

dr hab. inż. Dorota Lewińska, profesor
Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej
im. Macieja Nałęcz PAN
ul. Księcia Trojdena, 02-109 Warszawa

Warszawa, 19.11.2021 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Macieja Dudy

pt.: „Biofunkcjonalizacja powierzchni stentów kardiowaskularnych za pomocą przeciwciał promujących progenitorowe komórki śródbłonka”

Promotor: dr hab. Marta Kopaczyńska

Drugi Promotor: dr hab. n. med. Magdalena Wawrzyńska

Recenzja została wykonana na prośbę prof. dr hab. inż. lek. Haliny Podbielskiej Przewodniczącej Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Biomedyczna Politechniki Wrocławskiej, zawartą w piśmie nr K65W11D04/319/2021 z dnia 22 września 2021 r.

Tematyka rozprawy, cel i struktura rozprawy.

Przezskórna wewnątrznaczyniowa angioplastyka wieńcowa, alternatywna wobec pomostowania aortalno-wieńcowego (skomplikowanej operacji prowadzonej bezpośrednio na sercu, związanej z zatrzymaniem krążenia i podłączeniem płucoserca) jest stosunkowo mało inwazyjną metodą leczenia choroby wieńcowej serca. W Polsce do praktyki klinicznej wprowadzona została na początku lat 90-siątych przez zespoły kardiologów z Zakładu Hemodynamiki Instytutu Kardiologii i I Samodzielnej Pracowni Hemodynamiki tegoż Instytutu, działających pod kierownictwem dr hab. n. med. Witolda Rużyło i dr n. med. Zbigniewa Purzyckiego. Obecnie technika ta jest „złotym standardem” w leczeniu zwężenia tętnic wieńcowych serca, a ilość przeprowadzanych w Polsce zabiegów przekracza 100 000 rocznie. Wzrost popularności tej metody oraz dążenie do dalszego zminimalizowania skutków ubocznych jej stosowania (takich jak zakrzepica i restenoza) stymulują badaczy na całym świecie do badania i wdrażania nowych rodzajów implantów wewnątrznaczyniowych.

Jednym z najbardziej obiecujących kierunków badawczych jest funkcjonalizacja powierzchni stentów, mająca na celu poprawę ich biozgodności poprzez funkcjonalizację w kierunku stymulowania tworzenia warstwy naturalnego śródbłonka na ich powierzchni (reendoterializacja). W tej tematyce badawczej umiejscowiona jest recenzowana praca.

Pan mgr inż. Maciej Duda postawił sobie za cel zmodyfikowanie powierzchni stalowych stentów kardiowaskularnych za pomocą dwóch rodzajów przeciwciał: anti-CD133 oraz fragmentów

ludzkich przeciwciał scFv anti-VEGFR2 specyficznych wobec progenitorowych komórek śródbłonna. Zgodnie z zaproponowaną przez Kandydata strategią funkcjonalizacja powierzchni stentów w dwojaki sposób powinna sprzyjać jej reendotelializacji:

- przeciwciała anti-CD133 powinny umożliwić adhezję progenitorowych komórek śródbłonna dzięki wiązaniu białka transmembranowego CD-133 znajdującego się na powierzchni błony komórkowej
- przeciwciała scFv wiążące specyficznie receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFR2) powinny dodatkowo sprzyjać wiązaniu komórek śródbłonna krążących w układzie krwionośnym oraz tych, które znajdują się w pobliżu implantu.

Dodatковым celem zaproponowanej funkcjonalizacji było ograniczenie adhezji i proliferacji komórek mięśni gładkich.

Recenzowana rozprawa ma strukturę monografii, z klasycznym podziałem na część teoretyczną i eksperymentalną.

W części teoretycznej zawarto krótkie wprowadzenie do prezentowanych badań, oraz dwa rozdziały literaturowe przybliżające czytelnikowi tematykę ekonomiczno-społecznych problemów stosowania przezskórnej angioplastyki wieńcowej w Polsce oraz rodzajów stosowanych implantów wewnątrznacyniowych z naciskiem na stenty modyfikowane powierzchniowo.

Część eksperymentalna poprzedzona została 3,5 stronicowym rozdziałem jasno i zwięźle przedstawiającym cel oraz tezy pracy. Do ich prezentacji wybrano obrazową metodę graficzną.

W części eksperymentalnej wyodrębniono trzy rozdziały: materiały, metody oraz wyniki i dyskusję.

Dodatkowo, w osobnych rozdziałach syntetycznie przedstawiono: perspektywy na przyszłość, wnioski, podsumowanie, najważniejsze osiągnięcia naukowe Doktoranta, udowodnione tezy naukowe, dorobek naukowy Doktoranta oraz spis cytowanej literatury, zawierający 65 pozycji właściwie dobranej literatury.

Praca zawiera trzydzieści dwa, w zdecydowanej większości kolorowe, starannie przygotowane rysunki i jedną tabelę. Całość poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych w pracy skrótów i zaprezentowana jest na 91 stronach.

Zakres prac.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma wybitnie charakter interdyscyplinarny, obejmując swoim zakresem nie tylko różne dyscypliny naukowe, ale także dziedziny nauki takie jak: nauki inżyniersko-techniczne, nauki ścisłe i przyrodnicze oraz nauki medycznych i nauki o zdrowiu.

W pracy zaprezentowano niezwykle szeroki zakres prac eksperymentalnych obejmujących dwie zasadnicze grupy badań.

Pierwsza z nich to badania z zakresu szeroko pojętej inżynierii materiałowej. W ich skład wchodzi:

- dwuetapowa, chemiczna funkcjonalizacja powierzchni stalowych pokrytych uprzednio ditlenkiem tytanu za pomocą reakcji amino- i merkaptosilanizacji oraz zbadanie jej skuteczności za pomocą technik spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera metodą osłabionego wewnętrznego odbicia (FTIR-ATR) i spektroskopii FT-Ramana,
- biofunkcjonalizacja tak przygotowanych powierzchni za pomocą przeciwciał anti-CD133 i fragmentów ludzkich przeciwciał scFv asnty-VEGFR2,
- ocena skuteczności biofunkcjonalizacji powierzchni przeciwciałami za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej, mikroskopii sił atomowych i mikroskopii konfokalnej.

Druga grupa to specjalistyczne eksperymenty biologiczne obejmujące badania *in vitro* i *in vivo* wytworzonych, biofunkcjonalizowanych powierzchni. Zalicza się do nich:

- ocena biogodności wytworzonych powierzchni za pomocą wybranych linii komórkowych (EPCs, VSMCs, HUVECs i EPLCs)
- ocena adhezji i proliferacji komórek śródbłonna i mięśni gładkich na biofunkcjonalizowanych powierzchniach,
- ocena właściwości hemolitycznych wytworzonych powierzchni z wykorzystaniem spektroskopii UV-VIS,
- ocena cytotoksyczności oraz ekspresji antygenu CD133 z wykorzystaniem cytometrii przepływownej,
- badania alergizujące stentów biofunkcjonalizowanych przeciwciałami anti-CD133 przeprowadzone na populacji świń morskich,
- badania rozkładu nanocząsteczek tytanu w organach populacji szczurów Wistar po dootrzewnowej implantacji stentu pokrytego powłoką z ditlenku tytanu.

Zamieszczone w pracy opisy zastosowanych w powyższych badaniach metod pozwalają stwierdzić, że zostały one przeprowadzone zgodnie z obowiązującymi normami i procedurami, na najwyższym, światowym poziomie, a całość prac doskonale wpisuje się w obszar zagadnień dotyczących inżynierii biomedycznej.

W pracy Kandydat postawił trzy tezy:

Teza 1. Proces merkaptosilanizacji powierzchni powłok na bazie ditlenku tytanu metalowego stentu wewnątrznaczyniowego może być monitorowany za pomocą techniki spektroskopii FTIR-ATR.

Teza 2. Możliwa jest biofunkcjonalizacja merkaptosilanizowanych powierzchni za pomocą przeciwciał anti-CD133 pozytywnych względem progenitorowych komórek śródbłonna.

Teza 3. Mikroskopia konfokalna umożliwia obserwację promowania reendotelializacji progenitorowych komórek śródbłonna, z jednoczesną inhibicją proliferacji komórek mięśniówki na biofunkcjonalizowanych powłokach.

W ramach pracy nad tezą pierwszą Kandydat opracował autorską metodę chemicznej funkcjonalizacji powierzchni stalowych pokrytych ditlenkiem tytanu za pomocą reakcji amino- i merkaptosilanizacji. Potwierdzeniem skuteczności opracowanej metody były widoczne w widmach FTIR-ATR i FT-Ramana pasma charakterystyczne dla drgań wiązań pochodzące od wolnych grup aminowych i tiolowych.

Efektywna merkaptosilanizacja umożliwiła następnie kowalencyjne wiązanie do modyfikowanej powierzchni stentów przeciwciał anti-CD133. Obecność tych ostatnich na badanych powierzchniach potwierdziły badania za pomocą mikroskopii konfokalnej oraz mikroskopii sił atomowych, udowadniając tym samym prawdziwość drugiej tezy.

W celu udowodnienia tezy trzeciej Kandydat przeprowadził chemiczną immobilizację przeciwciał anti-CD133 oraz fragmentów ludzkich przeciwciał scFv anti-VEGFR2 na funkcjonalizowanej ditlenkiem tytanu stalowej powierzchni stentów, a następnie poddał je badaniom *in vitro* w obecności znakowanych fluoroscencyjnie progenitorowych komórek śródbłonna (EPCs) oraz naczyniowych komórek mięśni gładkich (VSMCs). Badanie za pomocą mikroskopii konfokalnej wykazało, że biofunkcjonalizowane przeciwciałami powierzchnie prawie w całości pokryte były komórkami śródbłonna. W ten sposób teza trzecia także została udowodniona.

Jednakże udowodnienie wszystkich postawionych tez najwyraźniej niezadowolilo mgr. Macieja Dudy, gdyż wykonał On jeszcze dodatkowo serię badań biogodności *in vitro* oraz *in vivo*.

W badaniach *in vitro* Kandydat potwierdził niską hemotoksyczność biofunkcjonalizowanych przeciwciałami powierzchni oraz stosunkowo niską cytotoksyczność powierzchni modyfikowanych fragmentami ludzkich przeciwciał scFv anti-VEGFR2. Za pomocą mikroskopii konfokalnej udowodnił także, że powierzchnie modyfikowane fragmentami ludzkich przeciwciał scFv anti-VEGFR2 preferencyjnie wiążą modelowe komórki HUVEC ekspresjonujące białko VEGFR2, a reakcja ta przebiega znacznie szybciej niż w przypadku innych przeciwciał (jedynie około 3 minuty).

Pozytywne wyniki badań *in vitro* umożliwiły Doktorantowi przeprowadzenie ostatniego etapu prac eksperymentalnych – wybranych badań powierzchni biofunkcjonalizowanych przeciwciałami anti-CD133 na zwierzętach. Badania alergizujące przeprowadzone na świnkach morskich poprzez kontakt skórny z badaniem materiałem wykazały brak jakichkolwiek symptomów podrażnienia. Badanie obecności tytanu w organach wewnętrznych szczurów Wistar po dootrzewnowej implantacji materiału funkcjonalizowanego ditlenkiem tytanu wykazały śladową obecność tytanu w nerkach, płucach, wątrobie i mózgu nie różniącą się statystycznie w stosunku do kontroli.

Na zakończenie części eksperymentalnej rozprawy Autor umieścił krótki rozdział prezentujący wyniki modelowania molekularnego oddziaływań antygenu transmembranowego CD133 ze specyficznymi przeciwciałami anti-CD133. Otrzymane wyniki sugerują, że siła oddziaływań pomiędzy białkiem CD133 a krótką sekwencją specyficznego przeciwciała anti-CD133 jest wystarczającą (dwa lokalne maksima o energii 4 i 6 kcal/mol) aby możliwe było ich zastosowanie w biofunkcjonalizowanych stentach kardiowaskularnych do efektywnego wiązania progenitorowych komórek śródbłónka.

Ocena merytoryczna.

Całość przeprowadzonych przez Kandydata badań oceniam bardzo wysoko. Ogromny zakres przeprowadzonych prac, ich różnorodność, a także ilość i technologiczne zaawansowanie metod badawczych (w tym mikroskopowych i spektroskopowych) zastosowanych przez Doktoranta do analizy poszczególnych etapów funkcjonalizacji powierzchni stentów zasługują na najwyższą ocenę.

Do szczególnie ważnych osiągnięć Doktoranta zaliczam opracowanie autorskiej, efektywnej metody chemicznej funkcjonalizacji powierzchni stalowych stentów powlekanych uprzednio warstwą ditlenku tytanu. Metoda ta umożliwiła następnie skuteczne, chemiczne wiązanie wybranych przeciwciał promujących adhezję i proliferację progenitorowych komórek śródbłónka.

Za cenne osiągnięcie uważam także udowodnienie przydatności stosowania technik spektroskopowych (FTIR-ATR i FT-Ramana) oraz mikroskopowych (mikroskopia konfokalna i AFM) do kontroli efektywności poszczególnych etapów procesu biofunkcjonalizacji powierzchni przeciwciałami anti-CD133 i fragmentami ludzkich przeciwciał scFv anti-VEGFR2.

Na uwagę zasługuje także idea zastosowania mikroskopii konfokalnej (także w połączeniu z cytometrią przepływową) do obserwacji i oceny stopnia wiązania się progenitorowych komórek śródbłónka oraz innych, modelowych komórek do powierzchni modyfikowanych badanymi przeciwciałami.

Nie sposób także pominąć dodatkowej wartości, jaką wnoszą badania Doktoranta związanej z potencjalną komercjalizacją wyników Jego badań.

Poziom naukowy zaprezentowanych przez Kandydata prac oraz ich jakość już znalazły uznanie w środowisku specjalistów, co znalazło potwierdzenie w wysokim współczynniku wpływu ($IF > 3$) czasopism naukowych, w których większość prezentowanych wyników została już opublikowana.

Uwagi szczegółowe i pytania.

Praca napisana jest jasnym, zwięzłym stylem charakterystycznym dla wielu inżynierów. Być może z tego powodu, miejscami widoczne są pewne uproszczenia, szczególnie dotyczące części

literaturowej, w której Autor czasami zamiast konkretnych informacji ze wskazaniem ich źródeł, stosuje zbitki literaturowe skupiające 4 lub 5 odnośników (np. str. 19, 20 i 25).

Przyznam także, że część literaturowa, w moim odczuciu mogłaby być nieco bardziej rozbudowana. Przy tej okazji chciałabym zapytać Doktoranta: czym tłumaczy się spadek liczby wykonywanych zabiegów przezskórnej angioplastyki wieńcowej obserwowany od 2015 r.? Czyżby zmniejszyła się zachorowalność Polaków na chorobę wieńcową?

Proszę także o wyjaśnienie: czy wiązanie fragmentów przeciwciał scFv anti-VEGFR2 przeprowadzano zarówno po aminosilanizacji jak i merkaptosilanizacji powierzchni, czy też (jak to jest schematycznie pokazane na Rys.12) do wiązania przeciwciał wykorzystano jedynie grupy aminowe? Jeśli obie metody silanizacji były badane to czy stwierdzono jakieś różnice w skuteczności wiązania przeciwciał oboma sposobami?

Uważam użycie słowa „opłaszczanie” w odniesieniu do napyłania próbek węglem lub złotem podczas przygotowywania ich do badań za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego za błędne (p. 6.4.1. str.40). Termin ten stosowany był i jest w literaturze w odniesieniu do pokrywania komórek lub ich skupisk (jak np. wyspy Langerhansa) błoną półprzepuszczalną w celu ich immunoizolacji po xenoprzeszczepie. Obecnie częściej stosowany jest termin „enkapsulacja”.

W tym samym podpunkcie zbędny jest także opis dotyczący analizowania próbek modyfikowanych grafenem.

Na stronie 47 (linia 2) znalazłam dość intrygującą informację o tym, że :”Przeprowadzone w tym rozdziale badania oraz uzyskane wyniki są częścią publikacji ⁵² wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.” Proszę o wyjaśnienie.

Przyznam, że ani w części opisującej metod (str. 47 p. 6.6.1.1) ani wyników (str. 72) nie znalazłam informacji jakie konkretnie materiały badano w testach alergizacji na populacji świnek morskich.

Niewłaściwy jest podpis pod rys. 18 (str. 60). Omawiany rysunek, wbrew podpisowi, nie zawiera zdjęć spod skaningowego mikroskopu elektronowego, a jedynie obrazy AFM.

W pracy znalazły się także nieliczne, drobne błędy związane z formatowaniem:

- podpisy pod rysunkami nr 3 i 6 zaczynają się na jednej, a kończą na następnej stronie,
- na końcu strony 21 niepotrzebnie pozostawiono tytułu kolejnego podrozdziału oraz literowe
- powtórzenie słowa „na” str,21

- nieprawidłowa odmiana zamiast „struktury chemicznej” jest „struktura chemicznego” (str. 39 linia 8 tekstu).

Końcowa ocena rozprawy.

Powyższe uwagi w żadnym stopniu nie zmniejszają wartości pracy doktorskiej Doktoranta. Kandydat opracował autorską metodę biofunkcjonalizacji powierzchni metalowych stentów wybranymi przeciwciałami promującymi reendotelializację. Skuteczność przeprowadzonych modyfikacji została przez Doktoranta udowodniona w oparciu o badania za pomocą nowoczesnych technik spektroskopowych i mikroskopowych.

Praca wnosi istotny wkład w rozwój inżynierii biomedycznej, w szczególności w odniesieniu do funkcjonalizacji powierzchni implantów stalowych.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Macieja Dudy pt.: „Biofunkcjonalizacja powierzchni stentów kardiowaskularnych za pomocą przeciwciał promujących progenitorowe komórki śródbłónka” spełnia wszystkie kryteria stawiane przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami) oraz art. 179 ust. 2 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę –Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669). Z uwagi na poziom naukowy rozprawy, oraz osiągnięcia publikacyjne Kandydata wnioskuję o jej wyróżnienie. Wnoszę zatem o przyjęcie niniejszej rozprawy oraz dopuszczenie mgr inż. Macieja Dudy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



