

Lublin, 04.01.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana magistra Daniela Zientala pt. „Fotouczulacze porfirynoidowe o potencjalnym zastosowaniu w przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej do zwalczania patogenów o znaczeniu epidemicznym”

Rozprawa doktorska Pana magistra farmacji Daniela Zientala została przygotowana w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Opiekę promotorską nad realizacją badań stanowiących kanwę niniejszej rozprawy sprawował dr hab. n. farm. inż. Łukasz Sobotta. Pan mgr Daniel Ziental jest absolwentem kierunku farmacja. W 2019 r., w Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, uzyskał tytuł magistra na podstawie obronionej pracy magisterskiej oraz po odbyciu wymaganego stosownymi przepisami stażu. Co warto podkreślić, badania do pracy dyplomowej prowadzone były we współpracy z naukowcami z Autonomicznego Uniwersytetu Madryckiego i tematycznie korespondowały z tematem obecnej rozprawy doktorskiej. Opiekunem ówczesnych badań był obecny promotor, dr hab. Łukasz Sobotta. Informacje dotyczące aktywności naukowej Doktoranta niezbitnie pokazują, że jest on mocno zaangażowany w prowadzenie badań naukowych już od czasów studenckich. Efekty badań, w realizacji których uczestniczył, były prezentowane i nagradzane na licznych konferencjach naukowych oraz stanowią podstawę kilkunastu artykułów opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych (sumaryczny IF = 60,315 pkt.) oraz rozdziału w monografii opublikowanej przez Królewskie Towarzystwo Chemiczne. O randze realizowanych badań, zogniskowanych na poszukiwaniu nowych fotouczulaczy i ich nośników do zastosowania w przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej, świadczą zarówno uzyskane wyróżnienia, jak również liczne cytowania prac, których współautorem jest Doktorant. Przykładowo, praca przeglądowa z 2020 roku, pt. „Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and Applications in Medicine”, której

pierwszym autorem jest Pan mgr Ziental, została, na dzień pisania niniejszej recenzji, zacytowana już 224 razy (wg. bazy Scopus). Doktorant przejawia również swą aktywność naukową jako opiekun Studenckiego Koła Naukowego działającego przy Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, a więc przy Jednostce, w której od 2019 roku jest zatrudniony na stanowisku asystenta. Z recenzenckiego obowiązku wspomnę, że dotychczas Pan mgr Daniel Ziental nie ubiegał się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Praca doktorska pt. „Fotouczulacze porfirynoidowe o potencjalnym zastosowaniu w przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej do zwalczania patogenów o znaczeniu epidemicznym” ma formę zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie, trzech artykułów naukowych, spośród których jeden jest pracą przeglądową, a dwa pozostałe – pracami oryginalnymi. Zostały one opublikowane w dobrych czasopismach naukowych a Pan mgr Daniel Ziental jest w każdej z nich pierwszym współautorem. Sam cykl publikacji, stanowiący sedno recenzowanej rozprawy doktorskiej, został dodatkowo opatrzony przedmową, w której krótko lecz treściwie zaprezentowane zostały fakty stanowiące podbudowę teoretyczną realizowanych badań. W osobnym podrozdziale Doktorant przedstawił założenia badawcze rozprawy doktorskiej, z których należałoby wywieść cel prowadzonych badań. Co jednak istotne i co muszę odnotować jako istotną wadę w strukturze samej rozprawy – Doktorant nie formułuje jasno tegoż celu, ani jako konkluzji założeń badawczych, ani w postaci osobnego podrozdziału. Dopiero w rozdziale „3.4. Podsumowanie i wnioski”, w zdaniu pierwszym, znajdziemy odniesienie się do, niesprecyzowanego wcześniej, celu badań. Sytuację tę niejako ratuje fakt, iż w pracach wchodzących w skład cyklu publikacji, każda z prac opatrzona jest adekwatnymi celami badawczymi. Mimo tego, sformułowanie celu nadrzędnego, spinającego klamrą trzy opublikowane artykuły, byłoby pożądane. Dodatkowo, w strukturze rozprawy doktorskiej Doktorant wyodrębnił podrozdziały: Omówienie prac wchodzących w skład cyklu publikacji, Podsumowanie i wnioski, Piśmiennictwo, Streszczenie (w języku polskim i angielskim). Do rozprawy załączył On też kopie artykułów stanowiących cykl publikacji, oświadczenia współautorów prac oraz oświadczenie Przewodniczącego Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu, że realizowane badania nie stanowią eksperymentu medycznego i, jako takie, nie wymagają uzyskania zgody Komisji Bioetycznej.

Tematyka publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest niezwykle aktualna bo dotycząca nowych strategii terapeutycznych mogących pomóc w walce z zakażeniami bakteryjnymi i grzybiczymi, w szczególności spowodowanymi przez drobnoustroje lekooporne. Problem lekooporności wśród drobnoustrojów chorobotwórczych nie jest zjawiskiem nowym a jego pojawienie się prognozował już sam Alexander Fleming, odkrywca penicyliny, w trakcie swojego wykładu noblowskiego w 1945 roku. Faktem jest jednak, że ostatnie lata to okres wkraczania ludzkości w tzw. erę poantybiotykową, w której znaczącemu zwiększeniu się liczby mikroorganizmów wielolekoopornych towarzyszy coraz mniejsza liczba nowych leków przeciwdrobnoustrojowych wprowadzanych na rynek farmaceutyczny. W związku z tym wiele krajów czyni wysiłki aby przeciwdziałać temu groźnemu zjawisku. W Polsce przejawem takich działań jest inicjatywa pod nazwą „Narodowy Program Ochrony Antybiotyków”. Istotna jest również aktywność ośrodków badawczych pracujących nad nowymi strategiami terapeutycznymi naceLOWanymi na eradykację drobnoustrojów chorobotwórczych. Efektem tego typu aktywności jest, między innymi, rozprawa doktorska Pana magistra Daniela Zientala.

Pierwsza z prac wchodzących w skład cyklu, tj. artykuł „Photosensitizers Mediated Photodynamic Inactivation against Fungi”, opublikowany w czasopiśmie *Nanomaterials* (MDPI), stanowi wartościowy przegląd literatury dotyczącej zastosowania ponad 70 fotouczulaczy z różnych grup chemicznych jako oręża w walce z zakażeniami grzybiczymi. Artykuł ten bazuje na 263. pozycjach piśmiennictwa, co dowodzi rozległości opisywanej tematyki. Jednocześnie znakomita większość przywołanych prac pochodzi z ostatniej dekady, co wskazuje na zwiększone zainteresowanie tą tematyką w ostatnim czasie. Co uważam za istotne, w artykule tym autorzy, w tym Doktorant, nie tylko przeanalizowali poszczególne pozycje literaturowe, ale również dokonali ich krytycznej oceny połączonej z wysunięciem wniosków, postulatów oraz identyfikacją braków w zakresie analizowanej materii. Między innymi wskazano, że naczelnym problemem utrudniającym rzetelną analizę danych uzyskiwanych przez różne grupy badawcze jest brak standardów w zakresie metod oznaczania aktywności biologicznej fotouczulaczy. Autorzy dostrzegli również, że choć to tlen singletowy i inne reaktywne formy tlenu są głównymi czynnikami uszkadzającymi komórki drobnoustrojów to jednak skuteczność przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej nie jest wprost proporcjonalna do zdolności fotouczulacza do generowania tlenu singletowego.

Z tym zresztą zjawiskiem spotka się Doktorant już w drugim, oryginalnym artykule cyklu publikacji. Dokonany przegląd literatury uzasadnia postawienie hipotezy, że tak samo jak wydajność indukcji reaktywnych form tlenu, tak samo struktura fotouczulaczy umożliwiające ich penetrację do wnętrza komórek stanowi podstawę sukcesu terapeutycznego. W końcu na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury Doktorant zidentyfikował chloryny oraz ftalocyjaniny jako grupy związków o wysokim potencjale przeciwdrobnoustrojowym oraz korzystnych właściwościach fizykochemicznych. Na badaniu takich właśnie pochodnych Doktorant skupił się w kolejnych etapach swojej pracy naukowej, co zostało udokumentowane w postaci kolejnych dwóch artykułów cyklu publikacji.

W artykule pt. „Oxospirochlorins as new promising photosensitizers against priority pathogens”, opublikowanym w czasopiśmie *Dyes and Pigments* (Elsevier) Doktorant dokonał charakterystyki fotochemicznej czterech nowych chloryn, wykazując, między innymi, wpływ charakteru elektronowego obecnych w nich podstawników na zdolność do pochłaniania i emisji promieniowania. Oznaczona została również zdolność testowanych chloryn do generowania tlenu singletowego oraz mechanizm i wydajność ich fotorozkładu. W badaniach biologicznych wykazano skuteczność tych związków jako fotouczulaczy w terapii fotodynamicznej przeciwko lekoopornym szczepom *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus aureus*. Co równie istotne, badane chloryny charakteryzowały się synergizmem z obecnie stosowanymi antybiotykami, co rozszerza możliwości wykorzystania tego typu związków w celach terapeutycznych.

W kolejnym artykule, opublikowanym w czasopiśmie *Pharmaceutics* (MDPI), Doktorant skupił się na podstawionych parabenami (nipaginami) ftalocyjaninach – cynkowej, palladowej i demetalowanej. Podobnie jak poprzednio, Doktorant wykonał badania celem scharakteryzowania ich właściwości fotochemicznych. Związki te nie posiadały zdolności (4), lub tylko nieznaczną (2, 3), do emisji fluorescencji, a ich fotodegradacja odbywała się na drodze fotowybielania. Ftalocyjanina palladowa (4) charakteryzowała się największym potencjałem do generowania tlenu singletowego. Badane ftalocyjaniny, przy zastosowaniu ich wyższych stężeń oraz przy dłuższym czasie ekspozycji na promieniowanie, okazały się skutecznie hamować wzrost lekoopornych mikroorganizmów, w tym drożdżaka *Candida auris* o wysokim potencjale epidemicznym.

W obu pracach oryginalnych dobór metod badawczych jest prawidłowy i adekwatny do analizowanych zjawisk. Ważne, że poprzez połączenie badań chemicznych,

fizykochemicznych i biologicznych dokonano stosunkowo pełnej charakterystyki potencjału testowanych związków. Pan mgr Daniel Ziental właściwie zinterpretował otrzymane wyniki oraz umiejscowił je na tle wyników uzyskanych przez innych badaczy. Mając na uwadze, że rozprawa doktorska ma dowodzić zdolności Doktoranta do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, istotne jest, że w pracach oryginalnych wchodzących w skład cyklu publikacji Pan mgr Daniel Ziental odpowiedzialny był za opracowanie koncepcji badań i dobór metodologii (wspólnie z Promotorem), prowadzenie badań z zakresu fotochemii i mikrobiologii, analizę wyników i ich wizualizację, a także za współtworzenie manuskryptów. Podobnie istotny był udział Doktoranta przy tworzeniu publikacji przeglądowej, która nie tylko dowodzi Jego wiedzy teoretycznej, ale również łatwości poruszania się w obszarze badawczym, któremu poświęcona jest rozprawa doktorska.

W recenzowanej rozprawie dostrzegłem jedynie nieliczne niedociągnięcia. Lepiej byłoby, aby przy stosowaniu nazw mikroorganizmów, przy ich pierwszym użyciu zastosować pełną nazwę rodzajową i gatunkową (np. *Aspergillus fumigatus*), zamiast od razu używać skrótu nazwy rodzajowej (np. *A. fumigatus*). Podobnie rzecz ma się z brakiem konsekwencji w stosowaniu skrótów, np. mając na myśli reaktywne formy tlenu Doktorant raz używa skrótu RFT, a innym razem ROS (od Reactive Oxygen Species). W jednym zdaniu (strona 14), opisując skuteczność przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej wobec odmiennych grup bakterii Doktorant używa sformułowania „Gram-ujemnych”, ale już „G-dodatnich” zamiast „Gram-dodatnich”. Są to jednak na tyle drobne błędy, że nie oczekuję ustosunkowywania się do tych uwag w trakcie publicznej obrony rozprawy doktorskiej. Chciałbym natomiast aby w jej trakcie Pan mgr Daniel Ziental był gotowy do dyskusji na temat zjawiska, z którym sam zetknął się w trakcie realizacji badań do pracy doktorskiej, jak również doświadczyli go autorzy prac przywołanych w artykule przeglądowym wchodzącym w skład ocenianego cyklu 3 publikacji naukowych. Chodzi mianowicie o brak korelacji pomiędzy zdolnością fotouczulaczy do generowania tlenu singletowego a ich docelową aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Jaki udział w tym zjawisku ma sposób pomiaru zdolności do generowania tlenu singletowego? Środowisko DMF czy DMSO jest dalece odmienne od środowiska, w którym prowadzone są pomiary aktywności biologicznej. Zresztą nawet wyniki uzyskane dla tych samych związków w obu wspomnianych rozpuszczalnikach potrafią się znacznie od siebie różnić, co zostało pokazane w artykule nr 2. Czy, zdaniem Doktoranta, dodatkowe zastosowanie metod bezpośredniego pomiaru poziomu

reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach żywych, np. metodą cytometrii przepływowej, pozwoliłoby na uzyskanie wyników lepiej korelujących z aktywnością przeciwdrobnoustrojową? Wreszcie, jakie są zalety i wady metod pośrednich i bezpośrednich, przy pomocy których oznaczana jest zdolność generowania tlenu singletowego i innych reaktywnych form tlenu?

Podsumowując, rozprawa doktorska, której autorem jest Pan mgr Daniel Ziental, jest wartościową pozycją opisującą możliwości zastosowania przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych i grzybiczych. Nie mam wątpliwości, że stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i prezentuje ogólną wiedzę Doktoranta w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, a więc spełnia wymogi zawarte w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2021 poz. 478 z późniejszymi zmianami). Wymogi te spełnione są również w zakresie formy, w jakiej rozprawa została przedłożona do oceny (tj. cykl powiązanych tematycznie artykułów), oraz w kwestii dołączenia do niej streszczenia w języku angielskim. W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Kapitulie Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wnioski o dopuszczenie Pana mgra Daniela Zientala do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie mając na uwadze, że rozprawa doktorska pt. „Fotouczulacze porfirynoidowe o potencjalnym zastosowaniu w przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej do zwalczania patogenów o znaczeniu epidemicznym” ma istotny walor praktyczny, w sposób kompleksowy charakteryzuje badane pochodne z grupy chloryn i ftalocyjanin a uzyskane wyniki zostały opublikowane w wysokopunktowanych czasopismach naukowych, wnoszę o jej wyróżnienie.

KIEROWNIK ZAKŁADU FARMAKOLOGII

Katedry Farmakologii i Biologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie


Prof. dr hab. Tomasz Plech