

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Justyny Hajtuch

pt. „Ocena wpływu funkcjonalizowanych nanocząstek srebra na układ hemostazy oraz aktywność przeciwbakteryjną w badaniach *in vitro* i *ex vivo*”

wykonanej na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Katedrze i Zakładzie Patofizjologii Farmaceutycznej pod kierunkiem dwóch promotorów:
prof. dr hab. Iwony Inkielewicz-Stępniaak oraz
prof. Marii Jose Santos-Martinez z School of Pharmaceutical Science and School of Medicine Trinity College w Dublinie

Choroby układu krążenia (CVD) są, obok nowotworów, jedną z najczęstszych przyczyn zgonów wśród mężczyzn i kobiet w wieku 45–60 lat, a dla osób powyżej 60. roku życia najczęstszą. Choroby nowotworowe z uwagi na przyjmowane leki również przyczyniają się do problemów z układem krążenia. Powodem są chemoterapeutyki, które są silnie cytotoksyczne dla komórek nowotworowych ale jednocześnie wpływają negatywnie na zdrowe komórki w tym na komórki krwi i komórki naczyń krwionośnych, prowadząc do zakrzepów i uszkodzeń naczyń krwionośnych. Dlatego bardzo ważne jest testowanie nowych leków przeciwnowotworowych w kierunku inicjacji przez nie zakrzepów i zakłóceń hemostazy osoczowej i płytkowej, prowadzących do chorób układu krążenia. Innym powodem wtórnych zachorowań na CVD są zakażenia bakteryjne krwi, które najczęściej powstają na skutek długotrwałego używania cewników dożylnych. Obiektami badawczymi w ocenianej rozprawie doktorskiej są nanocząstki srebra (AgNPs), które obecnie są bardzo popularnym obiektem badań w nanomedycynie. Istnieje jednak niewiele doniesień literaturowych na temat wpływu NPs na układ hemostazy osoczowej i płytkowej. W nurt tych badań wpisuje się praca doktorska mgr Justyny Hajtuch, która postanowiła przebadać nową grupę nanocząstek srebra w kierunku ich wpływu na przyczyny powstawania chorób CVD oraz zakażeń mikrobiologicznych.

Rozprawa doktorska mgr Justyny Hajtuch została wykonana pod opieką prof. dr hab. Iwony Inkielewicz-Stępniaak oraz prof. Marii Jose Santos-Martinez z School i była realizowana w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) HARMONIA. Doktorantka przedstawiła wyniki swojej pracy w postaci dysertacji doktorskiej będącej zbiorem publikacji

opatrzonych wstępem i syntetycznym opisem uzyskanych rezultatów badań. Otwiera ją wykaz prac wchodzących w skład rozprawy z pełnymi danymi bibliometrycznymi. Następnie przedstawione zostało streszczenie pracy w języku polskim i angielskimi. Streszczenie obejmuje spis stosowanych skrótów i symboli, wprowadzenie teoretyczne, cel pracy, opis materiałów i metod, krótkie omówienie wyników każdej z publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej oraz podsumowanie. Ta część pracy zawarta jest na 48 stronach maszynopisu. Pracę zamyka wykaz 46 pozycji literaturowych cytowanych przez autorkę. Około 50% z nich to odniesienia do publikacji z ostatnich sześciu lat, co świadczy o tym, że podjęty przez Doktorantkę temat pracy doktorskiej jest nowatorski oraz cieszy się bardzo dużym zainteresowaniem. Streszczenia napisane są w języku polskim i angielskim, w sposób poprawny i przystępny i są tożsame w treści. Ta część pracy nie jest bogato ilustrowana rysunkami czy tabelami, jednak czytelnik może zawsze odwołać się do oryginalnych publikacji przedstawionych w dalszej części pracy doktorskiej.

W krótkim wprowadzeniu do dysertacji, znajdującym się na początku Streszczenia, mgr Justyna Hajtuch podjęła się niełatwego zadania jakim było przedstawienie w sposób możliwie syntetyczny, informacji na temat chorób układu krążenia, czynników wpływających na rozwój zakrzepicy oraz konieczności poszukiwania leków przeciwzakrzepowych. Opisała również rolę nanocząstek w profilaktyce i leczeniu chorób człowieka. Z zadania tego Autorka wywiązała się bardzo dobrze. Lektura wstępu teoretycznego pokazuje dużą biegłość Doktorantki w tematyce chorób zakrzepowych oraz nanocząstek stosowanych jako potencjalne leki lub nośniki.

Motywacją dla Doktorantki do realizacji pracy doktorskiej był fakt że z uwagi na negatywne aspekty stosowania chemioterapii oraz pojawiających się zakażeń bakteryjnych, związanych z długotrwałym stosowaniem cewników dożylnych, bardzo często pojawiają się wtórne problemy zakrzepowe. Istnieje więc ciągła potrzeba poszukiwania nowych leków/substancji hamujących tworzenie zakrzepów. Dlatego też, **celem badań recenzowanej pracy doktorskiej było określenie czy funkcjonalizowane nanocząstki srebra wpływają na układ hemostazy oraz czy posiadają aktywność przeciwdrobnoustrojową**. Dodatkową motywacją do realizacji celu badawczego pracy doktorskiej było pokazanie, że rozwój terapii przeciwnowotworowych i przeciwbakteryjnych musi być skorelowany z badaniami interakcji z układem hemostazy nowych leków/terapii w modelach *in vitro* oraz *ex vivo*. W mojej ocenie cel pracy doktorskiej został postawiony prawidłowo, gdyż istnieje realna potrzeba stosowania uproszczonych modeli, oddających realne mikrośrodowisko układu krążenia człowieka.

Następny rozdział Streszczenia, zatytułowany „Materiały i metody”, został przez Doktorantkę podzielony na czternaście części, w których opisała wszystkie zastosowane przez siebie materiały i metody badawcze. Na początku rozdziału wyjaśniła skąd pochodzą wszystkie testowane przez nią nanocząstki srebra (AgNPs), w rozdziale tym podała także pochodzenie prokariotycznych komórek i eukariotycznych linii komórkowych oraz komórek pierwotnych. Następnie mgr Hajtuch opisała procedury i metody stosowane podczas testowania. Należały do nich: (i) izolacja płytek krwi i erytrocytów, (ii) testy biokompatybilności AgNPs, (iii) badanie

utrastruktury komórek, (iv) ocena poziomu reaktywnych form tlenu, (v) ocena indukowania przez AgNPs apoptozy/nekrozy, (vi) pomiar destabilizacji potencjału mitochondrialnego, (vii) ocena ekspresji P-selektyny i glikoproteiny GPIIb/IIIa, (viii) pomiar agregacji płytek krwi, (ix) ocena ekspresji parametrów z zakresu hemostazy, (x) analiza parametrów z zakresu koagulacji oraz (xi) analiza statystyczna. Wszystkie czynności zostały opisane bardzo ogólnie ale w pełni zrozumiale. Szczegółowe procedury zostały opisane w publikacjach stanowiących podstawę dysertacji.

W kolejnej części Streszczenia mgr Justyna Hajtuch bardzo krótko przedstawia założenia i wyniki czterech opublikowanych prac, stanowiących rdzeń rozprawy. Prace zostały opublikowane w następujących specjalistycznych czasopismach z listy JCR: *Int. J. Nanomed. (2022, praca przeglądowa)*, *Front. Pharmacol. (2022)*, *Curr. Med. Chem. (2021)* i *Int. J. Nanomed. (2019)*. We wszystkich publikacjach mgr Justyna Hajtuch jest pierwszym autorem, co świadczy o jej dominującym wkładzie w prace eksperymentalne i edytorskie związane z przygotowaniem manuskryptów. Każdy współautor publikacji dostarczył oświadczenie dotyczące wkładu pracy w przywoływane publikacje, zatem „prawa” Doktorantki do wykorzystania tych publikacji w dysertacji są uzasadnione. Lektura poszczególnych rozdziałów w kontekście wkładu pracy mgr Hajtuch pokazuje jej udział w samodzielnie zaprojektowanie eksperymentów (i)-(xi) na podstawie przeglądu literatury, doświadczenia promotorów oraz możliwości aparaturowych Zakładu Patofizjologii Farmaceutycznej. Publikacje przedstawione są w porządku skutkowo-przyczynowym. Pierwsza publikacja to praca przeglądowa na temat leków opartych o nanocząstki, następne trzy publikacje to prace oryginalne w których Kandydatka opisała badania na wybranych modyfikowanych AgNPs.

Pierwsza publikacja (I) to bardzo obszerna praca przeglądowa (23 strony wraz z literaturą) dotycząca aktualnych badań *in vitro* i *in vivo* nad lekami opartymi o NPs. W publikacji tej znaleźć można opis wpływu chemioterapeutyków, stosowanych w leczeniu nowotworów na rozwój chorób CVD. Dalej znajduje się szczegółowy przegląd literaturowy (191 odnośników literaturowych) oraz opis pozytywnego działania przeciwnowotworowych nanoleków-NPs w kierunku aktywności przeciwplatek, przeciwkrzepliwnej i antyangiogennej w porównaniu do klasycznych leków. Praca ta wzbogacona jest o dane statystyczne oraz tabelaryczne zestawienie potencjalnych nanoleków-NPs o zwiększonej aktywności przeciwnowotworowej (Tabela 1) oraz efektywnych w chorobach CVD (Tabela 3) w stosunku do klasycznych leków. Za bardzo cenne zestawienie tabelaryczne (Tabela 2) uznaję listę dopuszczonych do leczenia nanocząstek (NPs i innych). Są to nanocząstki głównie nakierowane na leczenie nowotworów i chorób wirusowych. Z resztą w czasie trwania pandemii COVID-19 wielu z nas mogło się osobiście przekonać o zastosowaniu nanocząstek lipidowych jako nośników dla mRNA. Pracę przeglądową przeczytałam z wielką przyjemnością, gdyż wzbogaciłam się w wiedzę na temat najnowszych trendów w zakresie nanoleków-NPs. Ciekawa jestem tylko czy podczas lektury wielu publikacji Doktorantka znalazła informacje na temat istnienia systemów diagnostycznych, opartych o NPs do wykrywania chorób układu krążenia?

Druga publikacja (II) dotyczy badań nad AgNPs modyfikowanych glutationem (AGNPs-GS), kwasem liponowym (AgNPs-LA) oraz glikolem polietylenowym (AgNPs-PEG) w kierunku ich biokompatybilności oraz ich działania przeciwplatek. AgNPs zostały zsyntezowane i scharakteryzowane na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Badania biologiczne w kierunku wpływu AgNPs na agregację płytek krwi w warunkach przepływu, określenia receptorów płytkowych oraz testów cytotoksyczności wobec komórek HUVEC, HGF-1 i komórek krwi, pomiaru poziomu MMP-1 i MMP-2 zostały wykonane przez mgr Justynę Hajtuch. Wyniki tych badań wskazują, że AgNPs modyfikowane GS, LA i PEG hamują agregację płytek i nie są cytotoksyczne.

W trzeciej publikacji (III) zaplanowane i opisane zostały badania nad nanocząstkami srebra pokrytymi kwasem liponowym w kierunku ich działania przeciwbakteryjnego oraz cytotoksycznego wobec komórek formujących naczynia krwionośne (HUVEC) i hemolitycznego w stosunku do erytrocytów. Z przeprowadzonych badań wynika, że AgNPs oraz AgNPs-LA posiadają aktywność przeciwbakteryjną wobec wybranych szczepów bakterii. Wyniki badań pokazały że AgNPs-LA nie indukują powstawania ROS, nie prowadzą do depolaryzacji błony mitochondrialnej oraz do apoptozy komórek HUVEC w przeciwieństwie do AgNPs. Pokazała również, że AgNPs-LA nie powodowały uwalniania hemoglobiny i LDH z erytrocytów. Nanocząstki AgNPs-LA, w przeciwieństwie do niemodyfikowanych nanocząstek, nie powodują zmian ultrastrukturalnych w badanych komórkach HUVEC, za to obydwie formy NPs zmieniają morfologię komórek bakteryjnych *S. aureus*.

W czwartej publikacji (IV) przeprowadzone zostały badania nad AgNPs modyfikowanych cyklicznym peptydem eptyfibatydem (AgNPs-EPI) w kierunku działania przeciwaagregacyjnego. Eptyfibatyd selektywnie wiąże się z płytkowym receptorem GPIIb/IIIa, co powoduje krótkotrwałe hamowanie agregacji płytek. Peptyd został osadzony na nanocząstkach srebra, które miały stanowić nośnik dla peptydu. W wyniku przeprowadzonych badań Kandydatka pokazała, że AgNPs-EPI wykazywały lepsze właściwości w niższych stężeniach aniżeli wolny peptyd (EPI) w zakresie następujących właściwości: hamowanie agregacji płytek, ekspresja selektyny P, zmiany konformacyjne receptora GPIIb/IIIa, wydłużenie czasu okluzji w obecności kolagenu/ADP/adrenaliny.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że we wszystkich publikacjach oryginalnych (II-IV) można znaleźć bardzo dojrzałe dyskusje, które poruszają każdy aspekt badanego problemu i są zestawione z najnowszymi danymi literaturowymi. W publikacjach II i III znajdują się również rozdziały na temat ograniczeń i perspektyw prowadzonych badań, co również wskazuje na pewnego rodzaju pokorę autorów wobec nauki oraz świadomość ograniczeń jakie niosą badania *in vitro* oraz *ex vivo*. Wszystkie zawarte w dysertacji publikacje (II-IV) są w mojej opinii prawidłowo zaplanowane, metody dobrane właściwie a wyniki zinterpretowane prawidłowo.

Recenzowanie pracy będącej zastawieniem już ocenionych wcześniej publikacji nie ułatwia Recenzentowi zadania spełnienia tzw. „obowiązku recenzenckiego”, czyli wyszukania jej słabszych punktów. W przedstawionej dysertacji udało mi się znaleźć ich ledwie kilka.

- 1) W publikacji II i III, do przygotowania AgNPs-LA lub w publikacji IV, do przygotowania AgNPs-EPI dodano borowoderek sodu do roztworów kwasu liponowego lub eptyfibatydu. W jakim celu? W związku z tym jaka cząsteczka przyłączona jest do powierzchni AgNPs?
- 2) Jaka jest gęstość upakowania GSH, LA i PEG na powierzchni NPs (publikacja II)?
- 3) Czy sprawdzana była stabilność badanych AgNPs w pożywce lub w buforze w czasie 24 godzin (publikacje II-IV)? Czy cząsteczki GSH, LA, PEG i EPI uwalniały się z powierzchni AgNPs?
- 4) Dlaczego w publikacji III nie zastosowano jako kontrolę nanocząstek zsyntezowanych samodzielnie (takich jak w publikacji II) a zakupionych, które miały większe rozmiary aniżeli syntezowane.
- 5) Na rysunku 3 i 4 w publikacji II jako kontrole powinny znajdować się dodatkowo widma czystego AgNPs (FTIR i TGA) oraz LA/PEG/GSH (TGA). Proszę również o porównanie widm FTIR np. AgNPs-PEG z literaturowymi widmami. Skąd mogą wynikać różnice?
- 6) Czy sprawdzane były oddziaływania badanych AgNPs z kolagenem lub MMP-2 i MMP-1 (publikacja II). Czy istnieje szansa, że niemodyfikowane lub modyfikowane AgNPs obniżają poziom ekspresji P-selektyny, GPIIb/IIIa oraz MMP poprzez związanie kolagenu lub MMP?
- 7) Jaki może być mechanizm oddziaływania AgNPs-EPI z białkiem GPIIb/IIIa? W publikacji IV nanocząstki srebra są nośnikiem dla peptydu EPI. Czy badany był stopień uwalniania peptydu z nośnika? Jaka może być pewność że z receptorem GPIIb/IIIa nie oddziałuje z AgNPs-EPI lub z dimerem peptydu EPI. Czy w literaturze badany był wpływ zredukowanej cząsteczki EPI na hamowanie agregacji płytek zależnych od receptora GPIIb/IIIa?
- 8) Czy istnieje szansa, że AgNPs-LA mogą posiadać aktywność przeciwgrzybiczą lub przeciwwirusową?

Do najważniejszych osiągnięć pracy, stanowiących jednocześnie element nowości naukowej, zaliczam pełną charakterystykę **nowych nanocząstek srebra** oraz sprawdzenie ich działania w modelu *in vitro* oraz *ex vivo* w zakresie efektów przeciwdrobnoustrojowych i wpływu na układ hemostazy osoczowej i płytkowej. Reasumując, uważam, że cele pracy doktorskiej zostały w pełni zrealizowane. Wartość merytoryczną rozprawy mgr Justyny Hajtuch potwierdza fakt, że jest to materiał już opublikowany, a więc przepuszczony przez gęste sito wnikliwych recenzji specjalistów w dziedzinie.

Uważam, że tematyka pracy doktorskiej jest bardzo interesująca i niezwykle potrzebna w świetle pogarszających się statystyk zachorowalności na choroby układu krążenia. Część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki doskonale

przedyskutowane i zinterpretowane. Rozprawa doktorska Pani Justyny Hajtuch zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Justyny Hajtuch do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.



Sylwia Rodziewicz-Motowidło