

Prof. dr hab. inż. Dorota G. Pijanowska
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcz PAN
ul. Księcia Trojdena 4, 02-109 Warszawa
E-mail: dpijanowska@ibib.waw.pl

Warszawa 28.09.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra inż. Przemysława Sareło

Podstawą sporządzenia recenzji rozprawy doktorskiej w dziedzinie nauk inżyniersko technicznych w dyscyplinie inżynieria biomedyczna jest powołanie na recenzenta przez Radę Dyscypliny Naukowej Inżynieria Biomedyczna Politechniki Wrocławskiej uchwałą nr 181/31/RDND04/2021-2024 z dnia 4 lipca 2023 roku.

Jednostka prowadząca postępowanie: Politechnika Wroclawska

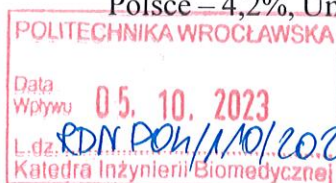
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Immunofunkcjonalizacja powierzchni stentów kardiowaskularnych poprzez wprowadzenie interleukin przeciwzapalnych*

Promotor: dr hab. Marta Kopaczyńska, prof. uczelni

Mgr inż. Przemysław Sareło ukończył studia magisterskie na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej na kierunku inżynieria biomedyczna w roku 2018 (praca magisterska pt.: *Ocena charakterystyk amplitudowych i fazowych sygnału pulsu rogówki u pacjentów z jaskrą po interwencji chirurgicznej*). W tym samym roku mgr inż. Przemysław Sareło został uczestnikiem interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej oraz rozpoczął studia na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich. Badania związane z rozprawą doktorską były realizowane w Katedrze Inżynierii Biomedycznej Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem dr hab. Marty Kopaczyńskiej, profesora uczelni - promotora rozprawy.

TEMATYKA ROZPRAWY

Tematyka rozprawy doktorskiej, w jest związana z interdyscyplinarnym z obszarem nauki – inżynierią biomedyczną. Dotyczy bowiem, najogólniej ujmując, badań związanych z immunofunkcjonalizacją stentów kardiowaskularnych stosowanych w leczeniu pacjentów z zaawansowaną miażdżycą naczyń krwionośnych, której skutkiem są niewydolność sercowo-krążeniowa, czy też choroba wieńcowa. Dane epidemiczne podkreślają ważność badań podjętych przez Doktoranta, w skrócie ujmując choroby te dotyczą stosunkowo duży odsetek populacji, w Polsce – 4,2%, Unii Europejskiej – 3,5%, w obu przypadkach wzrost o 0,2% w ciągu 5 lat (Raport



NFZ 2020). Uznaje się, że w Polsce jest najwięcej hospitalizacji z tego powodu ze wszystkich krajów OECD. W przypadku leczenia metodą przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki wieńcowej, inaczej zwanej przezskórną interwencją wieńcową (ang. *percutaneous coronary intervention*, PCI) z wykorzystaniem stentów, nowym obszarem są badania nad warstwami pokrywającymi konstrukcję metalową, które mają odpowiednie właściwości fizyko-chemiczne i biologiczne, zapewniające odpowiednie/selektywne oddziaływania z wybranymi rodzajami komórek.

Podsumowując można stwierdzić, że recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w aktualny interdyscyplinarny nurt badań nad rozwojem metod i narzędzi biomedycznych, w szczególności związanych z rozwojem implantów stosowanych w angioplastyce.

STRUKTURA I ZAWARTOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedłożona przez Doktorantkę rozprawa doktorska jest publikacją zwartą, zawiera 158 stron, obejmujące 10 numerowanych rozdziałów, z których 9 stanowi integralną część merytoryczną. W rozprawie są zawarte streszczenie w języku polskim i wymagane streszczenie w języku angielskim, oraz 49 ilustracji/rysunków wraz z ich spisem, wykazem skrótów i bibliografią. Jak wspomniano rozprawa jest w postaci tradycyjnej monografii, którą można podzielić na trzy części: Wstępu (rozdział 1) – wprowadzającego w tematykę, popartego przeglądem literatury i doświadczałnej, który kończy się rozdziałami nazwanymi *Motywacja*, *Cel pracy*, *Abstrakt graficzny* i *Tezy pracy* (rozdziały 2-5). W drugiej części przedstawiono *Materiały i metody* (rozdział 6), *Wyniki i dyskusję* (rozdział 7), którą zakończono rozdziałami 8 i 9, zatytułowanymi *Dowiedzenie tez pracy* i *Oryginalny wkład w tematykę pracy* oraz *Bibliografią*. Uzupełnienie stanowi informacja o dorobku naukowym Doktoranta (rozdział 10). Część pierwsza obejmuje wprowadzenie zawierające rozdziały zawierające opis: (1) patomechanizmu miażdżycy, (2) strategii terapeutycznych stosowanych w miażdżycy wykorzystujących stenty, (3) ocenę wpływu na poziomie molekularnym i komórkowym oraz (4) procesów chemicznych proponowanych powłok.

Na podstawie przeglądu literatury, sformułowany problem badawczy, postawiono cel badań i określono tezy rozprawy. Wyniki badań są bogato i dobrze zilustrowane, zaopatrzone w bardzo treściwe podpisy, które można uznać za samoobjaśniające się (podejście, które bardzo lubię).

Na bibliografię składa się 175 pozycji literaturowych, w tym 80 pochodzi z najnowszego pięcioletniego okresu (tj. opublikowanych od roku 2018). Przedstawiony przegląd literatury został dokonany na podstawie właściwie dobranych pozycji piśmiennictwa dotyczącego przedmiotu rozprawy. Elementy pracy są logicznie powiązane, a ich zamieszczenie w tekście pracy jest uzasadnione. Z pewnością w niektórych w niektórych częściach rozprawy zakres cytowanej literatury można byłoby rozszerzyć.

Podsumowując, rozprawa jest dobrze skomponowana, przejrzysta i napisana dobrym językiem. Bardzo ciekawym i dobrym zabiegiem edytorskim jest abstrakt graficzny, raczej rzadko stosowanych w rozprawach doktorskich, a godny uwagi i polecenia.

Jak wspomniano wyżej, cel badań został wyraźnie określony w rozdziale 3. W rozprawie zostały sformułowane 4 tezy, odnoszące się do zagadnień związanych z (1) doбором materiału o odpowiednich właściwościach fizyko-chemicznych i biologicznych i technologicznych do

zastosowań jako powłoka bazowa do pokrycia stentu kardiovaskularnego, (2) wiązaniem cząsteczek wybranych interleukin przeciwzapalnych na powierzchni powłoki bazowej, (3) procedura wiązania interleukin do powłoki bazowej nie wpłynie na aktywność biologiczną oraz (4) uzyskaniem powłok o pożądanych cechach w odniesieniu do hamowania restenozy.

Angioplastyka może złagodzić objawy zablokowania tętnic, takie jak ból w klatce piersiowej i duszność. Jest również często stosowana podczas zawału serca, aby szybko otworzyć zablokowaną tętnicę i zmniejszyć stopień uszkodzenia serca. Początkowo stenty spełniały jedynie rolę mechanicznego rozszerzenia naczyń, co związane było z poszukiwaniem odpowiednich materiałów oraz projektowaniem kształtu i struktury przestrzennej stentów, np. w postaci siatki o odpowiedniej geometrii. W kolejnych rozwiązaniach dodawano kolejne funkcje, związane są z wprowadzeniem aktywności biologicznej, np. stenty uwalniające leki, zapobiegające gromadzeniu się płytki miażdżycowej i ponownemu zwężeniu naczynia krwionośnego, przeciwzapalne i przeciwzakrzepowe. W najnowszej generacji stentów wprowadza się powłoki wspomagające zasiedlanie komórek śródbłonka.

Badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy są związane z tym ostatnim podejściem polegającym na wprowadzeniu pokryć stentów wspomagających re-endotelizację poprzez indukcję migracji, adhezji i proliferacji komórek endotelium bądź wytworzeniu warunków sprzyjających zasiedleniu przez nie materiału stentu.

W części doświadczalnej, omówiono stosowaną metodykę badań, włączając w to również opis sposobu wytwarzania podłoży pDA i CH oraz systematyczne podejście do sposobu wiązania wybranych interleukin IL-4 i IL-10 (bardzo klarowne schematy reakcji), jak również prowadzenia w warunkach stacjonarnych poszczególnych hodowli komórek linii HUVEC, makrofagów THP-1 oraz badań morfologii komórek i ekspresji wybranych markerów komórkowych. W przypadku HUVEC, badane są interleukiny prozapalne MCP-1 i IL-8, których oznaczenia dokonano po 24, 48 i 72 godzinach hodowli na podłożach pDA, pDA_IL-4, pDA_IL-10. Natomiast w przypadku THP-1 badane są MHC II oraz CD163 i CD209, określających fenotyp odpowiednio subpopulacji M1 oraz M2.

Ciekawą częścią badań było eksperymentalne modelowanie stanu zapalnego polegają na badaniu oddziaływania komórek śródbłonka z niezwiązanymi z powłoką wybranymi cytokinami prozapalnymi TNF- α , IL-1 β (6-godzinna inkubacja) i następczym oddziaływaniem interleukiny przeciwzapalnej IL-10 (inkubacja przez 24, 48 i 72 godziny).

Doktorant uzyskał interesujące wyniki badań własnych, wymienię kilka wybranych, moim zdaniem najistotniejszych:

1. Uzyskano przedłużony czas uwalniania interleukin (IL-4 i IL-10) z opracowanych powłok (pDA_CH_IL4 i pDA_CH_IL10), określono na około 10 dni.
2. Zaobserwowano, że liczba komórek THP-1 na powierzchni NC jest znacznie większa niż na podłożach pokrytych opracowanymi powłokami. Można zatem stwierdzić, że obecność powłoki pDA, pDA, pDA_IL-4 i pDA_IL-10 zmniejsza warunki pro-adhezyjne komórek THP-1.
3. Wyniki wskazują na selektywny wzrost komórek HUVEC na zaproponowanych podłożach, które sprzyjają ich proliferacji i ograniczeniu wzrost/adhezji makrofagów.

4. Na podstawie porównania opracowanych powłok pDA, pDA_CH, pDA_CH_IL-4 i pDA_CH_IL-10 z warstwą lipopolisacharydu (LPS), nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic opisujących rekrutację monocytów. Niewielkie zwiększenie adhezji komórek linii THP-1 do HUVEC na powłoce pDA_IL-10, co pozostaje w zgodzie z zmniejszonym wydzielaniem MCP-1 na tym podłożu.
5. W przypadku pierwszego etapu funkcjonalizacji – powłoka pDA, nie zaobserwowano aktywacji komórek linii THP-1 o czym świadczy brak ekspresji MCH II i CD 209.
6. Zaobserwowano zwiększone wydzielanie interleukiny IL-8 przez komórki linii HUVEC hodowane na podłożach pDA, pDA_IL-4, pDA_IL-10, w stosunku do negatywnej kontroli (NC). Poziom IL-8 stabilizuje się. Jednocześnie zaobserwowano początkowy wzrost stężenia MCP-1, które w kolejnych dniach eksperymentu maleje (nawet poniżej stężenia MCP-1 uzyskanego w przypadku NC w 3 dniu hodowli).

Zastrzeżeń nie budzą również wnioski sformułowane na podstawie uzyskanych wyników, choć z pewnością należy się wyjaśnienie uwagi 1 zapisanej w sekcji UWAGI KRYTYCZNE/PYTANIA. Wszystkie sformułowane przez Doktoranta tezy zawarte w rozprawie znalazły swoje odzwierciedlenie we wnioskach. Chciałam również podkreślić zawartą w rozprawie dyskusję wyników badań, która jest jednym z ważniejszych kryteriów prac naukowych, która ma formę rozmytą i którą warto byłoby dobrze podsumować i wyeksponować. Do analizy wyników zostały wykorzystane właściwe metody i testy statystyczne.

Nadrzędny cel badań został osiągnięty a oryginalną część rozprawy stanowi opracowana metoda immunofunkcjonalizacji interlekinami stentów pokrytych warstwą podłożową z polidopaminy i chitozanu.

Rozprawa jest bardzo i starannie zredagowana, dobrze zrównoważone proporcje opisu metodyki do wyników badań, jednakże pojawiają się w niej pewne drobne nieścisłości jak również niejasności, które skłaniają do pewnych pytań, a ja przedstawię je w uwagach krytycznych i edytorskich.

UWAGI KRYTYCZNE/PYTANIA

1. Pierwsza uwaga i zarazem pytanie dotyczy wyników zaprezentowanych na Rys. 35 i 36, związanych z oznaczeniami uwalnianych cytokin prozapalnych MCP-1 i IL-8 w odniesieniu do kontroli negatywnej.
 - a. Porównując słupki błędów po stronie lewej i prawej Rys. 35, należy zastanowić dlaczego są one tak znacząco różne, jeśli powstały z wykorzystaniem tych samych danych.
 - b. Co jest przyczyną tak dużych różnic na Rys 35 i 36, szczególnie w odniesieniu do podłoża pDA w 72. godzinie hodowli komórek HUVEC na tym podłożu.
2. Jaki jest powód wyboru materiałów podłożowych opartych na dopaminie i chitozanie?
3. Kolejne pytanie jest związane z wynikami badań dotyczących morfologii komórek śródbłonna HUVEC po 6-godzinnej inkubacji z wybranymi cytokinami prozapalnymi (TNF- α , IL-1 β) z następnie przeprowadzoną inkubacją z interleukiną IL-10 (str. 122, Rys. 42), gdzie stwierdzono, że nieznaczące różnice można zaobserwować w przypadku czynnika von Willebranda (vWF) – prosba o szersze wyjaśnienie tych różnic i ewentualnych ich skutków.

4. Wskazane byłaby dyskusja uzyskanych wyników badań w odniesieniu do wyników uzyskanych przez innych badaczy, wskazanie zalet/przewag i wad opracowanych pokryć stentów.
5. Nasuwają się również komentarze rozszerzająco traktujące tematykę rozprawy:
 - a. W przypadku stentów, jednym z istotnych czynników działających na nie i na komórki podczas przepływu krwi są naprężenia ścinające, zatem wskazane byłyby badania wpływu naprężeń ścinających na naniesione immunofunkcjonalne powłoki i komórki śródbłonna zasiedlone na ich powierzchni oraz ocena porównawcza *in vitro* w warunkach stacjonarnych i przepływowych. Są to może wskazania na dalsze badania związane z tematyką rozprawy, niemniej jednak poprosiłabym o komentarz na temat.
 - b. Innym zagadnieniem jest problem sterylizacji stentów, jakie metody sterylizacji mogłyby być stosowane w przypadku stentów z opracowanymi powłokami?
 - c. Ze względu na potencjał rozwojowy podjętej przez Doktoranta tematyki, związany z możliwością wykorzystania wyników badań i ich kontynuacją, nasuwa się pytanie o plany patentowe dotyczące zaproponowanego rozwiązania.

Uwagi redakcyjne

Rozprawa jest napisana w sposób jasny, dobrze zorganizowany oraz z klarownie przedstawionymi i omówionymi wynikami badań. Jednak w rozprawie pojawiają się drobne niedociągnięcia językowe, poniżej wymieniam niektóre z błędów/pomyłek stylistycznych, np.:

Str. 3: W spisie treści brakuje numeracji rozdziałów, która jest zamieszczona w dalszej części rozprawy.

Str. 24: „ECs znajdują się na styku krwi z otaczającymi tkankami” lepiej użyć: komórki śródbłonna stanowią wewnętrzną warstwę tętnicy wieńcowej, która jest w bezpośrednim kontakcie z tkanką łączną w postaci krwi.

Str. 43 i inne: „materiał bazowy” raczej lepiej: materiał podłożowy albo materiał podstawowy

Str. 69: „... właściwe przeprowadzenie powyżej scharakteryzowanych reakcji sieciowania może z powodzeniem zostać wykorzystane w procesie immunofunkcjonalizacji ...”, lepiej: może z powodzeniem **wykorzystać** w procesie ...

Str. 73: „Określenie właściwości biologicznych powłoki w warunkach *in vitro* pod kątem patomechanizmu miażdżycy i restenozy w stencie zostanie przeprowadzone wskutek oceny żywotności, proliferacji ...”, lepiej: Określenie właściwości biologicznych powłoki w warunkach *in vitro* **w związku z** patomechanizmem miażdżycy i restenozy w stencie zostanie przeprowadzone **na podstawie** oceny żywotności, proliferacji ...

Str. 85, 86, 101 i inne: „Celem oceny żywotności ...”, powinno być: W celu oceny żywotności ... „Celem” jest formą urzędową, choć również w tekstach innych, np. **celem** pracy było/jest ..., natomiast „w celu” bardziej odpowiada sformułowaniu potrzeb, wymagań itp.

Str. 86: „Schematycznie zaplanowany eksperyment przedstawiono ...”, powinno być: Schemat zaplanowanego eksperymentu przedstawiono ...

Rys. 25 i 26: pomyłkowy zapis jednostek na osi y, powinno być: pg mL^{-1}

Rys. 30 i 31 i inne: „powłoką na bazie” lepiej zastąpić:

Rys. 44: Morfologia HUVEC po 72 godzinach zamiast po 24 h.

Podsumowując, recenzowana rozprawa jest opracowaniem, świadczącym o dużym rzetelnym zaangażowaniu Doktoranta w wykonanie czasochłonnych badań eksperymentalnych, jak również wiedzy pozwalającej na wejście, w dużej mierze, w nowy obszar badawczy związany z eksperymentami biologicznymi. Należy również podkreślić, iż Doktorant podejmując badania laboratoryjne musiał zapoznać się z nowymi metodami badawczymi stosowanymi w naukach interdyscyplinarnych. Zatem Doktorant wykazał się umiejętnościami badawczymi związanymi z wykorzystaniem i łączeniem wiedzy z różnych obszarów (biologii, inżynierii materiałowej i innych), aby uzyskać wynik w obszarze inżynierii biomedycznej oraz umiejętnościami umożliwiającymi właściwe zaplanowanie eksperymentu i przygotowanie metod nanoszenie powłok stentów i ich funkcjonalizacji.

Istotnymi wynikami przedstawionymi w rozprawie są: (1) opracowanie metody modyfikacji powierzchni stentów kobaltowo-chromowych z wykorzystaniem biomateriałów, takich jak polidopamina i chitozan, pozwalającej na otrzymanie biozgodnej powłoki podstawowej i (2) dokonanie oceny *in vitro* w warunkach stacjonarnych wpływu opracowanych powłok i potwierdzenie aktywności biologicznej opracowanych powłok stentów względem wybranych linii komórkowych, w szczególności immunofunkcjonalizacja powierzchni powłok stentów z wykorzystaniem interleukin przeciwzapalnych IL-4 i IL-10, (3) makrofagi w tych warunkach wykazują nadekspresję markera CD209, charakterystycznego dla aktywowanej subpopulacji M2, (4) zapewnia warunki do wzrostu i proliferacji komórek śródbłonna, (ii) powoduje obniżenie adhezji monocytów/makrofagów na powierzchni powłok i (iii) obniżenie adhezji monocytów do komórek śródbłonna hodowanych na opracowanych podłożach.

DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTA

Dodatkowo wspomnę o dorobku publikacyjnym Doktoranta, który jest bardzo dobry i obejmuje:

- 5 artykułów opublikowanych w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR), w tym 2 artykuły związane z rozprawą doktorską opublikowane w: *Biocybernetics and Biomedical Engineering* (1 artykuł z roku 2023 – IF 6,4), *Materials* (1 art. z roku 2020 – IF 3,623) oraz 3 artykuły niezwiązane z rozprawą opublikowane w *Int. Journal of Molecular Science* (2 art. z roku 2019 – IF 4,556 i 2021 – IF 6,208) i w czasopiśmie *Exp Eye Res* (1 artykuł z roku 2022, IF 3,77)
- 5 wystąpień na konferencjach, np. PCBBE w roku 2019 i 2023, Kongresie Europejskiego Stowarzyszenia Medycyny Predykcijnej i Personalizowanej w roku 2021 i Wrocławskich Spotkaniach Ambitnych Bioinżynierów WASABI w roku 2018.
- udział w projektach badawczych: NCBR POIR i Lider oraz NCN Opus, jako wykonawca w pierwszym projekcie i stypendysta w dwóch pozostałych oraz uzyskanie stypendium Rektora Politechniki Wrocławskiej przez kolejnych 5 lat od roku akademickiego 2018/2019 oraz zwiększenia stypendium z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych przez kolejne 4 lata od roku akademickiego 2019/2020.

WNIOSEK KOŃCOWY

Rozprawa doktorska mgr. inż. Przemysława Sareło jest z obszaru badań interdyscyplinarnych związanych z inżynierią biomedyczną, wyniki badań mają duże znaczenie dla rozwoju metod

terapeutycznych związanych z angioplastyką, w których wykorzystuje się stenty kardiowaskularne, stosowane w leczeniu pacjentów z zaawansowaną miażdżycą naczyń krwionośnych.

Przedstawiona rozprawa doktorska mgr inż. Przemysława Sareło spełnia warunki stawiane w Ustawie *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018 r. z późn. zm. i wnoszę o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie inżynieria biomedyczna.

Biorąc pod uwagę zakres badań przeprowadzonych przez mgr inż. Przemysława Sareło oraz dodatkowo dorobek publikacyjny Doktoranta, którego główną częścią związaną z rozprawą doktorską są 2 artykuły z pierwszym autorstwem opublikowane w czasopismach recenzowanych, prezentujące wyniki badań bezpośrednio związane z rozprawą doktorską, indeksowanych w bazie JCR, o wysokich współczynnikach wpływu, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Sareło' or similar, written in a cursive style.