

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgra farm. Daniela Zientala

pt. „Fotouczulacze porfirynoidowe o potencjalnym zastosowaniu w przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej do zwalczania patogenów o znaczeniu epidemicznym”

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. n. farm. inż. Łukasza Sobotta

Recenzja została przygotowana na wniosek Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

1. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgra farm. Daniela Zientala, pt. „Fotouczulacze porfirynoidowe o potencjalnym zastosowaniu w przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej do zwalczania patogenów o znaczeniu epidemicznym” stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie 3 artykułów naukowych, jednej pracy przeglądowej opublikowanej w czasopiśmie *Nanomaterials* (wyd. MDPI, rok 2021, IF 5,719) oraz 2 prac eksperymentalnych opublikowanych w *Dyes and Pigments* (wyd. Elsevier, rok 2022, IF 5,122) i *Pharmaceutics* (wyd. MDPI, rok 2022, IF 6,525). We wszystkich pracach Pan Daniel Ziental jest pierwszym autorem.

Praca doktorska składa się z wykazu publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora, opisu aktywności naukowej Pana mgra farm. Daniela Zientala, wstępu, założeń badawczych rozprawy, omówienia prac wchodzących w cykl

publikacji oraz podsumowania i wniosków. Wstęp teoretyczny opisuje problem narastania lekooporności wśród istotnych klinicznie drobnoustrojów oraz alternatywne podejście terapeutyczne – przeciwdrobnoustrojową terapię fotodynamiczną, która może stanowić potencjalne narzędzie do ich eradykacji. Ta część wstępu wraz z założeniami badawczymi rozprawy wprowadza czytelnika w zadania badawcze podjęte w ramach rozprawy doktorskiej. Doskonałym uzupełnieniem wstępu jest praca przeglądowa opisująca przeprowadzone dotychczas badania, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, dotyczące wykorzystania terapii fotodynamicznej w walce z zakażeniami grzybiczymi.

Osobny rozdział stanowi omówienie prac wchodzących w skład cyklu publikacji. Rozdział ten wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w ramach każdej z przedstawionych publikacji, przedstawia problem badawczy oraz podsumowuje uzyskane wyniki.

Istotnym elementem rozprawy doktorskiej jest streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, które jednak następuje dopiero po wymienionych wcześniej częściach składowych pracy. W mojej ocenie, streszczenie pracy doktorskiej powinno znaleźć się na samym początku rozprawy.

Oświadczenia współautorów prac określające indywidualny wkład w powstanie publikacji zostały umieszczone na końcu rozprawy doktorskiej.

Przeprowadzając formalną ocenę rozprawy doktorskiej muszę zwrócić uwagę na brak istotnego rozdziału, tj. przedstawienia jasnej i konkretnej hipotezy oraz założonych celów badawczych. Co prawda, w ramach rozprawy umieszczono rozdział opisujący założenia badawcze, niemniej, nie sformułowano w nim konkretnych celów badawczych dysertacji. W podrozdziale „Podsumowanie i wnioski” zamieszczono wprawdzie zdanie, że „*przedstawiona praca doktorska miała na celu udowodnienie niepowtarzalnego potencjału terapii fotodynamicznej w leczeniu zakażeń powierzchniowych wywołanych przez bakterie i grzyby odporne na klasyczną antybiotykoterapię*”, ale w mojej ocenie jest to zbyt ogólne i niefortunnie sformułowany cel badawczy. De facto, doktorant nie przeprowadzał żadnych badań dotyczących leczenia zakażeń powierzchniowych. Proszę, by w trakcie publicznej obrony Doktorant sformułował hipotezę i cele badawcze pracy doktorskiej.

Odnosząc się do tej części rozprawy doktorskiej chciałbym prosić doktoranta o wyjaśnienia dotyczące poniższych kwestii:

- We Wstępie rozprawy doktorant sugeruje, że poddawanie bakterii dawkom subletalnym PACT nie powoduje zwiększenia ich oporności ani na antybiotyki, ani na oddziaływanie tlenu singletowego. Chciałbym poznać zdanie doktoranta na temat opisywanego wielokrotnie zjawiska rozwoju tolerancji drobnoustrojów na stres oksydacyjny powodowany terapią

fotodynamiczną wskutek wielokrotnego traktowania mikroorganizmów subletalnymi dawkami PACT.

- W Założeniach badawczych doktorant sugeruje, że wskutek synergistycznego oddziaływania PACT z antybiotykoterapią, możliwe jest przywrócenie wrażliwości drobnoustrojów na niektóre grupy antybiotyków. Czy doktorant jest w stanie wskazać dane literaturowe potwierdzające tak dalece idący efekt uwrażliwienia drobnoustrojów wywołany zastosowaniem metody PACT skutkujący zmianą kategorii lekooporności.

- W Podsumowaniu i wnioskach doktorant sugeruje, że PACT może stanowić bardzo dobrą opcję terapeutyczną w przypadku panopornych szczepów *Candida auris*. Czy stosowany w ramach rozprawy doktorskiej szczep *C. auris* rzeczywiście charakteryzował się profilem oporności typu PDR?

- Proszę o wyjaśnienie dotyczące doboru antybiotyków do badania synergii między PACT a klasyczną antybiotykoterapią. Dlaczego do badania synergii w przypadku *S. aureus* wybrano ceftazydym, który generalnie nie jest rekomendowany do stosowania w przypadku zakażeń wywołanych tym drobnoustrojem? Dlaczego, zarówno dla *S. aureus* jak i *E. coli*, skupiono się na badaniu jednej grupy antybiotyków (z wyjątkiem meropenemu), tj. cefalosporyn a nie wybrano leków I-go i II-go rzutu, np. amoksycyliny, cefuroksymu, klarytromycyny, azytromycyny, ciprofloksacyny czy trimetoprimu z sulfametoksazolem?

2. Ocena osiągnięcia naukowego rozprawy doktorskiej

Na rozprawę doktorską składa się jedna praca przeglądowa oraz dwie pracy o charakterze eksperymentalnym.

Publikacja nr 1 to praca przeglądowa (Ziental Daniel, Mlynarczyk Dariusz, Czarczynska-Goslinska Beata, Lewandowski, Konrad, Sobotta Lukasz; *Photosensitizers Mediated Photodynamic Inactivation against Fungi. Nanomaterials*. 28 października 2021;11(11):2883), która stanowi przegląd literatury dotyczącej możliwości wykorzystania PACT w walce z zakażeniami grzybiczymi. W pracy przeanalizowano dane literaturowe dotyczące 29 gatunków grzybów oraz ponad 70 związków fotouczulających wykorzystanych w badaniach PACT zarówno w modelach *in vitro* jak i *in vivo*. Opisane wyniki dały podstawę do dalszych badań doktoranta nad wykorzystaniem PACT z użyciem najbardziej obiecujących grup fotosensybilizatorów, tj. chloryn i ftalocyjanin, w walce z wielolekoopornymi drobnoustrojami o znaczeniu klinicznym.

Publikacja nr 2 to praca eksperymentalna (Ziental Daniel, Zajac Justyna, Lewandowski Konrad, Długaszewska Jolanta, Potrzebowski Marek, Sobotta Lukasz; *Oxospirochlorins as*

new promising photosensitizers against priority pathogens. Dyes Pigments. maj 2022;201:110240), opisująca zastosowanie oksospirochloryn jako obiecujących fotosensybilizatorów w walce z patogenami alarmowymi na przykładzie metycylinoopornych *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* z opornością wynikającą z beta-laktamaz o rozszerzonym spektrum oraz opornego na flukonazol *Canida albicans*.

W pierwszym etapie badań dokonano syntezy oraz pełnej charakterystyki fotochemicznej czterech nowych związków fotouczulających, których aktywność fotodynamiczną badano w stosunku do wymienionych wyżej drobnoustrojów. W celu zwiększenia rozpuszczalności badanych związków w środowisku wodnym, doktorant przeprowadził inkorporację fotosensybilizatorów w liposomy. Ponadto, doktorant podjął próbę oceny oddziaływania synergistycznego między metodą fotodynamiczną a klasyczną antybiotykoterapią na przykładzie wybranych antybiotyków. Uzyskane wyniki dowodzą, że badane oksospirochloryny są obiecującymi fotosensybilizatorami, które z powodzeniem można stosować w terapii fotodynamicznej drobnoustrojów stanowiących duże wyzwanie współczesnej medycyny. Obserwowany efekt synergistyczny prowadzący do obniżenia stężenia stosowanych antybiotyków oceniam za niezwykle istotny element przedstawionej pracy, który może mieć ważny wpływ na ograniczenie rosnącej lekooporności drobnoustrojów.

Czy doktorant może uzasadnić, że badanie wykorzystujące pojedynczy szczep każdego z gatunków drobnoustrojów to dobre podejście eksperymentalne? Czy doktorant nie obawia się, że zaprezentowane wyniki mają małą wartość aplikacyjną skoro nie wiemy jak prezentowałyby się aktywność bakteriobójcza stosowanych fotosensybilizatorów na większej liczbie przedstawicieli tego samego gatunku mikroorganizmów?

Publikacja nr 3 to praca o charakterze eksperymentalnym (*Ziental Daniel, Mlynarczyk Dariusz, Kolasinski Emil, Güzel Emre, Długaszewska, Jolanta, Popenda Łukasz, Jurga Stefan, Goslinski Tomasz, Sobotta Lukasz; Zinc(II), Palladium(II), and Metal-Free Phthalocyanines Bearing Nipagin-Functionalized Substituents against Candida auris and Selected Multidrug-Resistant Microbes. Pharmaceutics. 12 sierpnia 2022;14(8):1686*), w której doktorant opisuje zastosowanie cynkowej, palladowej oraz niezawierającej metalu ftalocyjanin podstawionych nipaginami w walce z grzybem z gatunku *Candida auris* oraz wybranymi drobnoustrojami, tj. metycylinoopornym *S. aureus*, *E. coli* produkującą beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum, *C. albicans*, *Trichophyton rubrum* i *Trichophyton mentagrophytes*.

W ramach przedstawionej pracy badano trzy nowo syntetyzowane ftalocyjaniny (cynkową, palladową oraz demetalowaną) podstawione symetrycznie nipaginami. Doktorant w sposób rzetelny opisał proces syntezy badanych fotosensybilizatorów oraz ich pełną

charakterystykę fotochemiczną. Podobnie jak w przypadku badanych w publikacji nr 2 chloryn, doktorant przeprowadził inkorporację syntetyzowanych ftalocyjanin w liposomy, co umożliwiło ich zastosowanie w roztworach wodnych. Uzyskane wyniki dowodzą wysokiej aktywności bakteriobójczej badanych związków w metodzie fotodynamicznej. Za szczególne osiągnięcie uznaję wykazanie wysokiej aktywności bójczej metody PACT z wykorzystaniem badanych ftalocyjanin w stosunku do *C. auris*, który wykazuje wyjątkową oporność na większość dostępnych leków przeciwgrzybiczych.

Badanie aktywności bakteriobójczej badanych fotosensybilizatorów (podobnie w publikacji nr 2) przeprowadzono w buforze PBS. Wielu badaczy obserwuje znacznie niższą aktywność bójczą związków fotouczulających, gdy testowane są one w pożywkach mikrobiologicznych. Czy doktorant podejmował próbę oceny aktywności badanych związków w zależności od środowiska? Jeśli nie, to proszę doktoranta o przedstawienie swojego zdania na temat potencjalnej redukcji aktywności badanych związków w zależności od środowiska reakcji.

3. Dodatkowe komentarze i pytania

Dobrze opracowana metodologia jest podstawą uzyskania wiarygodnych wyników badań. W pracy zastosowano jedynie podstawową metodykę badawczą dla potwierdzenia synergii między metodą fotodynamiczną a antybiotykoterapią, tj. badanie minimalnego stężenia hamującego (MIC). Proszę o wskazanie innych możliwych testów, które potwierdziłyby zaobserwowany przez doktoranta efekt synergistyczny.

Rozprawa doktorska Pana mgr farm. Daniela Zientala w dużej mierze dotyczy badania nowo syntetyzowanych związków fotouczulających. Czy doktorant może przytoczyć jakieś dane (własne lub literaturowe) dotyczące potencjalnej cyto- i fototoksyczności badanych związków w stosunku do komórek eukariotycznych, które sugerowałyby, że proponowana metoda PACT z zastosowaniem wspomnianych związków może być bezpiecznym podejściem terapeutycznym.

4. Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pana mgr farm. Daniela Zientala oparta jest na trzech wysokiej jakości publikacjach, które zostały docenione przez recenzentów i edytora w czasopismach naukowych. Każda z prac podnosi ważne aspekty i problemy badawcze, wnosi znaczący wkład w badania nad wykorzystaniem metody fotodynamicznej w walce z wielolekoopornymi drobnoustrojami, opisuje wykorzystanie rzetelnej metodologii i dokumentuje uzyskane wyniki. Na podstawie załączonych oświadczeń współautorów oceniam udział koncepcyjny jak i wykonawczy Doktoranta w powstaniu prac bardzo wysoko.

5. Wniosek końcowy

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgra farm. Daniela Zientala spełnia wszystkie warunki zgodnie z artykułem 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Zwracam się do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgra farm. Daniela Zientala do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Zakład Fotobiologii i Diagnostyki
Molekularnej



dr hab. Mariusz Grinholc, prof. UG

Dr hab. Mariusz Grinholc, prof. UG