



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Biofizyki

Prof. dr hab. Tadeusz Sarna

Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Rapackiej-Zdończyk, zatytułowanej „Mechanizmy adaptacji *Staphylococcus aureus* do stresu oksydacyjnego indukowanego metodą fotodynamiczną”

Alarmujący wzrost wielolekoopornych szczepów wśród patogennych bakterii wywołał prawdziwą konsternację w roku 2015, kiedy opublikowano raport O'Neill'a na ten temat. Raport ten przewiduje, iż do roku 2050, jeśli nie zostaną podjęte odpowiednie kroki dla powstrzymania wzrostu bakterii wielolekoopornych, przedwcześnie umrze 10 milionów ludzi, a skutki finansowe tych zgonów mogą wynieść nawet 100 bilionów dolarów. Nie więc dziwnego, że obawa przed pojawieniem się infekcji bakteryjnych opornych na znane leki okazała się jedną z najważniejszych przyczyn wzmożonego zainteresowania rozwojem alternatywnych, w stosunku do terapii przy użyciu antybiotyków, metod terapeutycznych, które mogą złagodzić nadchodzącą katastrofę. Wydaje się, że do najbardziej obiecujących i innowacyjnych sposobów zabijania bakterii lekoopornych oraz leczenia opornych infekcji zaliczyć należy tzw. przeciwbakteryjną inaktywację fotodynamiczną (aPDI). Metoda ta opiera się na użyciu nietoksycznego barwnika – fotosensybilizatora, który po fotoaktywacji promieniowaniem widzialnym, w obecności tlenu cząsteczkowego, generuje tlen singletowy oraz wolne rodniki. Te tzw. reaktywne formy tlenu (ale również azotu) wykazują działanie cytotoksyczne, które w założeniu powinno być ograniczone do bakterii jakich chcemy się pozbyć. Inaktywacja fotodynamiczna wykazuje zróżnicowaną skuteczność w przypadku różnych mikroorganizmów patogennych, przy czym efektywność fotodynamicznego zabijania okazała się szczególnie duża w przypadku bakterii Gram dodatnich. Uważa się, a przynajmniej tak się do niedawna wydawało, że drobnoustroje chorobotwórcze nie są zdolne do adaptacji do stresu oksydacyjnego indukowanego działaniem fotodynamicznym. Terapia przeciwbakteryjna, bazująca na inaktywacji fotodynamicznej, przeciw której bakterie nie mogłyby skutecznie się bronić i rozwijać odporność, byłaby swego rodzaju przełomem w walce z bakteriami chorobotwórczymi.

Tą niezwykle ważną i aktualną tematyką badawczą zajmowała się mgr Aleksandra Rapacka-Zdończyk, a efektem jej badań są wyniki, które zostały opisane i przedyskutowane w pracy doktorskiej zatytułowanej „Mechanizmy adaptacji *Staphylococcus aureus* do stresu oksydacyjnego indukowanego metodą fotodynamiczną”. Należy podkreślić, że wyniki badań doktorantki zostały dotychczas opublikowane w 8 pracach, jakie ukazały się drukiem w okresie 2013 - 2019 w tak uznanych specjalistycznych czasopismach naukowych jak *Photochemical & Photobiological Sciences*, *Photochemistry and Photobiology B: Biology, Applied Microbiology and Biotechnology*, czy *Frontiers in Microbiology*. Doktorantka prezentowała wyniki swoich badań na kilku międzynarodowych konferencjach naukowych.

Praca doktorska mgr Aleksandry Rapackiej-Zdończyk została wykonana w jednym z wiodących ośrodków naukowych w naszym kraju, Zakładzie Diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy był prof. dr hab. Krzysztof P. Bielawski a promotorem pomocniczym dr hab. Mariusz Grinholc.

Praca doktorska mgr Rapackiej-Zdończyk zredagowana jest w typowy sposób dla tego rodzaju opracowań. Po spisie treści, znajduje się dwustronicowe Streszczenie po polsku i po angielsku oraz obszerny wykaz używanych w pracy doktorskiej skrótów. 27-stronicowy Wstęp składający się z dwu głównych części zatytułowanych „Gronkowiec złocisty” oraz „Inaktywacja fotodynamiczna drobnoustrojów”, to rodzaj zwężłego, ale bardzo treściwego przeglądu literatury związanej z tematem badań. Wstęp stanowi ponadto wygodną platformę dla scharakteryzowania przez doktorantkę

przedmiotu i zakresu swoich badań. Tak więc w pierwszym podrozdziale Wstępu mgr Rapacka-Zdończyk charakteryzuje najważniejsze cechy gronkowca złocistego, rodzaje zakażeń tym patogenem zwracając uwagę na trudności w leczeniu zakażeń szpitalnych. W dalszej części mgr Rapacka-Zdończyk omawia nosicielstwo *S. aureus*, ewolucję oporności na antybiotyki oraz populacje *S. aureus* oraz czynniki wirulencji *S. aureus*. Podana przez doktorantkę krótka charakterystyka genomu *S. aureus* jest o tyle istotna, że w swoich badaniach doktorantka podjęła próbę sprawdzenia czy różnice w genomie *S. aureus*, determinują różną odpowiedź szczepów *S. aureus* na aPDI. W podrozdziale tym scharakteryzowano również kasety SCCmec, czyli mobilne elementy genetyczne występujące w wyspach genomowych, które zawierają geny warunkujące lekooporność bakterii. Przedstawiono ponadto metodę typowania MLST i kompleksy klonalne *S. aureus* oraz technikę typowania spa. Są to ogólnie używane narzędzia do oznaczania tła genetycznego bakterii, którymi posłużyła się doktorantka w swoich badaniach próbując ustalić związek pomiędzy wrażliwością szczepów *S. aureus* na aPDI a ich genomem. Kolejnym elementem genetycznym *S. aureus*, który scharakteryzowała doktorantka jest system globalnej regulacji agr. System ten kontroluje wytwarzanie wielu toksyn i innych czynników wirulencji *S. aureus*, a ponadto uczestniczy w regulacji odpowiedzi bakterii na stres oksydacyjny. Ważną częścią tego podrozdziału jest dość obszerne omówienie zdolności adaptacyjnej *S. aureus* oraz odpowiedzi bakterii na stres oksydacyjny. Jest to uzasadnione przedmiotem badań doktorantki, który dotyczył adaptacji *S. aureus* do stresu oksydacyjnego towarzyszącego działaniu fotodynamicznemu. W podrozdziale tym doktorantka omawia najważniejsze mechanizmy obronne *S. aureus*, umożliwiające bakterii przetrwanie w warunkach stresu oksydacyjnego, począwszy od karotenoidów i enzymów przeciwutleniających, poprzez złożone regulony – OxyR, Sox/SoxS i Fur aż do odpowiedzi SOS, która u bakterii jest jednym z ważniejszych mechanizmów naprawy uszkodzonego DNA. Doktorantka zwraca uwagę na fakt, że odpowiedź SOS pełni kluczową rolę w powstaniu mutacji, które mogą przyczyniać się do adaptacji bakterii w warunkach stresowych. W drugim podrozdziale Wstępu, mgr Rapacka-Zdończyk omawia podstawy terapii fotodynamicznej, szczególnie w odniesieniu do bakterii patogennych. Po krótkim rysie historycznym PDT, doktorantka przedstawia istotę mechanizmów fotosensybilizowanego utleniania, prowadzącego do generowania tlenu singletowego i wolnych rodników. Ponieważ reakcje te zachodzą przy udziale barwników fotosensybilizujących, doktorantka scharakteryzowała fotosensybilizatory powszechnie stosowane w PDT – porfiryny i pochodne, ftalocyjaniny, ksanteny, fenotiazyny i antrachinony. W podrozdziale tym ponadto krótko omówiono zasady inaktywacji drobnoustrojów przy użyciu światła niebieskiego (aBL). Jest to alternatywna w stosunku do typowej aPDI terapia światłem, w której zamiast egzogennych fotosensybilizatorów wykorzystuje się barwniki endogenne, głównie wewnątrzkomórkowe porfiryny. Wstęp kończy się uwagami doktorantki, wynikającymi z dotychczasowych doświadczeń zespołu naukowego, w którym prowadziła swoje badania. Pierwsza to stwierdzenie, że inaktywacja drobnoustrojów charakteryzuje się wyraźną szczepowo-zależną odpowiedzią szczepów. Natomiast druga uwaga dotyczy uszkodzeń materiału genetycznego i aktywacji odpowiedzi SOS w wyniku sub-letalnej inaktywacji fotodynamicznej bakterii. Cały Wstęp, jak również Bibliografia, zawierająca 195 najbardziej istotnych odnośników do fachowej literatury, potwierdzają, że mgr Aleksandra-Zdończyk znakomicie orientuje się w tematyce badań, które stanowiły przedmiot jej pracy doktorskiej.

W kolejnej części rozprawy doktorskiej mgr Rapackiej-Zdończyk bardzo zwięźle sformułowała dwa cele swoich badań. Są to:

1. Identyfikacja markerów genetycznych odpowiedzi *S. aureus* na fotoinaktywację,
2. Ocena prawdopodobieństwa rozwoju tolerancji *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną aPDI/aBL) oraz wyjaśnienie mechanizmu obserwowanej adaptacji *S. aureus* do stresu oksydacyjnego indukowanego metodą fotodynamiczną.

Materiały i metody, jakie doktorantka stosowała w badaniach zostały omówione w trzech oddzielnych rozdziałach Materiały, Aparatura i Metody i łącznie zajmują 20 stron. W doświadczeniach doktorantka użyła aż 750 szczepów wyizolowanych w okresie 10 lat w szpitalach w Gdańsku i Koszalinie. 307 izolatów stanowiły szczepy MRSA a pozostałe 443 to szczepy MSSA. Oprócz standardowych metod

do oznaczenia przynależności gatunkowej szczepów, zastosowano spektrometrię mas MADI-TOF MS. Wykaz wszystkich wykorzystanych w pracy szczepów z ich dokładną charakterystyką, w tym grupą agr, typem kasyety SCCmec, odpowiedzią na aPDI, lekowrażliwością oraz mechanizmami lekooporności, zostały przedstawione w obszernym suplemencie do pracy doktorskiej. W badaniach potencjalnych różnic w odpowiedzi na aPDI między szczepami MRSA i MSSA doktorantka użyła izogeniczne pary szczepów *S. aureus* Newman oraz pary szczepów DK 2574 (z kasetą SCCmec) i DK 2575 (bez kasyety SCCmec). Dodatkowo, użyto 97 szczepów MRSA i 20 MSSA, które posiadały zidentyfikowany rodzaj kompleksu klonalnego i typów spa. Szczepy te pochodziły z kilku znanych na świecie centrów zajmujących się badaniami *S. aureus*. W zależności od konkretnych doświadczeń, używano różne podłoża płynne i stałe. Jako fotosensybilizatorów doktorantka użyła protoporfirynę IX, tertrakis(N-metylopirydyno)profirynę, ftalocyjaninę cynkową, róż bengalski i nowy błękit metylenowy. Są to powszechnie stosowane barwniki fotosensybilizujące charakteryzujące się odmiennym ładunkiem elektrycznym w roztworach wodnych oraz różną hydrofobowością. Jako źródła światła aktywującego użyte fotosensybilizatory zastosowano komercyjny oświetlacz emitujący szerokopasmowe promieniowanie czerwone oraz dedykowane oświetlacze LED, emitujące promieniowanie przy 411 nm, 515 nm i 632 nm. Identyfikacja szczepów *S. aureus* przy pomocy MALDI-TOF-MSD, ustalenie sub-letalnych i letalnych dawek światła i fotosensybilizatora, ustalenie potencjalnego rozwoju tolerancji na stres oksydacyjny, sprawdzenie nabytej tolerancji na stres oksydacyjny i metody biologii molekularnej zastosowane, między innymi, do izolacji DNA i RNA, syntezy cDNA oraz ilościowej reakcji łańcuchowej polimery DNA, identyfikacji kasyety SCCmec, określenia polimorfizmu locus agr, zostały kompetentnie opisane przez doktorantkę w rozdziale Metody. Opis ten jest w pełni adekwatny spełniając najważniejszy cel, tzn. umożliwia odtworzenie warunków doświadczenia przez niezależnych badaczy.

Wyniki, jakie uzyskała mgr Rapacka-Zdończyk, zostały opisane na 40 stronach rozprawy doktorskiej i jest to jej najważniejsza i najobszerniejsza część. Ilustrowane są 40 rycinami i schematami. W swoich badaniach doktorantka potwierdziła, iż odpowiedź szczepów MRSA i MSSA na inaktywację fotodynamiczną przy udziale protoporfiryny IX wykazuje znaczne zróżnicowanie, przy czym odsetek szczepów wrażliwych na fotoinaktywację był większy wśród szczepów MSSA w porównaniu do szczepów MRSA. W poszukiwaniu przyczyn obserwowanych różnic, doktorantka porównała oporność badanych szczepów na wybrane antybiotyki. Dokładna analiza wyników takich badań pokazała jednak, że nie ma związku pomiędzy wrażliwością na fotoinaktywację a niesionym mechanizmem lekooporności; ponadto oporność na antybiotyki nie wpływa na odpowiedź *S. aureus* na aPDI. Wykorzystanie w badaniach doktorantki izogenicznych par szczepów *S. aureus* Newman, w których szczep dziki reprezentował fenotyp MSSA, a szczep pochodny, niosący element mec, fenotyp MRSA, a także jego izogenicznego wariantu z delecją tej kasyety, umożliwiło sprawdzenie wpływu elementu mec na odpowiedź aPDI. Uzyskane wyniki pokazują, że element mec nie wpływa na efektywność fotodynamicznej inaktywacji bakterii. Ponadto stwierdzono, że rodzaj kasyety SCCmec również nie wpływa na odpowiedź *S. aureus* na aPDI. Okazało się natomiast, że operon agr może wpływać na wrażliwość *S. aureus* na aPDI, przy czym wyniki sugerują, że nie tylko funkcjonalność systemu agr, ale również polimorfizm w obrębie genów wchodzących w skład tego systemu odgrywa znaczącą rolę w odpowiedzi *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną. Analiza odpowiedzi 418 izolatów MRSA, u których oznaczano kompleks klonalny CC, na aPDI pokazała, że wrażliwość siedmiu grup klonalnych jest wyraźnie różna. I tak, wszystkie szczepy sklasyfikowane jako CC1 wykazują wyższą tolerancję na aPDI, a wszystkie izolaty CC30 charakteryzują się znacznie wyższą wrażliwością na aPDI. Związek pomiędzy tłem genetycznym a wrażliwością na inaktywację fotodynamiczną stwierdzono również w odniesieniu do typów sekwencji spa. Typowanie spa doprowadziło do wyodrębnienia w grupie szczepów CC45 subpopulacji wrażliwej i średnio-wrażliwej na aPDI. Okazało się ponadto, że znaczny procent izolatów z typem spa t015 i t051 jest wrażliwy i średnio-wrażliwy na aPDI, natomiast szczepy o typie spa t032 i t064 wykazują wyższą tolerancję na aPDI.

W drugiej części tego rozdziału doktorantka opisuje wyniki doświadczeń, które miały wykazać ewentualny rozwój tolerancji u *S. aureus* na aPDI oraz aBL. W moim przekonaniu są to najciekawsze i najbardziej znaczące badania doktorantki. Wyniki tych badań podważają bowiem przyjęty przez

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ
Zakład Biofizyki

większość badaczy, zajmujących się fotodynamiczną terapią przeciwbakteryjną, paradygmat o niemożności wytworzenia tolerancji przeciw tej formie terapii. W oparciu o szczegółowo zaplanowany schemat doświadczeń, w których wybrane szczepy *S. aureus* poddane były od 5 do 15 cyklom sub-letalnych dawek aPDI przy udziale różu bengalskiego jako fotosensybilizatora, doktorantka stwierdziła wystąpienie wyraźnej tolerancji bakterii na letalne dawki stosowanego działania fotodynamicznego. Tolerancja wobec inaktywacji indukowanej światłem niebieskim bez egzogenego fotosensybilizatora wystąpiła również w populacjach *S. aureus* poddanych działaniu sub-letalnych dawek aBL. Uzyskana tolerancja na aPDI/aBL okazała się stabilnym fenotypem. Warto jednak odnotować dość niezwykły fakt, iż nabyta tolerancja jest specyficzna w stosunku do rodzaju użytego fotosensybilizatora i bakterie traktowane sub-letalnymi dawkami aPDI przy użyciu różu bengalskiego nie wykazywały zmniejszonej wrażliwości na aPDI jeśli stosowano jako fotosensybilizator pochodną porfiryny lub nowy błękit metylenowy. W poszukiwaniu możliwych mechanizmów nabytej tolerancji *S. aureus* na aBL, mgr Rapacka-Zdończyk wykazała, iż bakterie traktowane 15 cyklami sub-letalnego napromieniania BL wykazują znacząco większą oporność na toksyczne działanie nadtlenu wodoru. Wydaje się, że fenotypowa stabilność nabytej tolerancji uwarunkowana jest genetycznie, ponieważ sub-letalne traktowanie bakterii aPDI i aBL prowadzi do zwiększonej częstości mutacji *S. aureus* o czym świadczy selekcja komórek opornych na rifampicynę oraz ich zwiększona wrażliwość na gentamycynę i doksycylinę.

Dyskusja wyników przedstawiona jest na 9 stronach pracy doktorskiej i zawiera dwa schematy, z których pierwszy obrazuje fenotypowe i genotypowe cechy *S. aureus*, jakie doktorantka badała poszukując mechanizmu determinującego różnice w odpowiedzi na aPDI u różnych izolatów bakterii, a drugi przedstawia proponowany mechanizm adaptacji *S. aureus* do stresu oksydacyjnego. Odnosząc się do wcześniejszych badań zespołu, w którym została wykonana recenzowana praca doktorska, mgr Rapacka-Zdończyk konkluduje, że wpływ dotychczas analizowanych czynników fenotypowych, takich jak zdolność *S. aureus* do produkcji biofilmu, udział pomp efflux, poziom dysmutazy ponadtlenu, stafilokszantyny czy endogennych porfiryn, a także obecność wybranych czynników wirulencji, nie wystarcza dla jednoznacznego wytłumaczenia obserwowanych różnic w odpowiedzi szczepów na inaktywację fotodynamiczną. Dlatego w swoich badaniach doktorantka skoncentrowała się na sprawdzeniu czy tło genetyczne ma wpływ na wrażliwość izolatów *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną. Jak pokazują otrzymane wyniki taka zależność rzeczywiście ma miejsce, bo przynależność do różnych grup polimorficznych operonu agr, obecność i rodzaj niesionego elementu SCCmec oraz przynależność klonalna i typ spa mają wpływ na odpowiedź izolatów *S. aureus* na badaną fotoinaktywację. Chociaż najbardziej wrażliwe na aPDI okazały się izolaty należące do kompleksu klonalnego CC30 oraz typu spa t015 i t51, doktorantka stwierdza, że ze względu na niewystarczającą liczbę niektórych typów spa, konieczne są dalsze badania dla wyciągnięcia statystycznie istotnych wniosków.

Dyskutując wyniki wskazujące na rozwój tolerancji *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną, doktorantka zwraca najpierw uwagę na te aspekty aPDI i aBL które powinny zwiększać prawdopodobieństwo rozwoju tolerancji czy nawet oporności. Są to: uszkodzenia DNA towarzyszące sub-letalnym dawkom aPDI i aBL, mutagenne działanie reaktywnych form tlenu, konieczność kilkukrotnych aplikacji aPDI lub aBL w warunkach in vivo dla eliminacji bakterii oraz heterogenność środowiska bakteryjnego, które stwarza szansę na przeżycie przynajmniej niektórych bakterii poddanych aPDI. Następnie doktorantka krytycznie odnosi się do pracy przeglądowej Kashef'a i Hamblin'a z 2017, w której autorzy konkludują, że ze względu na nieselektywne, wieloskładnikowe i zależne od reaktywnych form tlenu mechanizmy inaktywacji fotodynamicznej nie niosą ryzyka wytworzenia tolerancji lub oporności bakterii. Mgr Rapacka-Zdończyk nie zgadza się z takimi wnioskami uważając, że zastosowana przez cytowanych autorów metodyka oceny ryzyka rozwoju oporności nie była właściwa. Doktorantka przypomina ogólnie akceptowane podstawowe kryteria, jakie powinna spełniać właściwa metodyka. Chociaż nie jestem ekspertem w tym zakresie, trudno mi się nie zgodzić z argumentami mgr Rapackiej-Zdończyk. Dyskusja kończy się uwagami doktorantki o zasadności skutecznego stosowania aPDI w zabiegach klinicznych pomimo obserwowanej tolerancji. Uważam, że doktorantka przekonująco wyjaśniła zaobserwowane zależności. Szczególnie dobre wrażenie sprawia druga część tego rozdziału, w którym dyskutowana jest mechanizm nabytej przez *S.*

aureus tolerancji na aPDI i aBL. Muszę przyznać, że doktorantka wykazała się sporą odwagą kwestionując ogólnie przyjęty paradygmat o niemożliwości wytworzenia tolerancji przeciw aPDI, oraz przekonywująco dowodząc swoich racji. Bez wątpienia jest to znaczące osiągnięcie naukowe tej pracy doktorskiej.

W rozdziale Wnioski, podsumowano najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej, które jednoznacznie dowodzą, że zamierzone cele badawcze zostały z nawiązką zrealizowane.

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Rapackiej-Zdończyk napisana została poprawną polszczyzną i nie zawiera wyraźnych błędów drukarskich. Nie znalazłem błędów merytorycznych ani wątpliwych interpretacji omawianych wyników. Zamieszczone schematy reakcji oraz rysunki i tabele ilustrujące spełniają swój cel, bo ułatwiają ocenę znaczenia uzyskanych wyników i lepsze zrozumienie przeprowadzonej dyskusji.

Chciałbym jednak, aby doktorantka wyjaśniła ważny aspekt swoich badań, którego obecna interpretacja nie wydaje mi się w pełni przekonywująca. Chodzi o specyficzność nabytej przez bakterie tolerancji na aPDI względem fotosensybilizatora. Jak wiadomo, każdy z organicznych barwników fotosensybilizujących fotogeneruje zarówno tlen singletowy jak i wolne rodniki. Jeśli więc obserwowana specyficzność miałyby być następstwem różnych reaktywnych form tlenu, to trudno byłoby to uzasadnić w przypadku TMPyP oraz nowego błękitu metylenowego, jako alternatywnych fotosensybilizatorów. Czy zaobserwowana specyficzność nabytej tolerancji względem fotosensybilizatora ma związek z tym, że TMPyP oraz NBM w wodzie przy neutralnym pH występują w postaci kationów, podczas gdy RB jest anionem? Zapewne odmienny ładunek elektryczny barwnika fotosensybilizującego wpływa na jego lokalizację wewnątrzkomórkową. Aby odpowiedzieć na te pytania, czy wskazane czynniki mogą wpływać na wytworzenie tolerancji przeciw aPDI, należałoby użyć barwników fotosensybilizujących o podobnych właściwościach elektrycznych.

Ponadto z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na kilka aspektów terminologicznych, co do których mam wątpliwości:

1. Str. 27: „...katalaza katalizuje dysmutację H₂O₂ do H₂O i tlenu...” Chociaż produktami tej reakcji są odpowiednio utlenione i zredukowane cząsteczki substratu, mechanizm reakcji jest odmienny od typowej reakcji dysmutacji. Chyba lepiej używać terminu katalaza katalizuje rozpad H₂O₂.
2. Str 34: „...Reakcja fotodynamiczna może zachodzić według dwóch mechanizmów...” Trudno mówić o „reakcji fotodynamicznej”, ponieważ zwykle odnosi się to do złożonego procesu (działanie fotodynamiczne), przez który rozumie się szereg procesów na poziomie cząsteczek i przynajmniej komórek, prowadzących do inaktywacji komórki. Jeśli analizujemy konkretne mechanizmy prowadzące do generowania reaktywnych form tlenu, to bardziej zasadnym jest użycie terminu „reakcje fotosensybilizowanego utleniania”.
3. Str 34: jak wyżej – RFT nie są produktami „reakcji fotodynamicznej”, ale reakcji fotosensybilizowanego utleniania
4. Str 34: „...RFT są to związki o wysokim potencjale oksydacyjno-redukcyjnym...” Jeśli przez RFT rozumie się również anionorodnik ponadtlenkowy i tlenek azotu, to takie stwierdzenie nie jest zasadne.
5. Str 34: „...” jedną z najbardziej reaktywnych form tlenu jest tlen singletowy...” To też nie jest ścisłe, bo jednoelektronowy potencjał redukcji tlenu singletowego nie jest zbyt wysoki. Tlen singletowy jest bardzo specyficznym utleniaczem i np. z nienasyconymi lipidami reaguje dość wolno.
6. Str 35: „...Cząsteczki uczulacza przechodząc do wzbudzonego stanu energetycznego...” raczej wzbudzonego stanu elektronowego
7. Str 36: „... Związki... posiadają zarówno właściwości spektroskopowe, magnetyczne i luminescencyjne...” Jeśli można się zgodzić z „właściwościami luminescencyjnymi”, to dwie

pierwsze właściwości nie są na miejscu. Przecież każdy barwnik posiada jakieś właściwości spektroskopowe, chociaż niekoniecznie obserwowane w zakresie widzialnym i każda substancja posiada określone właściwości magnetyczne jako diamagnetyk lub paramagnetyk. Może doktorantce chodziło o możliwości występowania porfiryn w formie wolno rodnikowej.

Wyniki uzyskane przez doktorantkę należy uznać za wartościowe i ważne ze względu na rosnące zagrożenie ze strony wielolekoopornych bakterii. Jest szansa, że badania mgr A. Rapackiej-Zdończyk przyczynią się do znalezienia bardziej skutecznych sposobów zwalczania tych bakterii.

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Rapackiej-Zdończyk Dębowskiej spełnia zwyczajowe standardy prac doktorskich w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne oraz wymogi art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym i dlatego wnoszę do Wysockiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie mgr Aleksandry Rapackiej-Zdończyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/Tadeusz Sarna/