

Kraków, 27.12.2022

Recenzja pracy doktorskiej Pana mgr. farm. Daniela Zientala
pt. „*Fotouczulacze porfirynoidowe o potencjalnym zastosowaniu w przeciwdrobnoustrojowej terapii
fotodynamicznej do zwalczania patogenów o znaczeniu epidemicznym*”
wykonanej pod opieką naukową Pana dr hab. n. farm. inż. Łukasza Sobotty

Podstawowe dane o kandydacie do stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Pan Daniel Ziental w latach 2013-2019 studiował farmację na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Pracę magisterską pt. „*Phthalocyanines and its potential for photodynamic bacteria inactivation*” obronił z wynikiem bardzo dobrym, uzyskując dn. 29 marca 2019 r. tytuł magistra farmacji. Badania w ramach projektu magisterskiego przygotował w macierzystej uczelni pod opieką dr hab. Łukasza Sobotty oraz w ramach stypendium naukowego w Autonomicznym Uniwersytecie w Madrycie pod opieką Prof. Tomása Torresa i Prof. M. Salomé Rodríguez-Morgade. Na wyróżnienie zasługuje fakt, że za przygotowanie pracy magisterskiej w języku angielskim Pan Daniel Ziental zdobył pierwsze miejsce w ramach Wydziałowego Konkursu Prac Magisterskich oraz trzecie miejsce na Ogólnopolskim Konkursie Prac Magisterskich Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego.

Na podstawie dostarczonej dokumentacji oraz informacji internetowych stwierdzam, że kandydat nie ubiegał się wcześniej o nadanie stopnia doktora ani w zakresie wskazanej dyscypliny ani w ramach innych dyscyplin naukowych.

Kandydat jest aktualnie zatrudniony na pół etatu w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Oprócz prowadzenia badań naukowych, kandydat realizuje działalność dydaktyczną Zakładu prowadząc zajęcia na kierunkach analityka medyczna, farmacja i kosmetologia. W ramach działalności organizacyjnej, Pan Daniel Ziental pełni funkcję opiekuna Studenckiego Koła Naukowego „*Fotochemia Związków Makrocyclicznych*”, z którym związany jest od drugiego roku studiów farmaceutycznych (najpierw jako członek, a następnie sprawując funkcję przewodniczącego).



Doktorant w mojej ocenie legitymuje się doskonałym dorobkiem naukowym, jest współautorem 14 artykułów opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach naukowych z Listy Filadelfijskiej (m. in. *ChemMedChem*, *Pharmaceutics*, *Int. J. Mol. Sci.*, *Dyes and Pigments*, *Molecules*, *Journal of Organometallic Chemistry*, *Inorganica Chimica Acta*), a także kilku komunikatów konferencyjnych. Pan Daniel Zietal jest ponadto współautorem rozdziału w książce opublikowanej w prestiżowym wydawnictwie naukowym *The Royal Society of Chemistry* pt. „*Applications of Porphyrinoids as Functional Materials*”. Biorąc pod uwagę najbardziej aktualne wartości współczynników oddziaływania czasopism, Doktorant może pochwalić się imponującymi wynikami: sumarycznym IF prac równym 60,315 oraz liczbą punktów ministerialnych 1330). Na szczególne wyróżnienie zasługuje praca przeglądowa pt. *Titanium dioxide nanoparticles: prospects and applications in medicine*, której Pan Daniel Zietal jest pierwszym autorem, a która została zacytowana już **287 razy** (dane z google scholar z dn. 27.12.2022) i nagrodzona tytułem najlepszego przeglądu czasopisma *Nanomaterials* w roku 2022. Biorąc pod uwagę wiek Doktoranta oraz etap rozwoju kariery naukowej przytaczane dane uważam za wyróżniające. Ze swojej strony pragnę pogratulować Autorowi i życzyć, aby kontynuował prowadzenie badań na wysokim poziomie, a z pewnością znajdzie się w gronie wybitnych młodych naukowców.

Informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Pojawienie się szczepów bakteryjnych i grzybiczych opornych na większość antybiotyków skłoniło badaczy do rozważań o nadchodzącym końcu ery antybiotyków. Wzrastająca oporność mikroorganizmów na znane antybiotyki uzasadnia więc intensywne poszukiwania alternatywnych terapii, w tym metod zwalczania infekcji wywołanych przez wielolekooporne mikroorganizmy. Do takich rozwiązań należy omówiona w recenzowanej pracy doktorskiej terapia fotodynamiczna (PDT), znana też jako fotodynamiczna inaktywacja (PDI), fotodynamiczna sterylizacja (PDS) czy też przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna (PACT). Czynnikiem aktywnym w PDT są reaktywne formy tlenu (ROS), będące produktami fotoindukowanego przeniesienia elektronu lub/i przekazania energii ze wzbudzonego stanu trypletowego cząsteczek fotosensybilizatora na cząsteczkę tlenu w stanie podstawowym. Możliwość kontrolowanego generowania ROS zależy w dużej mierze od właściwości chemicznych zastosowanych fotosensybilizatorów. Prowadzone są intensywne badania zarówno nad optymalizacją protokołów PDT przy użyciu komercyjnych fotosensybilizatorów jak też nad nowymi związkami charakteryzującymi się zwiększoną selektywnością do komórek mikroorganizmów,



efektywnością w generowaniu ROS oraz dużą skutecznością terapeutyczną. Uważa się, że wytworzenie przez mikroorganizmy skutecznej oporności przeciw PDT będzie bardzo trudne, o ile nie niemożliwe. Ma to właśnie związek z generowaniem w następstwie reakcji fotodynamicznych ROS, które jako silne utleniacze, zdolne są do modyfikacji chemicznych kluczowych składników komórki, niezbędnych do jej normalnego funkcjonowania. To, między innymi, odróżnia działanie antybiotyków od fotodynamicznej inaktywacji, zachodzącej przy udziale cytotoksycznych ROS. Nie oznacza to jednak, że wszystkie bakterie i grzyby wykazują taką samą, lub nawet zbliżoną podatność na fotodynamiczną inaktywację. Związane jest to ze zróżnicowaną przepuszczalnością błon i osłon komórek grzybów i bakterii w stosunku do konkretnych barwników fotosensybilizujących odpowiedzialnych za fotogenerowanie ROS, oraz różną efektywnością mechanizmów chroniących mikroorganizmy przed stresem oksydacyjnym.

Tą ważną i aktualną tematyką badawczą zajmował się Pan mgr farm. Daniel Ziental w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Należy zaznaczyć, że w jednostce tej pod kierunkiem Prof. Jadwigi Mielcarek oraz w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych pod kierownictwem Prof. Tomasza Goślińskiego od wielu lat z wielkim powodzeniem prowadzone są badania naukowe w tym zakresie.

Wyniki swoich badań mgr Daniel Ziental przedstawił w rozprawie doktorskiej, zatytułowanej *“Fotouczulacze porfiryroidowe o potencjalnym zastosowaniu w przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej do zwalczania patogenów o znaczeniu epidemicznym”*, której promotorem jest dr hab. Łukasz Sobotta. Należy podkreślić, że najważniejsze wyniki, jakie we współpracy z innymi badaczami uzyskał mgr Daniel Ziental, zostały opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopismach naukowych i posiadają niekwestionowaną wartość naukową. Praca doktorska łączy badania z pogranicza chemii medycznej, chemii fizycznej, farmakologii oraz mikrobiologii i koncentruje się nad określeniem właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej wybranych porfiryroidów oraz ich zastosowaniu w fotodynamicznej inaktywacji mikroorganizmów.

Głównym celem pracy jest zbadanie właściwości optycznych i fotochemicznych związków z grupy chloryn i ftalocyjanin, a następnie opracowanie protokołów PDT *in vitro*, (m. in. łączenie z antybiotykoterapią), które mogłyby z powodzeniem zostać zaimplementowane w modelach zwierzęcych, a być może w przyszłości również w praktyce klinicznej w zwalczaniu infekcji spowodowanych opornymi patogenami.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, zgodnie z wytycznymi zawartymi w art. 187. ust. 3. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*, została przygotowana w formie



spójnego tematycznie zbioru 3 artykułów opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej w latach 2021-2022:

1. **Ziental Daniel**, Młynarczyk Dariusz, Czarczynska-Goslinska Beata, Lewandowski Konrad, Sobotta Lukasz; Photosensitizers Mediated Photodynamic Inactivation against Fungi. *Nanomaterials*, **2021**; 11 (11): 2883.
2. **Ziental Daniel**, Zajac Justyna, Lewandowski Konrad, Długaszewska Jolanta, Potrzebowski Marek, Sobotta Lukasz; Oxospirochlorins as new promising photosensitizers against priority pathogens. *Dyes Pigments*. **2022**; 201 :110240.
3. **Ziental Daniel**, Młynarczyk Dariusz, Kolasinski Emil, Güzel Emre, Długaszewska Jolanta, Popena 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*. **2022**; 14 (8): 1686.

Oprócz pełnych tekstów publikacji, w skład rozprawy doktorskiej wchodzi:

- I. Opis aktywności naukowej Kandydata
- II. Wstęp do tematyki badawczej oraz cele pracy
- III. Krótkie omówienie prac wchodzących w skład cyklu publikacji
- IV. Podsumowanie całego cyklu i wnioski
- V. Bibliografia
- VI. Streszczenie w języku polskim i angielskim

Wymienione powyżej części opisowe pracy stanowią cenne uzupełnienie do załączonych manuskryptów. Znalazły się tam wszystkie niezbędne informacje, a także krótkie omówienie istotnych osiągnięć związanych z przeprowadzonymi badaniami.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na niefortunne sformułowania i drobne błędy, które pojawiły się w tej części opracowania, a wynikały zapewne z pośpiechu Doktoranta w przygotowaniu rozprawy doktorskiej, np. wyrażenia: „co stanowi duże wyzwanie formulacyjne”, „elektronossące ugrupowania -CF₃”.

W rozprawach doktorskich, których podstawą są załączone prace wieloautorskie zazwyczaj problemem jest wyodrębnienie wkładu własnego doktoranta. Na końcu ocenianej rozprawy zamieszczone są stosowne oświadczenia wszystkich współautorów. Ich analiza pozwala na jednoznaczne stwierdzenie o znaczącym i dominującym udziale Doktoranta w realizację przeprowadzonych badań oraz czynności



związanych z opracowaniem i przygotowaniem wyników do publikacji. Wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na włączenie publikacji 1-3 do postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Dodatkowo, każdy ze współautorów określił swój udział w powstaniu prac oraz wydał oświadczenie o niewykorzystaniu żadnego z manuskryptów w innych postępowaniach.

Pierwsza praca cyklu „*Photosensitizers Mediated Photodynamic Inactivation against Fungi*” to obszerny przegląd literatury, w którym przeanalizowano najnowsze doniesienia z zakresu badań nad możliwością zastosowania metody fotodynamicznej do leczenia zakażeń grzybiczych. W pracy odniesiono się do analizy aktywności biologicznej *in vitro* i *in vivo* aż 70 fotosensybilizatorów, zarówno tych nowo zsyntezowanych jak też dostępnych komercyjnie, często zmodyfikowanych w celu zwiększenia ich potencjału przeciwgrzybiczego. Uważam, że manuskrypt jest wartościowym działem, gdyż z jednej strony podsumowuje i uzupełnia dotychczasowe badania nad fotodynamiczną inaktywacją wirusów oraz bakterii, z drugiej zaś strony może posłużyć jako obszerny wstęp literaturowy do publikacji oryginalnych wchodzących w skład dysertacji.

Do ciekawszych wniosków pracy należy zaliczyć obserwację, iż komórki grzybów zaopatrzone są w dodatkowe mechanizmy umożliwiające skuteczne usuwanie z ich wnętrza barwników tiazynowych, co skutkuje ograniczoną efektywnością generowania ROS. Ponadto Autor słusznie zauważa, iż duże wartości wydajności kwantowych tworzenia tlenu singletowego nie są jedynymi przesłankami skutecznej terapii. Uważam, że obserwacja ta ma nawet istotniejsze implikacje w terapii fotodynamicznej nowotworów, której skuteczność zwykle nie koreluje z wydajnością generowania tlenu singletowego (Mechanizm II), a z ilością produktów fotoindukowanego przeniesienia elektronu (Mechanizm I).

W związku z tym, że Autor cytuje tu prace Prof. Michaela Hamblina, jestem ciekaw jaka jest opinia Doktoranta o zaproponowanym przez niego Mechanizmie typu III.

Zdaniem Autora kluczową rolę w efektywności PDT odgrywa budowa chemiczna fotosensybilizatorów, dlatego podczas obrony chciałbym również zapytać o to, jakie są różnice w kryteriach doboru fotosensybilizatorów do terapii fotodynamicznej nowotworów, a jakie do fotodynamicznej inaktywacji mikroorganizmów (bakterie, grzyb, wirusy). Chciałbym usłyszeć zarówno o strukturze chemicznej, właściwościach fizykochemicznych i fotochemicznych fotosensybilizatorów jak również o protokołach stosowanych w tych strategiach terapeutycznych. Ucieszyło mnie podsumowanie tej pracy, w którym Autor wskazuje na szczególne znaczenie chloryn i ftalocyjanin w fotodynamicznej inaktywacji mikroorganizmów. W pełni się z tym zgadzam i uważam, że o ile bakteriochloryny



sprawdzają się doskonale w terapii fotodynamicznej nowotworów, to właśnie chloryny i ftalocyjaniny powinny być rozwijane w kierunku ich zastosowania w PACT. Jednak tłumaczenie tego wyboru jedynie odpowiednim profilem bezpieczeństwa i właściwościami fizykochemicznymi uważam za zbyt powściągliwe, a nawet niewystarczające. Oczekuję, że podczas obrony zostanie zaspokojony mój niedosyt w tym aspekcie.

W drugiej publikacji pt. *“Oxospirochlorins as new promising photosensitizers against priority pathogens”* dokonano charakterystyki fotochemicznej czterech nowych fotosensybilizatorów chlorynowych, a następnie zbadano ich aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz synergizm działania fotogenerowanych ROS z wybranymi antybiotykami (meropenemem, ceftriaksonem i ceftazydymem). W ramach badań fotochemicznych, wyznaczono wydajności kwantowe generowania tlenu singletowego, fluorescencji oraz fotodegradacji. Najskuteczniejszym generatorem tlenu singletowego okazała się chloryna zawierająca podstawniki wyciągające elektrony $-CF_3$ w pozycji *para* grup fenyłowych. Zgodnie z oczekiwaniami związek ten w mniejszym stopniu oddaje energię w sposób promienisty (S1-S0) oraz jest najmniej trwały z całej serii badanych fotosensybilizatorów. Szkoda, że Autor nie wyznaczył potencjałów redox dla testowanych związków i nie pokusił się o zbadanie, czy po wzbudzeniu nie ulegają reakcjom fotochemicznym typu I.

Do badań biologicznych użyto związków enkapsulowanych w liposomach. Wszystkie przygotowane liposomowe formułacje chloryn okazały się skuteczne wobec bakterii *E. coli*. Zaobserwowano zależność spadku przeżywalności tych modelowych bakterii Gram ujemnych w zależności od zastosowanej dawki światła. W mojej ocenie najciekawszą częścią pracy było wykazanie synergizmu działania terapii fotodynamicznej z antybiotykami. Największy efekt odnotowano dla *E. coli* oraz ceftriaksonu, gdzie wartość MIC zmniejszyła się szesnastokrotnie.

Uważam, że w ramach badań otrzymano bardzo interesującą grupę związków o pożądanym właściwościach fotochemicznych i dużym potencjale aplikacyjnym. Mając świadomość, że publikacja przeszła rygorystyczny proces recenzji, pozwolę sobie na kilka pytań i uwag, które być może zainspirują Doktoranta do rozszerzenia prowadzonych badań.

1. Jakiego Pana zdaniem, są najefektywniejsze metody wyznaczania wydajności kwantowej tlenu singletowego?
2. Jakich technik badawczych należałoby użyć w celu potwierdzenia mechanizmu I fotosensybilizacji (identyfikacji rodników hydroksylowych i anionorodnika ponadtlenkowego)?



3. Zabrakło mi informacji o współczynnikach podziału oktanol/woda dla badanych związków w celu zorientowania się z jak bardzo hydrofobowymi fotosensybilizatorami mamy do czynienia. Ułatwiłoby to również interpretację badań biologicznych oraz zależności struktura-aktywność.

Schemat trzeciej publikacji pt. **“Zinc(II), Palladium(II), and Metal-Free Phthalocyanines Bearing Nipagin-Functionalized Substituents against *Candida auris* and Selected Multidrug-Resistant Microbes”** jest podobny do pracy 2. Porównano w niej 4 pochodne ftalocyjanin, a w zasadzie zbadano wpływ centralnego jonu metalu (Zn^{2+} vs Pd^{2+}) na właściwości fotochemiczne serii fotosensybilizatorów ftalocyjaninowych. W związku z tym, że wywodzę się z Zespołu Fizykochemii Związków Koordynacyjnych i Chemii Bionieorganicznej, lektura tej pracy była dla mnie prawdziwą przyjemnością. Dlatego też nie dziwi mnie fakt, iż scharakteryzowana w pracy pochodna palladowa okazała się najwydajniejszym generatorem tlenu singletowego przy zachowaniu dużej trwałości termicznej i fotochemicznej. Jednocześnie ze względu na duże prawdopodobieństwo przejść międzysystemowych, związek ten traci właściwości fluorescencyjne. Autor próbuje to wyjaśnić charakterystyką powłok elektronowych jonów palladu, podczas gdy efekt ten jest związany z sprzężeniem orbitalno-spinowym.

Po lekturze tej części publikacji nasuwają się pytania: czym jest efekt ciężkiego atomu, jaki ma wpływ na wydajności kwantowe tworzenia stanów trypletowych oraz na czasy życia stanów trypletowych oraz jakie ma to implikacje w terapii fotodynamicznej?

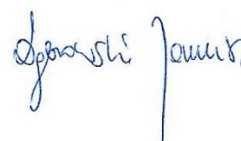
Analogicznie do badanych chloryn, fotosensybilizatory ftalocyjaninowe ze względu na ich dużą hydrofobowość były dostarczane do komórek opornych mikroorganizmów (*E. coli*, *C. albicans*, *C. auris*, *T. mentagrophytes* oraz *T. rubrum*) po ich wcześniejszym zamknięciu w liposomach. Tak przygotowane formułacje zostały wykorzystane do określenia efektywności fotodynamicznej. Odnotowano wyraźny wzrost aktywności badanych związków wraz ze wzrostem dawki światła. Zoptymalizowane warunki eksperymentalne (odpowiednie stężenie, moc źródła światła, czas naświetlania) zaowocowały wyraźnym efektem bakteriobójczym.

Przedstawione przeze mnie uwagi krytyczne w przygotowanej recenzji są zaproszeniem do dyskusji podczas obrony, nie zaś wytknięciem błędów merytorycznych wpływających na końcową bardzo dobrą ocenę pracy. Ponadto część z postawionych przeze mnie pytań można potraktować, jako sugestię do podjęcia dalszych badań w celu głębszego zrozumienia opisanych procesów i wyjaśnienia mechanizmów fotochemicznych i biologicznych.

Podsumowując, uważam że recenzowana praca doktorska spełnia wszystkie wymogi formalne, a dodatkowo warte podkreślenia są wartości naukowe i poznawcze, do których zaliczam:

1. Trafność podjętej problematyki badawczej oraz oryginalne rozwiązanie problemu naukowego;
2. Nowatorski i aktualny temat pracy w aspekcie chorób cywilizacyjnych;
3. Poprawność układu rozprawy doktorskiej, struktury podziału i zawartych w niej treści;
4. Umiejętność poprawnego formułowania celów pracy, hipotez i wniosków;
5. Duże znaczenie praktyczne uzyskanych wyników, w tym możliwość translacji zaprezentowanej ogólnej wiedzy teoretycznej kandydata z dyscypliny nauki farmaceutyczne do badań aplikacyjnych;
6. Umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy, rzetelność naukowa oraz opanowanie warsztatu metodycznego;
7. Poprawność językową, stylistyczną i interpunkcyjną;
8. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych oraz umiejętność zastosowania nowoczesnych technik eksperymentalnych;
9. Właściwy dobór literatury i umiejętność wykorzystania źródeł bibliograficznych w dojrzałej dyskusji naukowej;
10. Rozwojowy charakter pracy, zwłaszcza w aspekcie praktycznego wykorzystania powyższych wyników w badaniach przedklinicznych i klinicznych.

Mając na uwadze powyższe stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wszystkie kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu oraz ustawowe wymogi Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (tekst jedn. Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Zwracam się zatem do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z wnioskiem o kontynuowanie postępowania i dopuszczenie Pana mgr farm. Daniela Zientala do publicznej obrony. **Ze względu na dużą wartość merytoryczną przedłożonej do recenzji pracy zwracam się z osobnym wnioskiem o wyróżnienie pracy.**



Dr hab. Janusz M. Dąbrowski, prof. UJ