

Prof. dr hab. n. med. Aleksandra Kawczyk-Krupka
Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych,
Angiologii, Medycyny Fizykalnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Batorego 15, 41-902 Bytom
tel/fax: +48 32 7861630

Bytom, 03.08.2023r

**Recenzja pracy doktorskiej na stopień doktora w Dyscyplinie Inżynieria Biomedyczna
na Politechnice Wrocławskiej mgr inż. Przemysława Sarelo
pt. „Immunofunkcjonalizacja powierzchni stentów kardiovaskularnych poprzez
wprowadzenie interleukin przeciwzapalnych”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska **mgr inż. Przemysław Sarelo** została
wykonana pod kierunkiem opiekuna naukowego:
dr hab. Marty Kopaczyńskiej, prof. uczelni
z Katedry Inżynierii Biomedycznej
Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej

Choroba niedokrwienna serca wciąż stanowi jedną z najczęstszych przyczyn zgonów w Europie, a pacjenci po przebytych zabiegach angioplastyki z implantacją stentu do tętnicy wieńcowej stanowią dużą i wciąż rosnącą grupę. Wiadomo, że miażdżycę leżącą u podstawy choroby niedokrwiennej traktowana jest jako przewlekły proces zapalno-immunologiczny, w którym dochodzi do zaburzenia relacji pomiędzy ścianą naczyń, komórkami zapalnymi oraz chemokinami, stąd podjęty przez Doktoranta temat pracy dotyczący immunofunkcjonalizacji powierzchni stentów kardiovaskularnych poprzez wprowadzenie interleukin przeciwzapalnych jest niezwykle interesujący i prezentuje nowatorskie i aktualne podejście do współczesnych problemów medycznych.

Przedstawiona rozprawa doktorska została przedstawiona na 158 stronach 10 rozdziałach, obejmujących spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wstęp, motywację, cel pracy, graficzny abstrakt, tezę pracy, materiał i metody, wyniki i dyskusję, dowiedzenie tezy pracy, wkład Autora w tematykę pracy, dorobek naukowy Autora, spis ilustracji i bibliografię.

W rozprawie doktorskiej **mgr inż. Przemysław Sarelo podjął temat** modyfikacji powierzchni powszechnie stosowanych stentów, która wykaże aktywność biologiczną wobec komórek naczyniowych, przez co pozwoli zredukować prawdopodobieństwo wystąpienia restenozy.

Autor skoncentrował badania wokół interleukin, będących cząsteczkami naturalnie



syntezowanymi w organizmie i charakteryzującymi się plejotropowym działaniem, wywołującym korzystne reakcje komórek naczyniowych, ograniczając progresję zmian miażdżycowych oraz zmniejszając prawdopodobieństwo rozwoju restenozy w stencie.

We wstępie Doktorant przedstawił procedurę otrzymywania powłok na bazie polidopaminy i polidopaminy wzbogaconej chitozanem. Immobilizację wybranych interleukin w obrębie materiałów bazowych Autor przeprowadził w reakcji bezpośredniej lub za pośrednictwem techniki sieciowania, a właściwości fizyko-chemiczne otrzymanych powłok scharakteryzował z wykorzystaniem spektroskopii osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni z transformatą Fouriera, mikroskopii sił atomowych i testów immunoenzymatycznych. We Wstępie Autor opisuje patomechanizm miażdżycy, uzupełniając tekst wysokiej jakości autorskimi schematami i rycinami, obrazującymi budowę ściany naczynia, proces interakcji międzykomórkowych oraz mechanizm skurczu i rozkurczu komórek mięśni gładkich w odpowiedzi na substancje wazoaktywne. W dalszej części wstępu Doktorant opisuje kluczową rolę cząsteczek cholesterolu LDL odgrywających zasadniczą rolę w procesie miażdżycy, co obrazuje w kolorowych autorskich rycinach.

Spośród strategii terapeutycznych stosowanych w miażdżycy, które opisuje Doktorant w kolejnych podrozdziałach Wstępu, wymienia intensywną farmakoterapię, przezskórną interwencję wieńcową (PCI, z ang. percutaneous coronary intervention), inaczej określaną mianem przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki wieńcowej (PTCA, z ang. percutaneous transluminal coronary angioplasty) oraz pomostowanie aortalno- wieńcowe. Spośród wyżej wymienionych metod leczniczych, to PCI jest obecnie najczęściej podejmowana w celu poszerzenia zwężenia światła CA lub przywrócenie drożności po całkowitym jej zamknięciu, a polega ona na balonowaniu zwężonego odcinka naczynia i umieszczenie wewnątrznaczyniowo stentu. **Mgr inż. Przemysław Sareło** opisując w dalszej części Wstępu efekty biologiczne indukowane implantacją stentu przedstawia patomechanizm restenozy w stencie, efekty molekularne i komórkowe zależne od Interleukiny 4 i 10 w okresie przed- i poimplantacyjnym, chemię powłok, w tym polidopaminy, będącej wysoce adhezyjnym i reaktywnym chemicznie materiałem bazowym, podnosząc wartość dysertacji świetnie wykonaną autorsko oprawą graficzną, ilustrującą mechanizmy opisywanych przez siebie procesów, zjawisk i teorii, w tym teorii wiązania interleukin na powierzchni materiału bazowego oraz techniki sieciowania w aspekcie immobilizacji interleukin.

Motywacją do przeprowadzenia przez Doktoranta badań było opracowanie i scharakteryzowanie powłoki do użytku w kardiologii interwencyjnej. w związku z powyższym podjął cel pracy, którym było otrzymanie powłoki na powierzchni kobaltowo-chromowego

stentu kardiowaskularnego, przeciwdziałającej przewlekłym i ostrym procesom zapalnym, toczących się w ścianie naczynia, a wynikających z postępującej miażdżycy oraz przeprowadzonego zabiegu przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki wieńcowej.

Powłoka ta opracowana została na bazie biopolimerów (polidopamina oraz chitozan), wykazujących silne właściwości adhezyjne, służące zakotwiczeniu powłoki na powierzchni stentu oraz posiadających liczne grupy funkcyjne, służące związaniu interleukin przeciwzapalnych (interleukina 4 oraz interleukina 10) w reakcji bezpośredniej oraz za pośrednictwem techniki sieciowania. Doktorant postawił sobie za cel przeprowadzenie pełnej charakterystyki otrzymanej powłoki z wykorzystaniem spektroskopii osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni z transformatą Fouriera, mikroskopii sił atomowych i testów immunoenzymatycznych oraz określenie właściwości biologicznych powłoki w warunkach *in vitro* pod kątem patomechanizmu miażdżycy i restenozy w stencie na podstawie analizy i oceny żywotności, proliferacji i morfologii komórek śródbłonna hodowanych na otrzymanych powłokach, ich odpowiedzi prozapalnej, adhezji monocytów/makrofagów do biomateriału i komórek śródbłonna hodowanych na zmodyfikowanej powierzchni oraz indukcji zmian fenotypowych w makrofagach.

W swoim opracowaniu Doktorant postawił cztery tezy, służące realizacji nadrzędnego celu rozprawy doktorskiej, a mianowicie:

Teza nr 1: Istnieje materiał, którego parametry fizyko-chemiczne oraz właściwości biologiczne będą odpowiednie do zastosowania jako powłoka bazowa do pokrycia powierzchni stentu kardiowaskularnego. Możliwe jest pokrycie powierzchni stentu wybranym materiałem, zapewniając optymalność przyszłych procesów technologicznych.

Teza nr 2: Możliwe jest związanie cząsteczek wybranych interleukin przeciwzapalnych na powierzchni powłoki bazowej oraz możliwe jest potwierdzenie obecności interleukin na powierzchni materiału wybranymi technikami pomiarowymi.

Teza nr 3: Procedura wiązania interleukin na powierzchni powłoki bazowej nie upośledzi ich aktywności biologicznej wobec wybranych linii komórkowych.

Teza nr 4: Opracowana powłoka wykaże minimum dwie pożądane właściwości w odniesieniu do molekularnego bądź komórkowego patomechanizmu restenozy, co pozwoli wnioskować o korzyściach z zastosowania opracowanej modyfikacji powierzchni stentu.

W kolejnym rozdziale Autor dysertacji opisał materiały i metodykę, w tym procedury przygotowania powłok na bazie polidopaminy funkcjonalizowanych interleukiną, wzbogacenie powłoki o chitozan, funkcjonalizację powłoki interleukinami za pośrednictwem techniki sieciowania, ocenę struktury chemicznej powłoki za pomocą spektroskopii w podczerwieni,

charakterystykę nanostrukturalną powłoki za pomocą mikroskopii sił atomowych, ocenę kinetyki uwalniania interleukin z powierzchni powłoki z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego, hodowlę ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej stanowiących model komórek śródbłonka, hodowlę ludzkich komórek ostrej białaczki monocytowej stanowiących model monocytów/makrofagów, ocenę żywotności i proliferacji komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach, ocenę morfologii komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach, oznaczenie stężenia cytokin prozapalnych wydzielanych przez komórki śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach, ocenę adhezji makrofagów do otrzymanych powłok, ocenę interakcji między komórkami śródbłonka hodowanymi na otrzymanych powłokach a komórkowym modelem monocytów, ocenę aktywności biologicznej interleukin po związaniu na powłoce bazowej – polaryzacja makrofagów wskutek kontaktu z proponowaną powłoką, ocenę ekspresji cząsteczek adhezyjnych w komórkach śródbłonka oraz oznaczenie stężenia tlenu azotu i poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach śródbłonka.

Analizę statystyczną Doktorant przeprowadził bezbłędnie za pomocą oprogramowania SPSS Statistics stosując testowanie założenia normalności rozkładu prowadzono z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilka na poziomie istotności 0,05. Do sprawdzenia, czy analizowane dane spełniają kryterium równości wariancji, wykorzystał test Levene'a na poziomie istotności 0,05, a gdy dane spełniały warunki normalności rozkładu i równości wariancji jednokierunkową ANOVA na poziomie istotności 0,05 oraz analizę *post hoc* HSD Tukeya. Ponadto posługiwał się testem Kruskala- Wallisa na poziomie istotności 0,05, i dokonywał korekty poziomu istotności za pomocą poprawki Bonferroniego.

W rozdziale: Wyniki Doktorant przedstawił uzyskane rezultaty w postaci 49 rycin, w tym wykresów i obrazów z mikroskopu, oraz opisu wyników i komentarzy do nich w treści.

Przedstawione przez Doktoranta wyniki przeprowadzonych eksperymentów potwierdzają, że nadrzędny cel rozprawy doktorskiej został w pełni zrealizowany, bowiem immunofunkcjonalizowane powłoki zostały otrzymane, kompleksowo scharakteryzowane pod względem parametrów fizyko-chemicznych i aktywności biologicznej.

Dyskusja- wiele zawartych tu informacji ma charakter ogólnych opisów. Proponuję, aby Doktorant podczas przygotowywania dysertacji do publikacji zwięźle i umiejętnie skupił się przede wszystkim na konfrontacji uzyskanych wyników z rezultatami badań innych autorów. Literatura w zakresie podjętego przez Doktoranta tematu jest bardzo bogata i dostarcza wielu cennych argumentów pro i kontra, do przeprowadzenia błyskotliwej polemiki, a o tym, że taką umiejętność Doktorant posiada, świadczą liczne fragmenty dysertacji.

W dalszej części rozprawy Doktorant sformułował prawidłowo wnioski, odpowiadające na postawione tezy, a tym samym udowodnił, że:

Po pierwsze: Istnieje materiał, którego parametry fizyko-chemiczne oraz właściwości biologiczne będą odpowiednie do zastosowania jako powłoka bazowa do pokrycia powierzchni stentu kardiowaskularnego.

Po drugie : Możliwe jest związanie cząsteczek wybranych interleukin przeciwzapalnych na powierzchni powłoki bazowej oraz możliwe jest potwierdzenie obecności interleukin na powierzchni materiału wybranymi technikami pomiarowymi.

Po trzecie: Procedura wiązania interleukin na powierzchni powłoki bazowej nie upośledzi ich aktywności biologicznej wobec wybranych linii komórkowych. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów Doktorant udowodnił, że wskutek kontaktu makrofagów z otrzymaną powłoką, komórki te dokonują zmiany polaryzacji, nasilając ekspresję markera CD209, charakterystycznego dla alternatywnie aktywowanych makrofagów subpopulacji M2.

Po czwarte: Opracowana powłoka wykaże minimum dwie pożądane właściwości w odniesieniu do molekularnego bądź komórkowego patomechanizmu restenozy, co pozwoli wnioskować o korzyściach z zastosowania opracowanej modyfikacji powierzchni stentu.

Uwzględniając powyższe można stwierdzić, że nadrzędny cel rozprawy doktorskiej został przez Doktoranta zrealizowany. Stent z autorską powłoką został otrzymany, scharakteryzowany, a jego aktywność biologiczna względem wybranych, modelowych linii komórkowych została potwierdzona.

W rozdziale 10 Autor przedstawia swój dorobek naukowy- tytuły zawodowe, publikacje naukowe, w renomowanych periodykach posiadających znaczącą punktację MNiSW oraz IF, udział w konferencjach naukowych, grantach i projektach. Ponadto Autor przedstawia stypendia, współpracę naukową, swoją działalność dydaktyczną i dodatkową, promującą naukę.

Rozprawę kończy bibliografia licząca około 150 pozycji, niestety jest nieponumerowana i występują drobne błędy edytorskie w cytacjach.

Całość pracy doktorskiej **mgr inż. Przemysław Sareło** oceniam bardzo wysoko. Doktorant przedstawił ciekawe wyniki badań w oparciu o dobrze dobrany model badania. Autor pracy dowiódł tym samym, że potrafi przeprowadzić wzorowo eksperyment naukowy a następnie opracować uzyskane wyniki badań i w sposób przejrzysty przedstawić je czytelnikowi.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne aspekty dysertacji, które warto byłoby udoskonalić. Należą do nich: rozbudowanie dyskusji, poprawa bibliografii i jej cytowań

w tekście oraz korekta błędów edytorskich, stylistycznych i pojawiających się czasem niefortunnych sformułowań (np. progresująca miażdżyca- lepszym określeniem byłoby postępująca lub progresywna miażdżyca). Powyższe zastrzeżenia nie umniejszają wysokiej oceny, którą wystawiam Doktorantowi. Warta podkreślenia jest oryginalność tematyki i wkładu naukowego Doktoranta, która polega na:

1. Przeprowadzeniu z sukcesem procesu funkcjonalizacji powierzchni kobaltowo-chromowych stentów kardiowaskularnych, wprowadzając na ich powierzchnię biopolimery i interleukiny przeciwzapalne.

2. Otrzymaniu po raz pierwszy przeciwzapalnej powłoki, która w naczyniu uwalnia lokalnie cytokiny przeciwzapalne, uznane za deficytowe w stanie choroby naczyniowej. Wykazaniu, że autorska powłoka ogranicza wydzielanie cytokin porozpalanych przez komórki śródbłonna, stabilizując ich stężenie na stałym, niskim poziomie, co stopniowo hamuje toczące się procesy zapalne.

3. Potwierdzeniu, że otrzymana powłoka jest zdolna do indukowania zmian fenotypowych makrofagów zgromadzonych w ścianie tętnicy, co korzystnie wpływa na procesy gojenia i regeneracji tkanek oraz wyhamowanie procesów zapalnych.

4. Dowiedzeniu, że funkcjonalizowana powłoka, otrzymana według autorskiej procedury, znacząco hamuje adhezję monocytów/makrofagów, przeciwdziałając ewentualnym stanom zapalnym.

5. Wykazaniu, że monocyty adherują w ograniczonym stopniu do komórek śródbłonna, które pokrywały zmodyfikowaną powierzchnię implantu naczyniowego, co hamuje postęp choroby naczyniowej.

Ponadto pracę cechują:

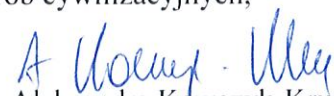
1. Poprawność w sformułowaniu założeń badawczych, tez, celu pracy i wniosków,
2. W przeważającej części rozprawy poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna- Doktorant posługuje się poprawnym słownictwem, charakterystycznym dla prac naukowych, medyczny język angielski jest prawidłowy,
3. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania - Doktorant przedstawia dokładny opis całej procedury badawczej oraz oznaczeń z poszczególnych etapów eksperymentu. Przedstawiona charakterystyka wymienionych metod nie budzi zastrzeżeń,
4. Doskonała oprawa graficzna pracy, jasny i przejrzysty, pomimo skomplikowanego tematu, sposób przedstawienia wyników.

Wniosek końcowy

Ogólna heurystyka pracy jest poprawna, analizy prowadzone są rzetelnie, a wnioski ciekawe. Rozprawa świadczy o odpowiedniej wiedzy Doktoranta w zakresie projektowania badań i umiejętności analizy osiągniętych wyników. Rozprawa jest poprawnie zredagowana, a drobne „lapsusy” językowe nie umniejszają rangi osiągniętych wyników. Analizując strukturę pracy i opisy, należy stwierdzić, że Doktorant orientuje się w tematyce rozprawy, opanował pisanie tekstów. Szczegółowa i wnikliwa ocena osiągnięć naukowo-badawczych **mgr inż. Przemysław Sareło** upoważnia mnie do wyrażenia wysoce pozytywnej opinii. Dojrzałość naukowa Doktoranta poparta jest zdolnością do analitycznego myślenia i trafnego wyciągania wniosków. Rozprawa doktorska udowadnia, że **mgr inż. Przemysław Sareło** jest dojrzałym pracownikiem naukowym, w pełni zdolnym do realizowania samodzielnych, twórczych koncepcji naukowych zasługujących na stopień naukowy doktora w Dyscyplinie Inżynieria Biomedyczna. Na podstawie wymienionych przeze mnie wysokich aspektów naukowych i poznawczych powyższej dysertacji uważam, że rozprawa doktorska **mgr inż. Przemysław Sareło** spełnia warunki określone ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Rozprawa została sumiennie przygotowana, a otrzymane wyniki są ważne z punktu widzenia przyszłych badań podstawowych i klinicznych. Doktorant rozwiązał rozważany w pracy problem naukowy, stosując przy tym poprawny warsztat badawczy. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Inżynierii Biomedycznej na Politechnice Wrocławskiej o kontynuowanie postępowania o nadanie **mgr inż. Przemysław Sareło** stopnia doktora w dyscyplinie Inżynierii Biomedycznej. Jednocześnie składam wniosek o jej wyróżnienie, z uwagi na wysoką wartość naukową, poziom merytoryczny, oryginalność zastosowanych metod badawczych oraz możliwość przyszłego wdrożenia do praktyki klinicznej a przez to istotny wkład uzyskanych wyników w rozwój nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Do wartości naukowych i poznawczych powyższej dysertacji, zasługujących na wyróżnienie, zaliczam:

- 1/ Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność
- 2/ Duże znaczenie uzyskanych rezultatów dla nauki i praktyki, w tym możliwości ich bezpośredniego przełożenia na codzienną praktykę kliniczną i zastosowanie praktyczne,
- 3/ Nowatorski i aktualny temat, zwłaszcza w aspekcie chorób cywilizacyjnych,
- 4/ Perspektywiczny i rozwojowy charakter pracy.

Bytom, 03.08.2023r


Aleksandra Kawczyk-Krupka

PROFESOR BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Oddziału Klinicznego
Chorób Wewnętrznych, Angiologii
i Medycyny Fizykalnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach