



Katowice, 28.05.2025 r.

Dr hab. Katarzyna Kasperkiewicz
Uniwersytet Śląski
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
ul. Jagiellońska 28
40-032 Katowice
email: katarzyna.kasperkiewicz@us.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Rusek-Wali

pt. „Angiogenne i proregeneracyjne właściwości cholesterolu oraz osteogenne działanie biokompozytu modyfikowanego cholesterolem”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Angiogenne i proregeneracyjne właściwości cholesterolu oraz osteogenne działanie biokompozytu modyfikowanego cholesterolem” została wykonana przez Panią mgr Paulinę Rusek -Walę pod opieką Pani dr hab. Agnieszki Krupy prof. UŁ oraz promotora pomocniczego Pana dr hab. Przemysława Płocińskiego, prof. UŁ. Praca stanowi spójną tematycznie monografię, opracowaną zgodnie z wytycznymi określonymi dla oryginalnych prac naukowych.

Przedmiotem rozprawy były badania dotyczące oceny potencjalnej roli cholesterolu w procesach regeneracji śródbłonna naczyniowego i tkanki kostnej. Tematyka badań podjętych przez Panią mgr Rusek-Walę jest uzasadniona. Poszukiwanie substancji aktywnych biologicznie celem modyfikacji kompozytów o zastosowaniu terapeutycznym u pacjentów z dysfunkcją tkanki kostnej stanowi jeden z głównych celów medycyny regeneracyjnej. Działanie materiałów polimerowych stosowanych w celu regeneracji tkanek jest często związane z kierowaniem aktywnością komórek celem odbudowy uszkodzonej struktury tkanki oraz aby przywrócić jej funkcjonalność.





Szczegółowe cele pracy obejmowały: selekcję związku biologicznie aktywnego spośród grupy steroli o największym potencjale promującym proces regeneracji naczyń, charakterystykę fizyko-chemiczną i biologiczną oraz modyfikację kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych wybranym sterolem, a także ocenę efektywności jego działania i bezpieczeństwa biologicznego.

Autorka badań postawiła hipotezy, że badane sterole, w tym cholesterol, wykazują silny potencjał proregeneracyjny wobec komórek śródbłónka naczyń i mogą one stanowić dobry komponent do modyfikacji kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych.

Recenzowana rozprawa doktorska zawiera następujące rozdziały: **Wstęp, Uzasadnienie podjęcia tematu, Hipotezy badawcze, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie wyników, Wnioski, Literatura**. Dodatkowo w opracowaniu zamieszczono: źródło finansowania, dorobek naukowy Doktorantki, informacje dotyczące zgłoszenia patentowego, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów.

Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego oraz koncepcja badań została poprzedzona obszernym wstępem teoretycznym, w którym Autorka dokonała charakterystyki stanu zapalnego śródbłónka naczyniowego, wskazując najważniejsze czynniki mające wpływ na jego rozwój, m.in. stres oksydacyjny oraz występowanie chorób tj. otyłość, cukrzyca, zespół metaboliczny. Syntetycznie zostały opisane zmiany w komórkach śródbłónka na poziomie transkryptomu i szlaki sygnałowe. Doktorantka przygotowała również obszerny podrozdział, w którym przedstawiła rolę białek regulujących angiogenezę i proces regeneracji śródbłónka. Pragnę podkreślić, wysokie umiejętności Pani Mgr Pauliny Rusek -Wali w redagowaniu syntetycznych i ciekawych opracowań treści naukowych, czego przykładem mogą być podrozdziały dotyczące opisu mechanizmów zachodzących w czasie regeneracji śródbłónka. Uzupełnieniem rozdziału Wstęp są przejrzyste i staranne autorskie ryciny (ryc.2, ryc.3, ryc.4), które stanowią dobre dopełnienie tekstu.

W obszernej części doświadczalnej została oceniona: aktywność metaboliczna, stres oksydacyjny, migracja oraz ekspresja powierzchniowych receptorów komórek śródbłónka naczyniowego HMEC-1 w odpowiedzi na stymulację badanymi sterolami, w tym cholesterolem. Jednocześnie dokonano pomiaru stężenia kolagenu I wydzielanego przez te komórki po stymulacji sterolami. Badania przeprowadzono na komórkach śródbłónka naczyniowego człowieka HMEC-1.





Niezwykle interesującą część badań stanowiły te, w których oceniono tworzenie się tubul przez komórki śródbłonka w środowisku macierzy zewnątrzkomórkowej ze zredukowaną zawartością czynników wzrostu. Za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na zwierzętach z siedzibą przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi zaprojektowano interesujący eksperyment, w którym oceniono kiełkowanie krążków aorty piersiowej izolowanej od szczurów (samców) rasy Wistar w odpowiedzi na stymulację cholesterollem – test *Aorta Sprouting assay*. W opisie protokołu wykonania pojawiło się niezbyt trafne sformułowanie cyt: "komórki inkubowano przez 30 minut w warunkach inkubatora...", w mojej opinii należy podać parametry procesu inkubacji tj. temperaturę oraz stężenie CO₂, wilgotność. Dopełnieniem badań biologicznych na modelu komórkowym były analizy transkryptomiczne i ekspresji wybranych genów w komórkach śródbłonka naczyniowego po stymulacji cholesterollem.

Drugą, eksperymentalną część rozprawy doktorskiej stanowiły innowacyjne badania bioinżynieryjne, mające na celu zaprojektowanie i otrzymanie wysoce biokompatybilnych kompozytów polilaktydowych z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych cholesterollem. Kompozyty na potrzeby niniejszych badań zostały zaprojektowane i wytworzone przez zespół dr. inż. Moniki Biernat z grupy Badawczej Biomateriały, Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytut Ceramiki i Materiałów budowlanych w Warszawie. Kompozyty modyfikowano cholesterollem w dwóch postaciach jako wysoce oczyszczony rozpuszczalny w etanolu oraz proszek rozpuszczalny w wodzie. Modyfikowane kompozyty zostały poddane badaniom cytobiozgodności zgodnie z normą ISO - 10993-5-2009), w którym oceniono aktywność metaboliczną linii mysich fibroblastów (L929). Dodatkowo, Doktorantka wykonała także analogiczne badania stosując osteoblasty człowieka hFOB 1.19. co jest uzasadnione w kontekście badań *in vivo*, zaproponowanych w dalszej części projektu, które dotyczyły bezpieczeństwa stosowania kompozytu, stosując test miejscowej odpowiedzi tkankowej i reakcji uogólnionej na wszczepiony zwierzętom doświadczalnym biomateriał. Eksperymentem o przełomowym znaczeniu dla osiągnięcia założonych celów badawczych niniejszej rozprawy w mojej opinii było badanie bioefektywności zarastania ubytków w kościach czaszki po implantacji kompozytów niemodyfikowanych oraz modyfikowanych cholesterollem. Pani mgr Paulina Rusek-Wała uczestniczyła w badaniach *in vivo* na podstawie posiadanego wyznaczenie do pracy na zwierzętach (nr 268W/2021). Analizę histopatologiczną kompozytów po deplantacji od szczurów wykonano w akredytowanym laboratorium diagnostyki histologicznej i cytologicznej





Cytopath w Łodzi. Pani mgr Paulina Rusek -Wala asystowała w analizie obrazów mikroskopowych preparatów przekrojów poprzecznych kompozytów. W mojej opinii tytuł podrozdziału 5.2.21 powinien brzmieć: „Analiza histopatologiczna kompozytów po deplantacji od szczurów (modele in vivo)”, a nie „Analiza histopatologiczna kompozytów po implantacjach do szczurów (modele in vivo)”, gdyż opis dotyczy badań wykonanych na już wyizolowanych od zwierząt kompozytów, tym samym tytuł jest nieadekwatny do treści podrozdziału.

W celu osiągnięcia założonych celów badawczych Doktorantka stosowała różnorodne metody biologiczne, w tym techniki immunologicznych i molekularne, co świadczy o Jej bogatym przygotowaniu metodycznym do pracy naukowej.

Uzyskane wyniki badań zostały przeprowadzane w odpowiedniej ilości powtórzeń biologicznych oraz technicznych, zastosowano uzasadnione merytorycznie kontrole pozytywne i negatywne, co gwarantuje wysoki poziom naukowy otrzymanych rezultatów. W uzasadnionych przypadkach wyniki analizowano pod kątem istotności statystycznej. Recenzowany rozdział Materiał i metody został przygotowany bardzo starannie, zawiera szczegółowo opisane procedury badawcze.

Materiały, odczynniki, sprzęty zostały zestawione w formie spisu wraz z podaniem niezbędnych informacji (m.in. nazwy producenta).

Rozdział Wyniki niniejszej pracy doktorskiej został podzielony na podrozdziały w sposób bardzo przemyślany. Na początku zostały przedstawione rezultaty badań, które pozwoliły wyłonić najsilniej działający związek sterolowy w kontekście promocji działania proregeneracyjnego. Wykazano, iż to właśnie cholesterol powodował istotnie statystyczny, wysoki wzrost ekspresji czynnika VEGFR2 na komórkach śródbłonna naczyniowego HMEC-1. Związek ten bardzo dobrze promował tworzenie tubul przez komórki śródbłonna. Wyniki uzyskane w dalszych etapach badań prowadzonych przez Doktorantkę potwierdziły jednoznacznie słuszność założeń badawczych. Fakt ten stanowił również punkt wyjścia do niezwykle nowatorskich i cennych badań bioinżynieryjnych, dzięki którym zaprojektowano innowacyjny, biozgodny i bezpieczny kompozyt wzbogacony o cholesterol, o potencjalnym zastosowaniu do regeneracji tkanki kostnej. Rozdział Wyniki został wzbogacony w czytelne wykresy, tabele i ryciny oraz fotografie które znacznie ułatwiają percepcję tekstu.





Dyskusję otrzymanych wyników przeprowadzoną przez Doktorantkę oceniam bardzo wysoko, stanowi ona syntetyczną i spójną analizę uzyskanych rezultatów. Autorka porównała otrzymane wyniki z osiągnięciami innych badaczy prezentując dojrzałą postawę naukową. Wnikliwa analiza literatury tematu jakiej dokonała pozwoliła wskazać również obszary badań, które warto w przyszłości kontynuować.

Rozdział IX zawiera trzy poprawnie sformułowane **Wnioski** wynikające z przeprowadzonych badań:

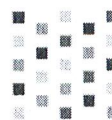
- Potencjał proregeneracyjny cholesterolu względem komórek linii śródbłónka naczyniowego poprzez promowanie cech takich jak migracja i zdolność do tworzenia tubul w układzie in vitro w powiązaniu ze wzrostem ekspresji czynnika VEGFR2
- Cholesterol zastosowany jako modyfikator włókien apatytowych, będących wypełniaczem kompozytu PLA miał istotny wpływ na procesy regeneracji tkanki kostnej na modelu in vivo ubytku kości czaszki zwierząt doświadczalnych (szczurów).
- Wzbogacenie kompozytu PLA o cząsteczki cholesterolu stanowi nowatorskie rozwiązanie, otwierające nowe możliwości dla tego typu biomateriałów do leczenia uszkodzeń tkanki kostnej wraz z regeneracją śródbłónka naczyniowego.

Chciałabym podkreślić, iż Panią mgr Paulina Rusek-Wałę zrealizowana założone cele badawcze jednocześnie potwierdzając postawione hipotezy badawcze, co stanowi duże osiągnięcie naukowe.

Piśmiennictwo zostało dobrze dobrane pod względem tematyki badań oraz cytowane starannie i prawidłowo. Wykaz literatury obejmuje 167 pozycji, w większości opublikowanych w ostatnich 10-15 latach, co wskazuje na dynamiczny rozwój tej gałęzi badań i zainteresowanie jakie budzi problematyka związana z poszukiwaniem innowacyjnych biomateriałów o wysokim potencjale aplikacyjnym w medycynie regeneracyjnej.

Praca doktorska została przygotowana w sposób bardzo staranny, spójny i choć nie udało się uniknąć kilku błędów stylistycznych, nie wpływa to na moją bardzo wysoką oceną strony naukowej rozprawy.

Dodatkowo w opracowaniu zostały zamieszczone informacje dotyczące: źródeł finansowania przeprowadzonych badań, dorobku publikacyjnego Doktorantki, zgłoszeń patentowych, udziału w projektach badawczych i odbytych stażach naukowych. Chciałabym podkreślić, iż Mgr Rusek -Wałę





jest współautorką 5 oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w międzynarodowych czasopismach (łącznie IF wynosi 26,956, a sumaryczna liczba punktów MNiSW to 700) oraz 1 zgłoszenia patentowego, co świadczy o Jej wysokiej aktywności naukowej.

Po wnikliwym zapoznaniu się z rozprawą doktorską stwierdzam iż stanowi ona oryginalne i niezwykle wartościowe opracowanie naukowe wskazujące cholesterol jako związek silnych o właściwościach angiogennych i proregeneracyjnych oraz wysokim potencjale do zastosowania go w projektowaniu nowoczesnych biokompozytów.

Jednocześnie chciałabym prosić Doktorantkę o przedstawienie swojej opinii w następujących kwestiach:

1. W jaki sposób dobrano dawki steroli do stymulacji komórek? Czy podjęto próby przeprowadzenia tych eksperymentów ze skrajnie wysokimi stężeniami cholesterolu? Czy wyznaczono minimalne i maksymalne dawki tego związku wykazujące działanie proregeneracyjne?
2. Czy planowane są próby zastosowania cholesterolu w regeneracji innych tkanek. Czy otrzymane wyniki zainspirowały Panią do takich przemyśleń?
3. Mając na uwadze udział steroli w patologicznych procesach zachodzących w organizmie ludzkim, w tym ich cytotoksyczne działanie wobec wielu populacji komórek, w jaki sposób można by wykorzystać wykazaną w Pani badaniach „dobrą stronę” cholesterolu w medycynie?

Wniosek końcowy recenzji:

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani **mgr Pauliny Rusek - Wali** spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z późniejszymi zmianami. Przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Otrzymane wyniki badań stanowią bardzo istotny wkład w rozwój dyscypliny. Dlatego zwracam się do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o





dopuszczenie Pani mgr Pauliny Rusek -Wali do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie, ze względu na bardzo dobry poziom naukowy oraz wyróżniającą jakość prowadzonych badań, istotny wkład tych badań w aktualny stan wiedzy, bardzo szeroki ich zakres oraz złożony warsztat metodyczny, a także zgłoszenia patentowe **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej**. Pragnę podkreślić, iż wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej mają charakter pionierski i wskazują cholesterol jako interesującego kandydata, który z sukcesem może być stosowany w modyfikacjach biokompozytów stosowanych w regeneracji tkanki kostnej. Doktorantka wykazała również, iż cholesterol jest związkiem mającym znaczny udział w regenerację śródbłonna naczyń, a także wykazuje istotne właściwości modulujące aktywności komórek układu odpornościowego, co może stanowić przyczynek do podjęcia szerokiej dyskusji naukowej na temat roli fizjologicznej cholesterolu w organizmie.

dr hab. Katarzyna
Waspedziem/Cu



