

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ Pani mgr Justyny Hajtuch

p.t. "Ocena wpływu funkcjonalizowanych nanocząstek srebra na układ hemostazy oraz aktywność przeciwbakteryjną w badaniach in vitro i ex vivo" wykonanej w Katedrze i Zakładzie Patofizjologii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod promotorską opieką Pani Prof. dr hab. Iwony Inkielewicz-Stępnia, oraz Prof. Marii Jose Santos-Martinez (School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences and School of Medicine Trinity College Dublin)

Nanomedycyna jest intensywnie rozwijającą się obszarem badań poznawczych oraz aplikacyjnych i jej dynamiczny rozwój otwiera ogromne nowe możliwości diagnostyczne i terapeutyczne. W szczególności, lawinowo pojawiają się w literaturze różnego rodzaju funkcjonalizowane nanocząstki dostosowane do różnorodnych zastosowań diagnostycznych i terapeutycznych. W ten nurt badań wpisuje się przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Justyny Hajtuch p.t. *"Ocena wpływu funkcjonalizowanych nanocząstek srebra na układ hemostazy oraz aktywność przeciwbakteryjną w badaniach in vitro i ex vivo"* wykonana w Katedrze i Zakładzie Patofizjologii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod promotorską opieką Pani Prof. dr hab. Iwony Inkielewicz-Stępnia, oraz Prof. Marii Jose Santos-Martinez z School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences and School of Medicine Trinity College Dublin.

Głównym celem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie działania nowych funkcjonalizowanych nanocząstek srebra na układ hemostazy w szczególności na płytki krwi, zbadanie ich biokompatybilności na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, na erytrocyty oraz zbadanie ich działania przeciwdrobnoustrojowego.

Rozprawa doktorska opiera się o cztery pierwszo-autorskie prace opublikowane w latach 2019-2022. Są to trzy prace oryginalne (dwie z nich opublikowane w Int. J Nanomed., a trzecia w Front. Pharmacol.) i jedna praca pogładowa (opublikowaną w Curr.Med.Chem). Poza odbitkami prac, rozprawa doktorska zawiera napisane w języku polskim: 6-stronicowe wprowadzenie, jednostronicowy cel pracy, 4-stronicową metodykę pracy, 5-stronicowe umówienie opublikowanych czterech prac, oraz jednostronicowe podsumowanie rozprawy. Rozprawa doktorska zawiera analogiczne części napisane w języku angielskim a zamyka je wykaz cytowanego piśmiennictwa (46 pozycji), który jest wspólny dla obydwu części językowych. W sumie niemal 50 stron tekstu opisującego dzieło doktoratu Pani mgr Justyny Hajtuch jest przejrzyste zorganizowane, bardzo dobrze napisane i świetnie

podsumowuje wyniki tej rozprawy doktorskiej. Jednak, to nie forma – choć świetna- ale treść rozprawy doktorskiej i uzyskane wyniki opisane w trzech pracach oryginalnych wzbudzają podziw recenzenta i należne słowa gratulacji, dla doktorantki i dla promotorów. Jest to jedna z lepszych rozpraw doktorskich, spośród kilku prac doktorskich, które ostatnio miałem okazję recenzować z różnych ośrodków akademickich w Polsce.

Nie mam istotnych uwag krytycznych do przedstawionej pracy, tylko kilka drobnych uwag, ale przede wszystkim chciałbym zadać szereg pytań nasuwających się po lekturze tego nieprzeciętnego dzieła. O poruszonych zagadnieniach chciałbym podyskutować na obronie rozprawy doktorskiej.

Zacznę od kilku drobnych uwag; Doktorantka operuje we wstępie terminem skrzep, myśląc o zakrzepie. Prosiłbym o doprecyzowanie tych terminów, żeby być pewny, że znane doktorantce jest ich rozróżnienie. Mowa też o prostaglandynie I₂. Zakładam, że chodziło o prostacyklinę (PGI₂). Warto wrócić do terminologii prostanoidów, eikozanoidów, prostaglandyn i innych mediatorów lipidowych. Jak jesteśmy przy terminologii, w rozprawie doktorskiej stosowany jest termin glikoproteina GPIIb/IIIa – nazwa tego receptora integrynowego się ostatnio zmieniła i coraz częściej obecnie stosuje się innego terminu wywodzącego się z terminologii integryn- α I**IIb** β 3. Nie jest to może istotny błąd, ale warto wiedzieć o tej nowej terminologii. Kończąc listę uwag z kategorii drobiazgów, w pracy 2, na rycinie 11 zauważyłem literówkę nad wykresem (TBX2 zamiast TXB2), podczas gdy na skali Y, termin jest poprawny.

W kwestiach metodycznych, doktorantka badała poziomy wewnątrzkomórkowego cGMP, jednak, jeżeli dobrze zauważyłem, nie stosowała żadnego inhibitora PDE, co jest wskazane w tego typu pomiarach, bez jego dodatku pomiaru mogą prowadzić do fałszywych wniosków. Z kolei pomiary ROS, były wykonane za pomocą znacznika fluorescencyjnego DCF, który jest dość niespecyficzny i nic precyzyjnego nie można powiedzieć z pomiarów z wykorzystaniem tego znacznika fluorescencyjnego. Chętnie podyskutowałbym z doktorantką na temat metod oznaczeń ROS, wad DCF i zoptymalizowanych sposobów oceny produkcji ROS w układach komórkowych.

W pracy 2, doktorantka stosowała mikrowagę kryształu kwarcu z rozpraszaniem energii (QCM-D), ciekaw jestem zdania doktorantki co do zalet i wad tej techniki badania płytek krwi. Tym bardziej, że doktoranta stosowała te same ilości płytek w QCM-D jak w agregacji płytek, a metoda QCM-D pozwala na badanie adhezji mniejszej liczby płytek do sensora pokrytego fibrynogenem (lub innymi białkami) w przepływie. Dlaczego doktorantka stosowała wysokie liczby płytek, podobnie jak przy agregacji? Czy według doktorantki ta

metoda może wskazywać na takie procesy płytek, których nie można badać, w klasycznego agregacji płytek? Innymi słowy, czy warto tą metodologię raczej wykorzystać do badania adhezji płytek krwi, albo do badania ich dezagregacji, bo oba procesy wymykają się badaniu w klasycznej agregacji? Czy doktorantka zna przykłady takich efektów, które widoczne są w badaniach płytek krwi z wykorzystaniem QCM-D, a nie są widoczne z wykorzystaniem agregacji płytek? Pytam o to, bo w przedstawionej rozprawie doktorskiej, wyniki uzyskane z agregacji płytek krwi i te uzyskane z wykorzystaniem QCM-D w sumie pokrywają się, obie pokazują zahamowanie agregacji płytek krwi. Chyba, że pomimo takiej wysokiej liczby płytek, opisywane efekty można przypisać również zahamowaniu adhezji płytek do sensora mikrowagi kwarcowej?

Dwie prace, z trzech prac oryginalnych stanowiących rozprawę doktorską, dotyczą wpływu funkcjonalizowanych nanocząstek srebra na czynność płytek krwi i temu zagadnieniu chciałbym poświęcić kilka merytorycznych pytań. Te wyniki bowiem wydają mi się najciekawsze i najbardziej intrygujące zarazem, bo działanie przeciwbakteryjne nanocząsteczek srebra jest dobrze znane.

Wysoko oceniam wyniki doktorantki opisujące przeciwpłytkowe działanie funkcjonalizowanych niewielkich kilku nanometrowych rozmiarów nanocząstek srebra, bowiem miałem wrażenie z literatury wcześniejszych prac, że dla nanocząstki srebra i innych metali, opisywano raczej prozakrzepowy profil działania. Swoją drogą, warto by wcześniejszą wiedzę na ten temat na obronie krótko podsumować.

W pracy 2, doktorantka badała nanocząstki pokryte przez trzy związki: zredukowany glutation (GSH), kwas liponowy (LA) i glikol polietylenowy (PEG). Choć wywoływały ewidentny efekt przeciwpłytkowy, to ten efekt przeciwpłytkowy był osiąganym w dość wysokich stężeniach i był podobny dla wszystkich trzech związków pomimo ich odrębności chemicznej. Zwłaszcza, opisany efekt hamujący produkcję TXB_2 , był podobnego stopnia dla wszystkich trzech rodzajów badanych nanocząstek. Jak wytłumaczyć przeciwpłytkowe działanie każdej z tych funkcjonalizowanych nanocząstek? Przez jakie mechanizmy nanocząstki srebra o takich rozmiarach dostają się do płytki krwi? Czy działanie tych różnych funkcjonalizowanych nanocząstek jest wewnątrzkomórkowe czy może zewnątrzkomórkowe? Czy można sądzić, że wywołuje efekt przeciwpłytkowy przez podobne czy raczej przez inne mechanizmy przeciwpłytkowe? Przedstawione wyniki sugerują, że raczej mogą to być efekty podobnej natury, pomimo różnych modyfikacji chemicznych.

W pracy 2 i 4 autorka stosowała nanocząstki srebra różnych rozmiarów (2, 2,5, 3,7, oraz 12 nm). Z czego to wynikało, że średnia wielkość nanocząstek różniła się i wynosiła od

ok 2 nm, do ok 12 nm? Ciekaw jest też, jeżeli znana jest taka wiedza, jaka jest optymalna wielkość funkcjonalizowanych nanocząstek srebra (a może innych metali?) aby nie były cytotoksyczne, wywierały optymalne działanie przeciwplatekcyjne, a nie działanie prozakrzepowe? Jakie zależności istnieją pomiędzy wielkością, własnościami fizykochemicznymi nanocząstek, a ich działaniem przeciwplatekcyjnym? Czy istotny jest też ładunek na powierzchni funkcjonalizowanych nanocząstek srebra?

Szalenie ciekawe dla recenzenta, były również wyniki pracy 4, wykazujące, że nanocząstka połączona z eptyfibatydem, (AgNPs+ eptyfibatyd) silniej hamuje agregację płytek krwi w porównaniu do samego eptyfibatydu. Nie znalazłem jednak nigdzie wytłumaczenia jakie jest dla tej obserwacji wytłumaczenie? Miałem też wrażenie czytając tą pracę, że efekt przeciwplatekcyjny w modelu zakrzepu płytkowego w przepływie pokazany na rycinie 7 ten pracy był podobny? Czy nie jest więc tak, że różnica w sile działania przeciwplatekcyjnego AgNPs+ eptyfibatyd w porównaniu do samego eptyfibatydu mogła być uwidoczniła jedynie w układzie mytych płytek krwi? Czy doktorantka ma dowód na to, że efekt AgNPs+ eptyfibatyd jest specyficzny i zależy od blokowania receptora dla fibrynogenu? Czy podobne skutki uzyskano przyłączając do AgNPs inne leki blokujące integrynę $\alpha IIb\beta 3$? A może efekt przeciwplatekcyjny AgNPs+ eptyfibatyd jest raczej komórkowo niespecyficzny, skoro zahamowanie dotyczyło również aktywacji śródbłonka przez trombinę, i wykazano zahamowanie przez AgNPs+ eptyfibatyd uwalniania prostacykliny, tPA, vWF, cGMP? Czy możliwe jest, że opisany efekt AgNPs+ eptyfibatyd wynika jedynie z lepszego wnikania do płytki nanocząstek srebra opłaszczonych związkami chemicznymi, i fizykochemiczne własności tego związku, mają większy wpływ na te procesy, niż mechanizmy receptorowe? Czy doktorantka ma dowody na to, że połączenie AgNPs+ eptyfibatyd nie blokuje funkcjonalnych grup eptyfibatydu?

Warto dodać, że niekorzystny skutek hamowania uwalniania mediatorów śródbłonkowych przez AgNPs+ eptyfibatyd raczej wyklucza możliwość zastosowania terapeutycznego AgNPs+ eptyfibatyd. Czy istnieją jakieś wyniki własne doktorantki lub dane opisane w literaturze, sugerujące wartość terapeutyczną działania tego typu funkcjonalizowanych NPs połączonych z lekami przeciwplatekcyjnymi *in vivo*? Czy raczej, w świetle potencjalnie niekorzystnego działania AgNPs+ eptyfibatyd na śródbłonek opisanego w tej rozprawie doktorskiej, może wskazywać na to, że tego typu rozwiązania bardziej się nadają do konstrukcji biomateriałów osiągając pożądane często działanie przeciwplatekcyjne, przeciwzakrzepowe, niż jako środki przeciwzakrzepowe do zastosowań terapeutycznych?

Podsumowując, z dużym zainteresowaniem przeczytałem rozprawę doktorską mgr Justyny Hajtuch, a najlepszym na to dowodem jest to, że lektura tej ciekawej pracy wzbudziła wiele pytań. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Hajtuch p.t. *”Ocena wpływu funkcjonalizowanych nanocząstek srebra na układ hemostazy oraz aktywność przeciwbakteryjną w badaniach in vitro i ex vivo”* pod promotorską opieką Pani Prof. dr hab. Iwony Inkielewicz-Stępnia, oraz Pani Prof. Marii Jose Santos-Martinez z naddatkiem spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Rozprawa doktorska spełnia w pełni warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2021 poz. 478 ze zmianami). Wnioskuje więc o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na obszerny zakres rozprawy doktorskiej, wartość merytoryczną uzyskanych wyników doświadczalnych, wysoką jakość przedstawionego dzieła, którą potwierdza dobrze opublikowane prace pierwszo-autorskie doktorantki, wnioskuje o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej. Czynie to bez najmniejszych wątpliwości, jaką zwykle miewam przy wnioskowaniu o wyróżnienie prac doktorskich i wyglądam obrony tej rozprawy doktorskiej i ciekawej dyskusji z doktorantką wokół poruszonych zagadnień.



Prof. dr hab. Stefan Chłopicki