

Prof. dr hab. Anna Herman-Antosiewicz
Katedra Biologii i Genetyki Medycznej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 03.12.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana Karola Pawła Steckiewicza
pt. „Wpływ modyfikacji mikrocząsteczek i nanocząsteczek na ich aktywność cytotoksyczną
i właściwości przeciwbakteryjne w badaniach *in vitro*”

Ostatnimi laty jesteśmy świadkami dużego postępu w zakresie produkcji i wykorzystania w wielu dziedzinach nauki, przemysłu i medycyny cząsteczek w skali nano i mikro. Ich właściwości, takie jak wysoki stosunek pola powierzchni do objętości, możliwości funkcjonalizacji oraz reaktywność i zdolność przechodzenia przez błony biologiczne, czynią je obiektem badań w kierunku m.in. projektowania nowoczesnych leków czy nośników terapeutyków oraz biomateriałów do konstrukcji implantów. Cechy, które stanowią zaletę tych cząsteczek w zastosowaniach biomedycznych mogą jednak też być ich minusami. Konieczne są zatem dalsze badania nano- i mikrocząsteczek, również poddanych różnym modyfikacjom, w kierunku ich pożądaných aktywności oraz toksyczności dla prawidłowych komórek organizmu i ewentualnych efektów terapii z ich użyciem.

Pan Karol Steckiewicz w swojej pracy doktorskiej badał aktywność przeciwnowotworową nanocząsteczek złota oraz aktywność antybakteryjną mikrocząstek fosforanu srebra w zależności od ich kształtu, rozmiaru i funkcjonalizacji. Swoje badania wykonał w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem pani prof. dr hab. Iwony Inkielewicz-Stępnia. Badane nano- i mikrocząsteczki były zsyntetyzowane i scharakteryzowane pod względem fizyko-chemicznym przez zespół pani prof.

dr hab. Adrian Zaleskiej-Medynskiej z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, a funkcjonalizowane nanocząsteczki złota - przez zespół pod kierunkiem pana dr Michała Wójcika z Uniwersytetu Warszawskiego.

Rozprawa doktorska jest przedstawiona w postaci zbioru czterech spójnych tematycznie, wieloautorskich publikacji. Jest ona opatrzona bardzo starannie przygotowanym streszczeniem w języku polskim i angielskim. Składają się na nie: wykaz skrótów, wprowadzenie do tematyki podjętych badań, cele pracy, materiały i metody, krótkie omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy, podsumowanie badań oraz spis cytowanego piśmiennictwa. Do dokumentacji dołączone są oświadczenia Kandydata i współautorów poszczególnych prac, którzy informują zarówno o swoim udziale w ich powstaniu jak i szacują wkład pana Steckiewicza. W przypadku jednej z prac (w *Int. J. Med. Sci.* z 2020 r.) wkład Kandydata został przez wszystkich współautorów oceniony na 55%, co jest chyba przeszacowane, zważywszy, że w pracy tej jest On równorzędnym autorem z panią Barcińską. Niemniej jednak deklaracje te pozwalają wyodrębnić część wykonaną przez pana Steckiewicza i jednoznacznie wskazują, że miał On znaczący udział w części koncepcyjnej, w wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptów. O znacznym wkładzie Kandydata w powstanie tych prac świadczy też to, że we wszystkich jest pierwszym autorem. Rozprawa zatem spełnia ustawowe wymogi formalne.

Prace składające się na rozprawę doktorską pana Steckiewicza zostały opublikowane w latach 2019-2020 w dobrych i bardzo dobrych czasopismach o międzynarodowym zasięgu, zatem przeszły już ocenę ekspertów. Pozycją rozpoczynającą cykl jest praca przeglądowa opublikowana w *Nanomaterials* (IF₂₀₁₉=4,324; punkty MNiSW=70) w 2020 roku pt. „Modified nanoparticles as potential agents in bone diseases: cancer and implant-related complications”. Autorzy (Kandydat wraz z panią Promotor) skupili się na analizie prac pokazujących wykorzystanie nanocząsteczek różnego pochodzenia i poddanych różnym modyfikacjom w problemach ortopedycznych - terapii nowotworów kości oraz w profilaktyce zakażeń drobnoustrojami i poprawie biokompatybilności implantów. Przedstawione są tutaj wyniki badań *in vitro*, które częściowo wyjaśniają mechanizm cytotoksycznego działania nanocząsteczek polegający na indukcji stresu oksydacyjnego i apoptozy komórek nowotworowych. Ciekawe i obiecujące jest zastosowanie nanocząsteczek jako nośników leków lub potencjalnych leków (np. kurkuminy), które w takim połączeniu efektywniej docierają do mikrośrodowiska guza i przełamują oporność wielolekową zmienionych komórek, a także jako magnetycznych

nanocząsteczek w terapii hipertermicznej, co potwierdzają badania *in vivo*. Lektura części poświęconej możliwościom projektowania implantów z zastosowaniem nanocząsteczek i zalet takich biomateriałów, na które składają się m.in. aktywność antybakteryjna oraz stymulująca odnowę tkanki, nie pozostawia złudzeń, że jest to przyszłość medycyny regeneracyjnej. Autorzy wskazują słabo do tej pory zbadane obszary aktywności nanocząsteczek, takie jak ich działanie na prawidłowe komórki organizmu.

Praca eksperymentalna pt. „Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in *in vitro* model: evaluation of the safety of use and anti-cancer potential” opublikowana w *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* w 2019 r. (IF₂₀₁₉=2,489; punkty MNiSW=70, l. cytowań - 28) poświęcona jest ocenie toksyczności nanocząsteczek złota w zależności od ich kształtu i wielkości względem komórek kostniakomięsaka (linie 143B i MG63) oraz prawidłowych ludzkich płodowych osteoblastów (hFOB 1.19) i prawidłowych komórek przewodu trzustkowego (hTERT-HPNE). Uzyskane rezultaty pokazują, że nanocząsteczki w kształcie gwiazd (średnica ok. 250 nm) są najbardziej aktywne i efektywniej obniżają żywotność komórek nowotworowych, szczególnie tych szybciej dzielących się i bardziej agresywnych. Również nanocząsteczki w kształcie prętów wykazują aktywność antyproliferacyjną, za to najmniejsze - sferyczne nanocząsteczki - są najmniej toksyczne. Aktywne nanocząsteczki podwyższają ilość proapoptotycznego białka Bax względem antyapoptotycznego białka Bcl-2. W zależności od kształtu lokują się w różnych kompartmentach komórki, powodują wzmoczoną wakuolizację, a w wyższych stężeniach – destabilizują błonę cytoplazmatyczną. Zdjęcia ultrastruktury komórek były wykonane dla prawidłowych komórek trzustki traktowanych nanocząsteczkami w bardzo wysokich stężeniach (10 i 50 µg/ml), ale w pracy nie pokazano stopnia wrażliwości tych komórek na badane związki (wyników testów MTT lub NR). Autorzy piszą, że badane nanocząsteczki indukują apoptozę (w Conclusions: „We proved that AuNPs induced apoptosis in human human osteosarcoma cells...”), jednak na zdjęciach z TEM nie widać jej oznak. Czy Autorzy stosowali jakieś inne metody służące do wykrywania apoptozy? Zaburzenie równowagi białek z rodziny Bcl-2 niekoniecznie wskazuje na ten rodzaj śmierci komórek.

Kolejnym krokiem pana Steckiewicza była ocena działania nanocząsteczek złota jako nośnika leków. Wykorzystał On sferyczne, czyli najmniej toksyczne molekuly, które były stabilizowane glutationem (GSH) i miały dołączone cząsteczki doksorubicyny, cytarabiny lub gemcytabiny. Testował je względem komórek nowotworu piersi (MCF7), trzustki (PANC-1) i

kostniakomiesaka (143B) oraz prawidłowych komórek (MCF10A, hFOB 1.19). W pracy pt. „Assessment of anti-tumor potential and safety of application of glutathione stabilized gold nanoparticles conjugated with chemotherapeutics” w *International Journal of Medical Sciences* z 2020 r. (IF₂₀₁₉=2,523; punkty MNiSW=100; l. cytowań - 1) pokazuje, że dodanie GSH do nanocząsteczek już obniża żywotność komórek w stopniu zależnym od stężenia tych molekuł, a obecność leku dodatkowo zwiększa ich działanie, przy czym komórki prawidłowe są generalnie mniej wrażliwe niż nowotworowe, choć zależy to od rodzaju leku. Przedstawione są też krzywe żywotności komórek dla samych leków, ale trudno to odnieść do wyników z koniugatami leków z nanocząsteczkami bez informacji, jaką ich część stanowi lek (jakie jest jego stężenie w danej dawce funkcjonalizowanych nanocząsteczek?). Mam też pytanie odnośnie wyników MTT (Fig.8) - co stanowiło kontrolę, czy komórki traktowane DMSO, czy samymi sferycznymi nanocząsteczkami złota?

W ostatniej z cyklu prac Kandydat badał mikrocząsteczki fosforanu srebra o różnych kształtach, nie tylko pod względem właściwości cytotoksycznych, ale też antybakteryjnych. Właściwie zostały one zaprojektowane z myślą o zastosowaniu w alloplastyce stawów, tak by były kompatybilne z tkanką kości, miały właściwości przeciwdrobnoustrojowe i były możliwie bezpieczne dla organizmu biorcy. Testowano ich aktywność względem bakterii *Staphylococcus aureus* (wraz ze szczepem metycylino-opornym MRSA) oraz grzybów *Candida albicans* i *Aspergillus niger*, zarówno rosnących w planktonie jak i w biofilmie, oraz komórek kości (prawidłowych hFOB 1.19 i nowotworowych SaoS-2), mięśni (C2C12) i fibroblastów skóry (HDFa). Wyniki zostały przedstawione w pracy pt. „Shape-dependent biological properties of Ag₃PO₄ microparticles: evaluation of antimicrobial properties and cytotoxicity in in vitro model - safety assessment of potential clinical usage” opublikowanej w *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* w 2019 r. (IF₂₀₁₉=5,076; punkty MNiSW=100; l. cytowań - 4). Wskazują one, że efektywność badanych mikrocząsteczek zależy od ich kształtu oraz gatunku drobnoustroju. Najbardziej skuteczne okazały się sferyczne i sześciennie, szczególnie względem grzybów, jednak cząsteczki te w stężeniach zbliżonych do MIC w większości poważnie obniżały żywotność i proliferację komórek ssaczych (+/- 30-80%). Kandydat stwierdził, że w najbardziej wrażliwych komórkach C2C12 mikrocząsteczki te w stężeniu 5 µg/ml indukowały stres oksydacyjny (podwyższenie poziomu ROS, wzrost poziomu białek SOD3 i GPX4) i podwyższały poziom białek związanych z odpowiedzią prozapalną (NF-κB i MMP3), natomiast nieznacznie tylko miały wpływ na przebieg cyklu komórkowego czy morfologię komórek. Tu nasuwa się pytanie,

czy sprawdzono rolę stresu oksydacyjnego w odpowiedzi komórek na testowane mikrocząsteczki? Czy zastosowanie antyoksydantów nie stanowiłoby ochrony i nie zapobiegałoby toksyczności badanych molekuł względem komórek ssaczych? Warto podkreślić, że Autorzy bardzo wyczerpująco przedyskutowali możliwe mechanizmy działania antibakteryjnego i możliwości bezpiecznego zastosowania badanych mikrocząstek u ludzi.

Podsumowując, prace składające się na rozprawę doktorską pana Karola Steckiewicza pokazują, że:

1. wielkość i kształt nanocząsteczek złota ma wpływ na ich selektywność i działanie antyproliferacyjne względem komórek nowotworu kości,
2. nanocząsteczki złota mogą być użyte jako nośniki leków, przy czym ich skuteczność zależy od typu komórek nowotworowych,
3. odpowiednio dobierając stężenie i kształt mikrocząsteczek fosforanu srebra, można uzyskać efektywne zahamowanie wzrostu bakterii i grzybów, również rosnących w biofilmie, przy minimalnej ingerencji w procesy komórek ssaczych,
4. uzyskane rezultaty stanowią doskonały wstęp do kolejnych badań na modelu *in vivo*.

Uważam, że oceniana praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a uzyskane rezultaty są interesujące z naukowego punktu widzenia oraz dla praktycznego zastosowania. O ich wadze świadczy też to, publikacje składające się na ocenianą rozprawę były cytowane już 33 razy, mimo że zostały opublikowane w ostatnich dwóch latach. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020 r., poz. 85 z późn. zm.). Zwracam się zatem do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z prośbą o dopuszczenie pana Karola Pawła Steckiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na dużą wartość poznawczą oraz potencjał aplikacyjny wyników tej rozprawy, wnoszę o jej wyróżnienie.

Anne Hermen - Antkowiak