

Prof. dr hab. Wojciech Rypniewski
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Zakład Struktury i Funkcji Biomolekuł
e-mail: wojtekr@ibch.poznan.pl
tel: 61-8528503
fax: 61-8520532

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Greli
pt. „Inhibitory ureazy ograniczające rozwój patogennych szczepów ureolitycznych”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotorskim prof. dr hab. inż. Pawła Kafarskiego z promotorem pomocniczym dr Agnieszką Grabowiecką w Zakładzie Chemii Bioorganicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. W rozprawie badane są właściwości trzech serii związków, w sumie jest ich ponad sto, pod kątem ich aktywności jako inhibitorów ureazy mikroorganizmów patogennych, a także ich wpływ na żywotność całych komórek. Część pracy ma charakter metodologiczny.

Ureaza jest enzymem występującym w wielu organizmach, katalizuje hydrolizę mocznika, uwalniając ditlenek węgla i amoniak. Jest celem terapeutycznym w *H. pylori*, gdyż patogen ten, infekujący dużą część ludzkości, zdolny jest przeżyć w żołądku dzięki aktywności ureazy, która lokalnie neutralizuje silnie kwaśny żołądkowy odczyn pH. Także oportunistyczne patogeny bakteryjne rodzaju *Proteus*, infekujące układ moczowy, produkują ureazę, a alkaliczny odczyn moczu, który jest skutkiem działania tego enzymu, może być przyczyną powstawania kamieni nerkowych.

Cele badań zostały zdefiniowane po wstępie teoretycznym, na str. 34. Doktorantka podjęła się charakterystyki szeregu pochodnych flawonoidów pod kątem ich ewentualnej aktywności antyureolitycznej względem oczyszczonej ureazy. Następnym zadaniem było zweryfikowanie efektywności inhibitorowej tych oraz dwóch innych grup związków na całych komórkach szczepów bakterii ureolitycznych. Następnie doktorantka podjęła się optymalizacji metod testujących żywotność badanych patogenów, by potem określić kilkoma metodami aktywność antybakteryjną wybranych związków. Cele i zakres pracy zilustrowane są klarownym schematem. Uważam, że problemy jakie doktorantka podjęła się rozwiązać są interesujące z poznawczego punktu widzenia i dotyczą ważnego obszaru badań. Zatem teza naukowa postawiona przez doktorantkę jest wartościowym tematem rozprawy doktorskiej.

Układ i edycja rozprawy. Rozprawa liczy przeszło 160 stron z suplementami i obszerną bibliografią i jest podzielona na rozdziały w następujący sposób. Po wstępie teoretycznym przedstawione są cel badań i zakres pracy. Potem następują metodyka, wyniki wraz z dyskusją i podsumowanie. Rozprawa przygotowana jest w sposób bardzo staranny, napisana jest poprawną polszczyzną, stylistycznie na dobrym poziomie. Tekst jest ilustrowany licznymi wykresami, tabelami i fotografiami. Stwierdzam, że doktorantka wykazuje umiejętność właściwego przedstawienia uzyskanych wyników. Dobrze oceniam styl i przejrzystość rozprawy oraz jej poziom edytorski.

Część literaturowa. Wstęp jest treściwym wprowadzeniem w tematykę rozprawy. Najpierw zdefiniowana jest żywotność mikroorganizmów i metody jej oznaczania. Jedną z tych metod, czyli oznaczanie solami tetrazolowymi (MTT) jest opisana bardziej szczegółowo.

Doktorantka zwraca przy tym uwagę, że mimo szerszego zastosowania tej metody w mikrobiologii, nie wyznaczono dotychczas jednolitych standardów, pozwalających na porównanie wyników różnych badań. Problemem tym zajmuje się w dalszej części swojej pracy. W kolejnych podrozdziałach wstępu doktorantka przedstawia ureazę i patogenne szczepy bakterii, dla których ten enzym jest niezbędny: w szczególności *Helicobacter pylori* infekujący żołądek i *Proteus mirabilis* kolonizujący układ moczowy. Przedstawia znane inhibitory ureazy, z których tylko jeden, kwas acetohydroksamowy (AHA), jest dopuszczony do użytku medycznego. I tu doktorantka przedstawia związki, które będzie następnie badać, czyli amidy kwasu fosforowego, związki selenoorganiczne oraz związki pochodzenia naturalnego, w szczególności flawonoidy. Bibliografia liczy ponad dwieście pozycji literaturowych i obejmuje prace zarówno badawcze jak i metodologiczne w zakresie stosownym do tematyki rozprawy. Po zapoznaniu się z częścią literaturową dobrze oceniam teoretyczną wiedzę doktorantki w zakresie dyscypliny naukowej, której dotyczy temat rozprawy.

Rozdział poświęcony metodyce podzielony jest na *Materiały*, gdzie opisane są roztwory, szczepy bakteryjne i badane związki, i *Metody*, gdzie opisana jest metoda indukcji ekspresji i oczyszczania ureazy bakteryjnej oraz oznaczania jej aktywności. Następnie doktorantka opisuje w jaki sposób bada, różnymi metodami, inhibicję ureazy oraz oznacza aktywność antybakteryjną. Najwięcej uwagi poświęca testowi MTT i w jaki sposób go optymalizowała. Rozdział zamyka opis mierzenia permeabilizacji i obserwacji komórek przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego. Opis metodologii pokazuje bardzo systematyczne podejście do badań i jest dostatecznie dokładny, aby wyniki eksperymentalne doktorantki uznać za wiarygodne.

Wyniki połączone są z dyskusją. Zwykle jestem zwolennikiem rozdzielenia wyników i dyskusji, ale w tym przypadku zgadzam się z ich połączeniem, gdyż wydaje mi się, że podział byłby trudny a rezultat mniej zrozumiały. Doktorantka przebadła najpierw dwadzieścia związków aminofosfinowych pod kątem ich efektu na aktywność ureolityczną komórek *P. mirabilis* w pożywce suplementowanej mocznikiem, czyli w tzw. syntetycznym moczu. Pomiar referencyjnym był efekt zastosowanego w identycznych warunkach znanego związku AHA. Niektóre związki okazały się dużo lepszymi inhibitorami ureolizy od AHA. Doktorantka, porównując aktywność badanych związków z ich strukturą, dokonuje kilku interesujących obserwacji. Na przykład, że pochodne z podstawnikami cyklicznymi nie wykazują aktywności, albo że wśród związków posiadających podstawniki alifatyczne optymalną aktywność wykazuje pochodna z podstawnikiem heksylowym. Zauważa również różnice między efektem inhibitorów na żywych komórkach i wcześniejszymi wynikami badań na oczyszczonej ureazie. Ostatecznie zidentyfikowała dwa związki aminofosfinowe posiadające lepsze własności inhibitorowe od stosowanego w lecznictwie AHA. Te same związki doktorantka przetestowała na komórkach *H. pylori*. Tu wyniki były inne niż w przypadku *P. mirabilis*. Tylko jeden związek okazał się nieco skuteczniejszy niż AHA i związek ten nie wyróżniał się skutecznością względem *P. mirabilis*. Doktorantka zwraca tu uwagę na różnice w ilości ureazy i jej lokalizacji w obu mikrobach. W przypadku *P. mirabilis* ważna jest prawdopodobnie zdolność inhibitora do przenikania przez błony komórkowe bakterii.

To były badania pod kątem osłabiania aktywności ureolitycznej wybranych patogenów. Następnie doktorantka przeszła do zbadania efektów badanych związków na żywotność komórek. Wpierw jednak wykonała szereg prac w celu optymalizacji testu MTT, szeroko wykorzystywanego do oceniania żywotności komórek, ale dotychczas nieposiadającego

ogólnie przyjętych międzynarodowych standardów. Test ten polega na redukcji przez żywą komórkę soli MTT do jej formazanu, co można monitorować spektrometrycznie. Doktorantka zaczęła od wyznaczenia optymalnej długości fali do pomiarów absorbancji formazanu, który wytrąca się w formie krystalicznej i powinien zostać w celu pomiarów rozpuszczony w odpowiednim medium. Następnie zbadała wpływ czynników, jak detergenty, upłynniające błonę komórkową, co może zafałszować wyniki pomiarów, a także użyte stężenie soli MTT (zbyt niskie limituje dostępność substratu reakcji, a zbyt wysokie może mieć aktywność antibakteryjną), czy wpływ gęstość zawiesiny bakteryjnej na wynik pomiaru. Wzięła też pod uwagę aktywność metaboliczną badanych komórek w zależności od ich fazy wzrostowej, dobór szczepu bakteryjnego, medium inkubacyjnego czy temperatury inkubacji. W ten sposób doktorantka zoptymalizowała test MTT do dalszych badań nad szczepem *P. mirabilis*. Trzeba przyznać, że bardzo rzetelnie wygląda ta wielostronna, wyczerpująca analiza.

W dalszym toku badań doktorantka sprawdziła wpływ związków aminofosfinowych na żywe komórki *P. mirabilis*, wykorzystując test MTT, żeby zmierzyć aktywność enzymatyczną bakterii, oraz barwienie fluorescencyjne, co pozwoliło określić frakcję żywych komórek po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami. Pozwoliło to zaobserwować względną zgodność między tymi dwiema miarami efektywności badanych substancji, a jednocześnie można było zauważyć rozbieżności między testem na żywych komórkach a wcześniejszymi badaniami tych związków względem wyizolowanej ureazy. Pozwoliło to wytypować związki najefektywniejsze: trzy z nich wykazywały większą aktywność antibakteryjną niż wzorcowy inhibitor AHA. Doktorantka zauważyła też, że związki najsilniej antibakteryjne posiadały podstawnik alifatyczny, różnej długości, co sugeruje możliwość interkalacji tych związków w błony komórkowe. Podobne testy na *H. pylori* wykazały tylko niewielki efekt badanych aminofosfinianów na żywotność komórek, jednak dla niektórych związków dało się zauważyć częściowe uszkodzenia komórek. Doktorantka rozważa tu możliwość, że nieletalna permeabilizacja błony komórkowej może prowadzić do pozornie wyższej żywotności komórek w teście MTT, dzięki zwiększonemu przenikaniu soli MTT do wnętrza komórki, gdzie następuje jej redukcja. Następnie bada czy związki aminofosfinowe uwrażliwiają komórki na działanie antybiotyków. W przypadku *P. mirabilis* stwierdziła niewielki efekt dla erytromycyny, większy i zróżnicowany efekt dla nowobiocyny, i znów zauważyła, że obecność podstawnika alifatycznego wpływa korzystnie na aktywność antibakteryjną, co pozwoliła jej na wysunięcie hipotezy o aktywności permeabilizacyjnej niektórych aminofosfinianów zawierających alifatyczne podstawniki.

Komórki *H. pylori* również wykazały zaburzenia integralności błony zewnętrznej po inkubacji z wybranymi aminofosfinianami, co doktorantka wytłumaczyła interkalacją łańcuchów alifatycznych w błony fosfolipidowe. Dla *H. pylori* zaobserwowała jednak odmienną wrażliwość na działanie aminofosfinianów niż wobec *P. mirabilis*, co dało jej asumpt do przypuszczenia, że mechanizmy uszkodzania błony komórkowej są różne dla tych gatunków bakterii. Na koniec tej części badań doktorantka wykazała, że związki aminofosfinowe wykazują niską cytotoksyczność wobec komórek eukariotycznych, w testach na kilku różnych liniach komórkowych.

Kolejna część badań dotyczyła 27 związków selenoorganicznych. Ich hamowanie aktywności ureazy *S. pasteurii* opisane jest we wstępie i później też cytowane, ale nie je włączone do dysertacji, przynajmniej ja to tak odczytuję, mimo że doktorantka jest współautorką publikacji opisującej te badania. Dlaczego? Czy dlatego że *S. pasteurii* nie jest patogenem? Inkubacja *H. pylori* z ww. związkami selenoorganicznymi wykazała, że niektóre z nich charakteryzują się wielokrotnie wyższą aktywnością antyureolityczną niż wzorcowy AHA.

Z kolei aktywność antybakteryjną badanych związków doktorantka zmierzyła na referencyjnym szczepie *E. coli*. Wyniki wykazały niezbyt wysoką aktywność w porównaniu ze związkiem kontrolnym, gentamycyną.

W ostatnim cyklu prac doktorantka zbadała aktywność biologiczną długiej serii sześćdziesięciu flawonoidów. Hamowanie oczyszczonej ureazy (dwóch rodzajów tego enzymu) i aktywności ureolitycznej żywych komórek *P. mirabilis* było tu z reguły mniejsze niż dla referencyjnego związku AHA. Doktorantka podejmuje próbę usystematyzowania wyników według rodzaju inhibicji (kompetycyjnej bądź nie) i w zależności od rodzajów podstawników w różnych badanych związkach. Na przykład zwróciła uwagę na niekorzystny wpływ podstawników alkilowych w pozycji C-4 na aktywność ureolityczną chalkonów.

Podsumowując, doktorantka przebadła trzy serie związków, w sumie ponad sto, pod kątem ich aktywności antyureolitycznej i antybakteryjnej. Wykonała te obszernie i bardzo pracochłonne prace z podziwu godną systematycznością, skrupulatnością i dbałością o warsztat naukowy. Poczyniła szereg obserwacji, które mogą okazać się cenne w dalszych badaniach zmierzających do wynalezienia nowych leków przeciw patogenom dla których istotna jest aktywność ureolityczna.

Chciałbym zapytać dlaczego do badań wybrano akurat te związki, a także czy można na podstawie syntezy otrzymanych wyników zaproponować nowe, lepsze związki do dalszych badań?

Część wyników badań wchodzących w skład niniejszej rozprawy została opublikowana w międzynarodowych czasopismach. Baza *Web of Science* zawiera pięć prac, w tym jedną pracę przeglądową, w których doktorantka jest współautorem. Ponadto zauważyłem, to już poza recenzją, w bazie *PubMed* jeszcze kilka prac, w których doktorantka jest współautorem, które ukazały się pod koniec ubiegłego roku lub w styczniu br. Z opublikowanych wcześniej prac na uwagę zasługuje publikacja w *Journal of Medical Microbiology* z 2016 r. o inhibicji ureazy w komórkach *P. mirabilis*, w której to publikacji doktorantka jest wiodącym autorem. Zwraca jeszcze uwagę publikacja w wysoko notowanym *Journal of Medicinal Chemistry* z 2016 r. na temat nowych, zawierających selen, inhibitorów bakteryjnej ureazy. W pracy tej doktorantka jest drugim autorem.

Podsumowując, wysoko oceniam niniejszą rozprawę. Doktorantka wykonała ogrom pracy i dobrze sprostała wyzwaniom. Mgr inż. Ewa Grela dysponuje pogłębioną wiedzą w obszarze biochemii i mikrobiologii. Rozwiązała postawiony problem samodzielnie i przy użyciu właściwych i różnorodnych metod. Wykazała się dużą starannością i konsekwencją niezbędną do przeprowadzenia tak obszernych badań. Rozprawa w pełni spełnia wymogi formalne stawiane w tej mierze pracom doktorskim, dlatego wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu.

Z uwagi na szeroki zakres prac i dorobek publikacyjny proponuję, aby doktorat ten został wyróżniony.

Wojciech Rymuński

Poznań, 12 lutego 2019 roku