

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Głuszek pt. "Bakteriobójcze i immunomodulujące działanie nanocząsteczek magnetycznych sfunkcjonalizowanych pochodnymi 1,4-dihydropirydyny" wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Roberta Buckiego oraz promotora pomocniczego dr. n. med. Katarzyny Niemirowicz-Laskowskiej z Samodzielnej Pracowni Technik Mikrobiologicznych i Nanobiomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Oporność bakterii na antybiotyki oraz chemioterapeutyki przeciwdrobnoustrojowe jest nieodłączną cechą klinicznego zastosowania leków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, ograniczając ich skuteczność terapeutyczną. W zależności od leku, jego dawki oraz drobnoustroju pojawia się po kilku-, kilkunastu latach od jego pierwszego klinicznego zastosowania. Szerząca się nieskuteczność leków przeciwdrobnoustrojowych, związana głównie z rozwojem oporności jest przypisywana, m.in. ich nadużywaniu i niewłaściwemu stosowaniu, co wobec braku nowych leków opracowywanych przez przemysł farmaceutyczny, stanowi narastający problem kliniczny. Jedną z przyczyn rozwoju oporności drobnoustrojów na leki jest wzmożona aktywność transporterów błonowych ograniczających ich stężenie wewnątrzkomórkowe (np. homolog ludzkiej glikoproteiny P, P-gp, MDR1). Jedną z możliwości ograniczenia wpływu powyższych procesów na skuteczność terapii przeciwdrobnoustrojowej jest zastosowanie nośników leków, np. nanostruktur (metalicznych, organicznych, węglowych nanorurek, grafenu), które umożliwiają niezależne od transporterów błonowych dokońrkowe przemieszczanie leków, zwiększając tym samym ich wewnątrzkomórkowe stężenie i szansę na skuteczność terapeutyczną. Niektóre z nanostruktur, oprócz funkcji transportowych, same w sobie wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową, jak również mogą wpływać na inne procesy związane z przebiegiem zakażenia, np. hamować tworzenie biofilmu. Wobec powyższych przesłanek, temat przedłożonej do oceny pracy doktorskiej mgr Katarzyny Głuszek należy uznać za w pełni aktualny, a mianowicie jest on związany z opracowaniem nanocząstek magnetycznych sfunkcjonalizowanych związkami o aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

We wstępie Doktorantka przedstawiła charakterystykę strukturalną i metody syntezy pochodnych 1,4-dihydropirydyny, ich potencjalne zastosowanie w medycynie, w tym jako związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Następne podrozdziały wstępu zawierają informacje dotyczące przede wszystkim właściwości przeciwbakteryjnych peptydu LL-37, jak również czynników wpływających na skuteczność leczenia przeciwdrobnoustrojowego, takich jak biofilm bakteryjny/grzybiczy oraz zjawisko

„quorum sensing”. Ostatni z podrozdziałów wstępu poświęcono charakterystyce i potencjalnym biologicznym zastosowaniom nanocząstek magnetycznych. Poszczególne podrozdziały wstępu, po dodatkowej redakcji, z pewnością zasługują na publikację jako prace przeglądowe. Informacje przedstawione we wstępie uzasadniają również w pełni zakres badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej opracowanej przez mgr Katarzynę Głuszek.

W oparciu o przesłanki zawarte we wstępie Doktorantka sformułowała następujące cele pracy doktorskiej:

1) zbadanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej pochodnych 1,4-dihydropirydyny w formie wolnej oraz związanej na powierzchni nanocząstek magnetycznych wobec wybranych bakterii i grzybów (szczepów wzorcowych i izolatów klinicznych); 2) ocena właściwości fizykochemicznych nowych nanosystemów zawierających pochodne 1,4-dihydropirydyny; 3) ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej pochodnych 1,4-dihydropirydyny i nanosystemów zawierających te pochodne w obecności płynów ustrojowych oraz 4) ocena właściwości cytotoksycznych i immunomodulujących pochodnych 1,4-dihydropirydyny oraz nanosystemów zawierających te pochodne w układzie doświadczalnym, umożliwiającym ocenę wywoływania apoptozy i hamowania indukowanego LPS wytwarzania cytokin.

Dla zrealizowania postawionych celów Doktorantka dokonała analizy właściwości fizykochemicznych i biologicznych pochodnych 1,4-dihydropirydyny (zsyntetyzowanych przez dr Aive Plotniece w Instytucie Chemii w Rydze), które w trakcie realizacji projektu immobilizowano na powierzchni nanocząstek magnetycznych z powłoką aminosilanową; po uprzedniej funkcjonalizacji aldehydem glutarowym). Do oceny właściwości fizykochemicznych otrzymanych nanostruktur Doktorantka wykorzystała metody analizy spektralnej w podczerwieni, analizy kalorymetrycznej, analizy termograwimetrycznej, analizy potencjału elektrokinetycznego oraz transmisynnej mikroskopii elektronowej. Aktywność przeciwdrobnoustrojową badanych nanostruktur wobec szczepów wzorcowych oraz klinicznych oceniano poprzez oznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost, minimalnego stężenia bójczego oraz minimalnego stężenia bakterio/grzybobójczego (również w płynach ustrojowych). Wykorzystując metody oparte na pomiarze fluorescencji Doktorantka dokonała oceny wbudowywania pochodnych 1,4-dihydropirydyny do błony komórkowej bakterii, wpływu badanych związków na metabolizm bakterii (wykorzystując szczep bakterii *Pseudomonas aeruginosa* Xen 5), powstawanie biofilmu. Biozgodność oceniano poprzez pomiar proliferacji testem MTT, integralności błon testem LDH oraz poprzez pomiar reaktywnych form tlenu, wobec keratynocytów ludzkich oraz pomiarem aktywności hemolitycznej. Ponadto dokonano analizy wydzielania interleukiny 8 metodą ELISA. Zastosowane metody umożliwiły Doktorantce kompleksową ocenę właściwości fizykochemicznych i biologicznych badanych pochodnych 1,4-dihydropirydyny oraz nanostruktur. Sposób zaplanowania badań oraz ich realizacja świadczą o bardzo dobrym merytorycznym

przygotowaniu Doktorantki. Wynikają one również z długotrwałej pracy i doświadczenia w obszarze prowadzonego badania promotora prof. Roberta Buckiego, który jest uznanym ekspertem w dziedzinie. W planowaniu doświadczeń uzasadnionym wydaje się jednakże odniesienie aktywności oraz innych badanych parametrów badanych pochodnych 1,4-dihydropirydyny oraz nanocząstek w stosunku do stosowanych klinicznie leków przeciwdrobnoustrojowych. Należałoby również rozważyć (wobec wartości MIC/MBC/MFC) określenie aktywności hemolitycznej oraz testów MTT i LDH w wyższych stężeniach badanych związków i struktur. Ponieważ Autorka badała nanostruktury o właściwościach magnetycznych, uzasadnione byłoby również określenie wpływu pola magnetycznego na interakcje badanych nanostruktur z komórkami patogenów i określenie w tych warunkach aktywności przeciwdrobnoustrojowej. W opisie metodyki badań, testów statystycznych należy poprawnie nazwać zastosowany test, tj. t-test Studenta.

Po przeprowadzeniu szeregu dobrze zaprojektowanych doświadczeń Doktorantka wykazała m.in., że właściwości fizyko-chemiczne otrzymanych nanocząstek wskazują na ich stabilność oraz możliwość oddziaływania ze ścianą komórkową drobnoustrojów; otrzymane nanostruktury zawierające pochodne 1,4-dihydropirydyny wykazują większą aktywność w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz grzybów w odniesieniu do postaci wolnych badanych pochodnych; aktywność nanostruktur jest porównywalna do działania naturalnych peptydów przeciwbakteryjnych oraz ich syntetycznych analogów. Należy jednakże zauważyć, że części wyników aktywności przeciwdrobnoustrojowej (MIC/MBC/MFC) nie poddano analizie statystycznej, przedstawiono je jedynie w sposób opisowy. W pracy nie zamieszczono również wyników zmiany potencjału elektrokinetycznego pochodnych 1,4-dihydropirydyny w postaci wolnej (lub jest to niejednoznacznie opisana grupa kontrolna).

Dyskusja przeprowadzona przez Autorkę jest prowadzona bardzo dojrzałe. Doktorantka umiejętnie odniosła własne wyniki do dostępnych danych literaturowych. Sposób przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników potwierdza bardzo dobre przygotowanie metodyczne i szeroką wiedzę dotyczącą tematyki prowadzonych badań. Przy przygotowywaniu pracy do druku uzasadnionym wydaje się uwzględnić w dyskusji wartości MIC/MBC/MFC (w odniesieniu do klinicznie stosowanych leków i własnych danych, również dotyczących parametrów toksyczności). Przemyślenia wymaga również dyskusja dotyczące możliwości wykorzystania nanostruktur z pochodnymi 1,4-dihydropirydynowymi do blokowania funkcji kanałów wapniowych oraz terapii celowanej, ze względu na lokalizację miejsca dokowania pochodnych 1,4-dihydropirydynowych w strukturze kanałów wapniowych. Doprecyzowania wymaga również fragment dyskusji dotyczący możliwości blokowania przez nanostruktury transporterów usuwających substraty z komórki (tj. *efflux transporters*), ponieważ nie są one bezpośrednio blokowane przez nanostruktury, a jedynie skutki ich działania są przez nie ograniczane.

Przedłożona do oceny praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, zawiera następujące podrozdziały: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja oraz wnioski, jak również streszczenia w języku polskim i angielskim, bibliografia, spis tabel oraz spis rycin. Praca jest opracowana bardzo starannie, jednakże Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów redakcyjnych, np. tabele 36-38 brak opisu paneli A i B; rycina 18B jest błędnie opisana (powinno być rycina 18 wraz z opisem grupy A w treści); ryciny 45 i 46 nie zawierają opisu symboli CT, 2, 5, 10, w dyskusji kilkakrotnie pojawia się oznaczenie badanego związku jako I-9 zamiast I-6.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła trzy wnioski: 1. Pochodne 1,4-DHP związane na powierzchni magnetycznych nanocząstek wykazują większą aktywność przeciwdrobnoustrojową w porównaniu do ich form wolnych; 2. Nanosystemy zawierające pochodne 1,4-DHP wykazują silniejsze działanie przeciwbakteryjne, aniżeli ludzka katelicydyna LL_37, a siła ich działanie zbliżona jest do efektu przeciwdrobnoustrojowego creageniny CSA-13; 3. Pochodne 1,4-DHP oznaczone symbolami D-19 i K-180B, wykazują zdolność hamowania aktywności prozapalnej lipopolisacharydów. Sformułowane przez Doktorantkę dwa pierwsze wnioski dobrze oddają uzyskane wyniki, wynikają bezpośrednio z analizy wyników uzyskanych w czasie realizacji badań. Natomiast wniosek trzeci wymaga dokładniejszej analizy wyników (tj. uwzględnienie wpływu badanych związków na proliferację komórek, a w końcowym efekcie ich liczbę), ponieważ z ryciny 46 wynika że związki te mogą zmniejszać wydzielanie IL-8 (brak informacji o istotności statystycznej zmian IL-8 indukowanych badanymi związkami w odniesieniu do kontroli), lecz może to mieć związek z mniejszą liczbą komórek (co pokazano na rycinie 44).

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Autorki, która dobrze opanowała niełatwy warsztat badawczy i wykazała dobre merytoryczne przygotowanie. Uważam, że praca stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych i w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim. Dlatego też zwracam się do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Katarzyny Głuszek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik