chemicznych, które zakłócają oznaczenia z użyciem testu MTT. Doktorantka podkreśla, że pomimo szerokiej obecności tego testu w mikrobiologii, do dnia dzisiejszego nie zostały zdefiniowane żadne standardy pozwalające na jego efektywne wykorzystanie i porównywanie danych literaturowych. Podrozdziały 1.2 – 1.3 uważam za bardzo interesujące i godne polecenia każdemu badaczowi, który prowadzi badania z wykorzystaniem soli tetrazolowych. Jest to także wstęp do istotnego fragmentu jej pracy eksperymentalnej dotyczącego optymalizacji testu MTT (rozdział 4.1.2.1).

Druga część „Wstępu teoretycznego” dotyczy ureazy bakteryjnej oraz znanych dotychczas inhibitorów tego enzymu z kwasem aceto hydroksamowym na czele. Jest to jedyny inhibitor ureazy zatwierdzony przez FDA do leczenia zakażeń układu moczowego. Z drugiej strony, jak podkreśla Doktorantka, kwasy hydroksamowe wykazują działanie teratogenne. Do efektywnych inhibitorów ureazy należą także amidy kwasu fosforowego, związki aminometylofosfinowe, pochodne selenoorganiczne oraz niektóre związki pochodzenia naturalnego (np. kwercetyna). Warto w tym miejscu podkreślić, że Zakład Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej ma duży udział w poszukiwaniu efektywnych inhibitorów ureazy bakteryjnej, o czym świadczy chociażby cytowana przez Doktorantkę literatura.

Celem pracy mgr inż. Ewy Greli była identyfikacja związków o nieznanym dotychczas właściwościach antybakteryjnych i antyureolitycznych względem całych komórek. Obiektem jej zainteresowań stało się 60 flawonoidów o nieznanym dotychczas aktywności antyureolitycznej, a także 20 pochodnych kwasu aminometylofosfonowego i 27 pochodnych ebselenu, których aktywność inhibitorowa wobec ureaz bakteryjnych została już wcześniej opisana, ale ich aktywność antybakteryjna – jeszcze nie. Wśród związków pochodzenia naturalnego pochodzących z Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu znalazły się chalkony, flawony i flawanony.

Doktorantka badała aktywność antybakteryjną związków fosforoorganicznych i ich zdolność do zahamowania ureolizy całych komórek wobec bakterii *Proteus mirabilis* PCM543. Związki te zostały wcześniej zbadane względem oczyszczonych ureaz bakteryjnych,



więc wyniki otrzymane dla całych komórek *Proteus mirabilis* dostarczyły Pani Ewie Greli ciekawego materiału porównawczego oraz pozwoliły wytypować dwa związki (3a i 13a) jako inhibitory bardziej efektywne niż wzorcowy inhibitor – kwas acetohydroksamowy (AHA). Doktorantka potraktowała eksperymenty z zastosowaniem komórek *Proteus mirabilis* jako wstęp do kolejnego etapu, mianowicie określenia aktywności antybakteryjnej badanych pochodnych aminofosfinowych wobec komórek *Helicobacter pylori*199, które ekspresjują (a nie: ekspresjonują) konstytutywnie nie tylko cytozolową, ale także błonową ureazę, która wskutek słabego wiązania z błoną może się znaleźć w płynie hodowlanym. W tym wypadku aktywność antyureolityczna badanych związków, mierzona wartością IC<sub>50</sub>, nie wyglądała już tak optymistycznie: ich efektywność wobec *H. pylori* była znacząco niższa w porównaniu z *P. mirabilis*, co można tłumaczyć m.in. wysokim poziomem ekspresji genu ureazy *H. pylori* (nawet 10% białek obecnych w komórce).

Istotnym elementem tego etapu prac była również optymalizacja testu MTT – Doktorantka zdawała sobie sprawę, że wystandardyzowanie go mogłoby znacznie ułatwić badania, a nawet ułatwić identyfikację mechanizmu odpowiedzialnego za antybakteryjne działanie analizowanych związków. Liczący 13 stron podrozdział 4.1.2.1 zawiera opis eksperymentów przeprowadzonych w celu optymalizacji testu MTT, a jego podsumowanie stanowi Tabela 13, gdzie podano parametry testu MTT zoptymalizowanego względem *P. mirabilis* PCM543. Uważam ten rozdział za jeden z ważniejszych fragmentów rozprawy doktorskiej mgr Ewy Greli.

Pewne rozbieżności obserwowane w toku oznaczeń bazujących na integralności błony bakteryjnej (test MTT i barwienia fluorescencyjne) sugerowały, że niektóre pochodne kwasu aminometylofosfonowego, np. te o dłuższych podstawnikach alifatycznych mogą uszkadzać błony komórkowe i, chociaż same nie wykazują znaczącej aktywności antybakteryjnej, mogą przyczyniać się do zwiększenia przepuszczalności membran np. dla antybiotyków. Po raz kolejny mgr inż. Ewa Greli wykazała się dociekliwością i pasją badawczą: chcąc potwierdzić działanie niektórych aminofosfinianów jako permeabilizatorów wykorzystwała barwienia fluorescencyjne, aby potwierdzić uszkodzenia błony zewnętrznej oraz test z ONPG (2-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozydem) jako substratem β-galaktozydazy, aby zbadać możliwość uszkodzeń błony wewnętrznej. β-galaktozydaza zlokalizowana jest w przestrzeni cytoplazmatycznej i potwierdzenie jej aktywności po godzinnej inkubacji komórek bakterii *E. coli* PCM2057 z substratem ONPG i potencjalnym permeabilizatorem oznaczało uszkodzenie

błony wewnętrznej. Co ciekawe, nie wszystkie aminofosfiniany o wydłużonym łańcuchu alifatycznym w taki sam sposób uszkadzały błony bakteryjne.

Podczas gdy, zdolności aminofosfinianów oraz związków selenoorganicznych do hamowania bakteryjnej ureazy poznano już wcześniej, a Doktorantka skupiła się raczej na mechanizmach odpowiedzialnych za aktywność antybakteryjną tych związków, w przypadku flawonoidów należało zacząć od badań przesiewowych z wykorzystaniem roślinnej ureazy z *Canavalia ensiformis* oraz ureazy z *Proteus mirabilis* i całych komórek *P. mirabilis*. Spośród 21 flawonoidów hamujących aktywność ureazy bakteryjnej, tylko sześć hamowało ureolizę całych komórek *P. mirabilis*. Najwyższą aktywność stwierdzono dla hydroksychalkonu oraz izoksantohumolu ( $IC_{50}$  poniżej 200  $\mu\text{g/ml}$ ), jednak to nie flawonoidy, ale związki selenoorganiczne okazały się najefektywniejszymi inhibitorami ureolizy całych komórek *P. mirabilis* (z wartościami  $IC_{50}$  poniżej 5  $\mu\text{M}$ ). Silne właściwości antyureolityczne badanych związków na ogół nie przekładały się na ich aktywność antybakteryjną, wskazując na istnienie zróżnicowanych mechanizmów odpowiedzialnych za te efekty. Wyjaśnienie niektórych z tych mechanizmów Doktorantka planuje w trakcie dalszych badań.

Praca doktorska mgr inż. Ewy Greli została zrealizowana z wykorzystaniem szerokiego warsztatu badawczego, ale o jej wartości decyduje przede wszystkim dociekliwość i pasja badawcza Doktorantki oraz jej krytyczne podejście do, zdawałoby się, klasycznych już metod stosowanych w badaniach aktywności biologicznej związków chemicznych.

Podsumowując, bardzo pozytywnie oceniam rozprawę doktorską mgr inż. Ewy Greli. Stwierdzam, iż powyższa rozprawa odpowiada wymogom stawianym przez ustawę „O tytule naukowym i stopniach naukowych” i przedstawiam Radzie Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie Pani Ewy Greli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką jakość prowadzonych przez Nią badań, opublikowanie otrzymanych wyników w postaci 7 publikacji naukowych w czasopismach o wartościach współczynnika oddziaływania (IF) w zakresie 1,36 - 6,26, współautorstwo w jednym patencie i siedmiu zgłoszeniach patentowych – proszę Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o rozważenie możliwości wyróżnienia rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Greli, o ile oczywiście Doktorantka spełniła inne warunki niezbędne do otrzymania wyróżnienia.