



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Wydział Lekarski

80-211 Gdańsk

ul. Dębinki 1

tel. (58) 349 14 50

Dr hab. Iwona Inkielewicz-Stępniaak
Katedra i Zakład Chemii Medycznej GUMed
Gdański Uniwersytet Medyczny
e-mail: iinkiel@gumed.edu.pl

Gdańsk, dn.26.02.2015r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

lekarz medycyny Anny RADOMSKIEJ pt.:
Mechanizmy agregacji płytek krwi: rola tkankowego inhibitora metaloproteinaz
przestrzeni pozakomórkowej-4 (TIMP-4) i nanocząstek węgla

Rozprawa doktorska Pani lekarz medycyny Anny Radomskiej zatytułowana: „Mechanizmy agregacji płytek krwi: rola tkankowego inhibitora metaloproteinaz przestrzeni pozakomórkowej-4 (TIMP-4) i nanocząstek węgla” została przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Jarosława Leszczyna w EMC Health Care w Dublinie (Irlandii). Natomiast badania wykonano w prestiżowych ośrodkach naukowych: University of Alberta, Edmonton, Canada; The Brown Foundation Institute of Molecular Medicine for the Prevention of Human Diseases, Houston, USA; Ohio University, Athens, USA oraz School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences University of Dublin Trinity College. Kierownikiem jednostek w Edmonton, Houston i Dublinie był prof. dr hab. n. med. Marek Radomski, natomiast kierownikiem jednostki w Athens - prof. dr Tadeusz Maliński.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska składa się z czterech (dwóch eksperymentalnych i dwóch poglądowych) tematycznie spójnych artykułów oraz opisu pracy i streszczenia przygotowanych w języku polskim i angielskim. Na końcu rozprawy Doktorantka umieściła deklaracje współautorów. Trzy prace będące podstawą recenzowanej rozprawy opublikowano w prestiżowych czasopismach z listy filadelfijskiej, tj. Br. J. Pharmacol (IF=4, 957), jedna praca została przyjęta do druku, również w czasopiśmie z listy filadelfijskiej: Adv. Clin. Exp. Med. (IF=1,095). Przedstawione prace są współautorskie, ale

w trzech z nich Doktorantka jest pierwszym Autorem a w jednej również Autorem korespondencyjnym. Załączone deklaracje współautorów wskazują na wiodącą rolę Doktorantki w koncepcji, wykonawstwie i redakcji wszystkich prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Na szczególne uznanie zasługuje zarówno imponujący łączny wskaźnik oddziaływania (IF), który wynosi: 15,966 oraz liczba cytowań: 941 (Google Scholar, 20.12.2015), która zarazem dowodzi, iż prace spotkały się z ogromnym zainteresowaniem i uznaniem w środowisku naukowym.

W opisie pracy Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę dysertacji, uzasadnia podjęcie badań i cel pracy, wykorzystywaną w badaniach metodykę, uzyskane wyniki, dyskusję, a także perspektywy nowych, dalszych badań. Opis kończy spis 36 dobranych tematycznie, aktualnych pozycji literaturowych. Następnie załączone są artykuły stanowiące rozprawę dokorską. Niewątpliwie ułatwia to czytającemu szybką ocenę całości dysertacji jak i jej wybranych fragmentów. Na szczególne uznanie zasługuje bardzo staranne opracowanie części graficznej rozprawy oraz bardzo wysoka jakość zdjęć płytek krwi uzyskanych przy wykorzystaniu szerokiej gamy technik mikroskopowych.

Wybór tematu dysertacji recenzent uważa za niezwykle nowatorski i istotny z punktu widzenia farmakologii płytki krwi oraz nanofarmakologii. Doktorantka podjęła ambitną próbę wyjaśnienia skomplikowanej sieci zależności pomiędzy płytkami krwi a metaloproteinazami oraz płytkami krwi i nanocząstkami węgla stawiając, jako cel swoich badań naukowych:

1. Identyfikację ekspresji i zbadanie farmakologicznych efektów płytkowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMPs)
2. Zbadanie wpływu nanocząstek węgla na czynności płytek krwi

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że to właśnie Pani lekarz medycyny Anna Radomska po raz pierwszy w literaturze opisała mechanizmy regulujące proagregacyjne działanie metaloproteinazy (MMP-2) na płytki krwi (artykuł 1). Doktorantka dowiodła również, że spośród czterech TIMP jedynie TIMP-4 występuje w płytkach krwi w ilościach wystarczających do regulacji agregacji płytek. Analizując obrazy uzyskane z mikroskopu elektronowego z użyciem immunożłota zauważyła, że w płytkach TIMP-4 kolokalizował z MMP-2 ale nie z MMP-9. Zaobserwowała również, że hamujące działanie TIMP-4 na płytki krwi może być potęgowane przez inne inhibitory agregacji, np. tlenek azotu. Niezwykle ważne w opinii recenzenta jest udokumentowanie przez Doktorantkę, że TIMP-4 poza hamowaniem agregacji płytek krwi, wywołanej klasycznymi czynnikami agregacyjnymi,

wykazuje również zdolność hamowania płytek krwi indukowanej komórkami nowotworowymi. Doktorantka wyciągnęła słuszny wniosek, iż TIMP-4 może być traktowany, jako jeden z czynników regulujących krwiopochodne przerzutowanie nowotworów.

W toku dalszych badań Pani lekarz medycyny Anna Radomska odkryła, że rozpuszczalne nanocząstki węgla indukują agregację płytek krwi i wywołują zakrzepicę naczyniową. Udowodniła, że występujące w środowisku, jak również technologicznie produkowane nanostruktury mogą wpływać na funkcje płytek krwi i rozwój chorób naczyniowo-sercowych. Odkrycie to zapoczątkowało nowy kierunek badań, których celem stała się ocena biokompatybilności nanocząstek używanych w medycynie z krwią.

Dwa pozostałe artykuły składające się na ocenianą rozprawę doktorską mają charakter poglądowy. Rozwój nanotechnologii poza szeregiem korzyści i niekwestionowanym wkładem w rozwój współczesnej medycyny niesie ze sobą zagrożenia związane z potencjalnym niekorzystnym działaniem nanomateriałów i nanocząstek na organizm człowieka. Często te same unikalne właściwości nanocząstek, które decydują o ich wykorzystaniu w diagnostyce i terapii (niewielki rozmiar, duża powierzchnia w stosunku do rozmiaru, łatwość pokonywania błon komórkowych czy też barier ustrojowych) wpływają zarazem na ich toksyczność. Na te właśnie zagadnienia, Doktorantka zwróciła uwagę w kolejnym (3) artykule, którego opublikowanie w 2007 roku wprowadziło termin „nanofarmakologii” zdefiniowanej jako dziedzina wiedzy zajmująca się farmakologicznym działaniem nanocząstek.

Z kolei następny (4) artykuł wskazał możliwe kierunki rozwoju nanomedycyny. Doktorantka zwraca szczególną uwagę na zagadnienia związane z biokompatybilnością nanomateriałów wykorzystywanych w medycynie. Niezwykle interesujące są zebrane i przedstawione przez Doktorantkę informacje z zakresu projektowania i wytwarzania nanoteranostycznych materiałów ukierunkowanych na rozwój medycyny i terapii personalizowanej.

Pragnę podkreślić, iż Doktorantka zrealizowała wszystkie cele badawcze, a uzyskane wyniki mają ogromne znaczenie w poznaniu regulacji płytki krwi przez endogenne mediatory (MMPs i TIMPs) jak i nanocząstki węgla. Badania te stanowią całkowitą nowość naukową i wpisują się na trwałe w piśmiennictwo światowe z zakresu farmakologii, jak również nanofarmakologii i nanomedycyny.

W opinii Recenzenta na szczególne wyróżnienie zasługuje umiejętne połączenie przez Doktorantkę eksperymentów *in vitro* i *in vivo* w celu określenia wpływu nanocząstek węgla

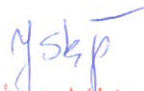
na płytki krwi. Badania *in vitro* Pani lekarz medycyny Anna Radomska przeprowadziła na krwi pobieranej od zdrowych ochotników, którzy przez 2 tygodnie poprzedzające eksperymenty nie przyjmowali żadnych leków, wpływających na czynność płytek krwi. Z pobranych próbek przygotowała osocze bogatopłytkowe oraz myte płytki (washed platelets). Następnie, celem potwierdzenia wyników uzyskanych w doświadczeniach *in vitro* Doktorantka przeprowadziła badania *in vivo* na szczurach Wistar-Kyoto w modelu zakrzepicy w tętnicy szyjnej wywołanej działaniem chlorkiem żelaza. Na uwagę zasługuje szeroki zakres metod i nowoczesnych technik analitycznych wykorzystywanych przez Doktorantkę w eksperymentach, takich jak: metoda agregacji świetlnej, western blotting, zymografia i odwrotna zymografia, cytometria przepływowa, mikroskopowych: kontrastowo-fazowych, immunofluorescencyjnych, transmisyjno elektronowych i immunoelektronowych. Metodyka badań charakteryzuje godną pochwały skrupulatność a wykonanie eksperymentów – rzetelność warsztatu badawczego. Z kolei przedstawione przez Doktorantkę do oceny artykuły wskazujące afiliację współautorów dowodzą umiejętności pracy w zespołach międzynarodowych oraz ze specjalistami różnych dziedzin nauki.

W opinii Recenzenta niezwykle ciekawe są badania, które Doktorantka wskazuje, jako dalszy kierunek swojej pracy naukowej. Wykorzystując zdobyte doświadczenie i wiedzę Pani lekarz medycyny Anna Radomska chciałaby skoncentrować się na opracowaniu i zoptymalizowaniu nanocząstek wielofunkcyjnych, które można by stosować w diagnostyce i terapii chorób związanych z aktywacją płytek krwi. W ramach badań wstępnych prowadzonych we współpracy z Trinity College już dowiodła, że nanocząstki oparte o strukturę laktonu mogą być hemokompatybilne.

Biorąc pod uwagę przedstawione dane dotyczące formalnej i merytorycznej oceny pracy doktorskiej Pani lekarz medycyny Anny Radomskiej z ogromną przyjemnością stwierdzam, że rozprawa stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe o dużym znaczeniu poznawczym i zawiera niekwestionowany element nowości naukowej. Autorka wykazała się ogromną wiedzą w zakresie realizowanego tematu, umiejętnością prawidłowego wykorzystania nowoczesnych metod badawczych, ogromną konsekwencją w realizacji założonych celów, a także oryginalnością w formułowaniu i rozwiązywaniu stawianych sobie celów, prawidłowością formułowania jasnych i logicznych wniosków. W mojej ocenie Doktorantka dowiodła umiejętności samodzielnego zaplanowania i przeprowadzenia pracy naukowej.

W świetle przedstawionych wyżej danych stwierdzam, że recenzowana praca odpowiada warunkom ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych dla rozprawy na stopień doktora, i uznaję, że **Pani lekarz medycyny Anna Radomska może być dopuszczona do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Ponadto ze względu na wysoki poziom merytoryczny ocenianej rozprawy oraz fakt opublikowania wyników w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku oddziaływania (Impact Factor) **wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie o wyróżnienie nagrodą rozprawy doktorskiej.**


dr hab. Iwona Inkielwicz-Stopniak