

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Jabłońskiego „Badanie *in vitro* potencjału hemolitycznego bakteryjnej nanocelulozy”

Ogromny postęp w bioinżynierii jaki dokonał się w ostatnich dekadach jest szczególnie ważny dla interwencyjnych dyscyplin zabiegowych. W kardiologii, neurochirurgii czy ortopedii masowo wykorzystuje się sztuczne implanty w celu zastąpienia nimi zniszczonych struktur ciała chorego. Wiadomo od dawna, że każde wprowadzenie do tkanek ciała obcego, celowe lub urazowe, prowokuje reakcje ustroju o różnym nasileniu. W przypadku terapeutycznego zastosowania implantów, w przeważającej liczbie przypadków chodzi o to, by taka reakcja była jak najmniej intensywna, jak najmniej szkodliwa dla biorcy i niezmieniająca funkcji implantu. Szczególnie prężnie rozwijają się w ostatnich dekadach kardiologia interwencyjna, stosująca różnego typu endowaskularne techniki naprawcze naczyń wieńcowych oraz kardiologia, zajmująca się pomostowaniem aortalno-wieńcowym oraz wymianą zastawek serca. Użyte grafty powinny cechować się jak najwyższą biokompatybilnością. W układzie krążenia dodatkowym czynnikiem, o którym należy pamiętać, są skutki kontaktu takiego implantu z płynącą krwią. Najbardziej oczywistymi niepożądanymi skutkami są wykrzepianie wewnątrznaczyniowe oraz nasilona hemoliza. Oba te procesy zachodzą fizjologicznie w minimalnym stopniu w układzie krążenia zdrowego człowieka, lecz ich natężenie jest bardzo niewielkie i utrzymywane w równowadze dzięki działaniu mechanizmów kontrolnych. Wprowadzenie ciała obcego zakłóca tę równowagę. Hemoliza krwinek czerwonych fizjologicznie praktycznie nie zachodzi w krwi krążącej, zawartość wolnej hemoglobiny w osoczu jest bardzo niska. Nasilona hemoliza nie tylko

upośledza zdolność krwi do transportu tlenu, lecz jest dużym zagrożeniem dla nerek. Poszukiwanie materiałów, które mogłyby zmniejszyć to prohemolityczne działanie implantów naczyniowych, jest zatem ze wszech miar uzasadnione.

Taki właśnie cel przyświecał Autorowi niniejszej pracy pt. „Badanie *in vitro* potencjału hemolitycznego bakteryjnej nanocelulozy”.

Jest to obszerne, ponad stu sześćdziesięciostronicowe opracowanie. Pozornie skonstruowane jest w sposób typowy dla tego typu opracowań, czyli: streszczenie, wstęp, materiały i metody, wyniki i dyskusja. Szczególnie zaskakująca jest zawartość rozdziału WSTĘP, który liczy 70 stron, czyli prawie połowę objętości rozprawy (wliczając bibliografię). Składa się on z wielu części, z których pierwsza (strony 13- 21) informuje o problemie badawczym, jaki ma być analizowany wraz z normami, jakich należy przestrzegać, miejscu wykonania badań oraz o tym, że są one częścią realizacji projektu „Kardio BNC”. W końcowym akapicie zawarta jest informacja, która budzi moje zdziwienie. Autor oświadcza, że rozprawa składa się z części teoretycznej i części badawczej. Muszę przyznać, że nie bardzo rozumiem, bo po raz pierwszy spotykam się z taką hybrydą. Nie wiem również, czy Rada Dyscypliny zaaprobowała taki sposób realizacji postępowania o nadanie stopnia doktora. Odnoszę wrażenie, że jest to raczej inicjatywa doktoranta, choć nie wyobrażam sobie, że nie była zaaprobowana przez **obu** promotorów. Okazuje się bowiem wkrótce, że ta „część teoretyczna” jest po prostu częścią wniosku grantowego projektu nazwanego „Kardio BNC” pod tytułem: „Przedkliniczne badania możliwości zastosowania oryginalnej polskiej bionanocelulozy (BNC) w medycynie regeneracyjnej w aspekcie bioimplantów w kardiochirurgii i chirurgii naczyniowej”. Tekst ten liczy 57 stron i zapewne powstał jako zbiorowe dzieło przedstawicieli tych sześciu jednostek badawczych, które aplikowały o grant. Opracowanie to jest napisane dobrze i interesująco, choć raczej w formule popularnonaukowej dedykowanej interdyscyplinarnym ekspertom oceniających tego typu aplikacje. Wyjaśnia to również fakt, dlaczego znakomita większość cytowanych w nim prac pochodzi sprzed roku 2013, czyli roku decyzji o przyznaniu finansowania. Muszę

tutaj jednak dodać, że Autor ulepszył ten tekst, wplatając w kilku miejscach odniesienia do nowszych pozycji literaturowych. Nie zmienia to jednak wrażenia czytającego, że zastosowano tu metodę kopiuj-wklej. Świadczy o tym dobitnie podrozdział „Kardiochirurgia w Polsce”, niezwykle luźno, jeśli w ogóle, związany z celem pracy.

Po tym bardzo długim i dość kontrowersyjnym wstępie jest jednostronicowy rozdział 8: „Cele doświadczalne i hipoteza badawcza”, w którym podsumowano zadania badawcze, jakie mają być zrealizowane.

Jak można się było spodziewać, kolejnym rozdziałem to: „Materiały i metody”. I tutaj również Autor odbiega od powszechnie przyjętych zasad w tym zakresie. Materiałem, który jest przedmiotem badań, jest krew świńska i od szczegółowego opisu jej pozyskania, przechowywania itd. powinien zacząć się ten rozdział. Niestety przez 5 podrozdziałów dane te pozostają dla osoby czytającej tajemnicą i dopiero w podrozdziale 9.6 zamieszczona jest informacja na ten temat. Pozwolę sobie na kilka uwag z tym związanych przedstawić w tym momencie recenzji, gdyż jakość materiału badanego odgrywa podstawową rolę w każdym badaniu. Z opisu wynika, że po przecięciu tętnicy szyjnej zbierano wypływającą krew do zlewki z heparyną. W jaki sposób krew była następnie umieszczana w workach na krew? Co więcej, worki te zawierały cytrynian, czyli heparyna nie była jedynym antykoagulantem stosowanym w tym eksperymencie. Na stronie 145 w dyskusji Autor powołuje się na normę ISO 10993-4, która zaleca pobieranie krwi do badań nad biomateriałami bezpośrednio przez kaniulę wewnątrznaczyniową. Tu również używa eufemizmu, że materiał „był transferowany” (proszę zatem o wyjaśnienie, co robiono z krwią, żeby znalazła się w worku?) do worka z antykoagulantem i sam przyznaje, że powodowało to dodatkową traumatyzację krwi. Szkoda, że nie pozyskano krwi do badań od świń (ewentualnie owiec) hodowanych w zwierzętarniach, co jak stwierdza sam autor pozwoliłoby na uzyskanie bardziej rzetelnych i precyzyjnych wyników, poza tym można założyć, że zwierzę mogłoby być wielokrotnym dawcą. W końcowym akapicie podrozdziału 9.6 jest informacja, że

parametry krwi (wymienione) były badane każdorazowo przed rozpoczęciem eksperymentu. Czyli kiedy? Przed nacięciem tętnicy, po zebraniu krwi w zlewce, po „przetansferowaniu do worka”, po przetransportowaniu do laboratorium? Z opisu wynika, że dawcami krwi były wyłącznie samice i chciałam zapytać, czy było to celowe, a jeśli tak, to co było powodem takiego wyboru. Na ogół w większości badań na zwierzętach preferowane są samce dla uniknięcia wpływu cyklu rujowego.

Kolejny podrozdział 9.7 dotyczy bakteryjnej celulozy. Opisany sposób wytwarzania bakteryjnej nanocelulozy nie był celem pracy i cały ten podrozdział powinien być zastąpiony informacją, że BNC użyta w niniejszym badaniu pochodziła od firmy Bowil Biotech sp.z o.o., współwykonawcy projektu i właściciela licznych patentów dotyczących wytwarzania BNC, w tym patentu, którego współwłaścicielami są wykonawcy projektu „Kardio BNC”, czyli również Uniwersytet Gdański. Doktorant nie uczestniczył przecież w wytwarzaniu BNC, której używał w swojej pracy, zatem nie jest zobowiązany do uwzględnienia tych szczegółów w opisie badań. Nawiasem mówiąc, w tym podrozdziale nie ma konkretnych informacji dotyczących wytwarzania BNC (jak rozumiem są chronione patentem), a jedynie ogólny opis, będący zresztą w znacznej mierze powtórzeniem informacji dotyczących BNC, które zostały już kilkakrotnie podane we wcześniejszych fragmentach dysertacji.

Teraz należy się cofnąć do analizy metod wykorzystanych do oceny potencjału hemolitycznego badanej BNC, czyli podrozdziałów 9.1 i 9.2. Użyto w tym celu dwu modeli z wymuszonym przepływem krwi, a mianowicie systemu do pozaustrojowej symulacji krążenia firmy Chalice podłączonego do pompy LVAD oraz pętli Chandlera. W pierwszym przypadku Autor przedstawił na rycinie 24 czytelny schemat układu doświadczalnego, na którym zaznaczono miejsce umieszczenia próbki BNC. W latach 2014-2015 zostało przeprowadzonych łącznie 12 doświadczeń, z których połowę stanowiły badania eksperymentalne, a połowę kontrolne. Na potrzeby niniejszej pracy próbki krwi do badań były pobierane przez specjalny port w instalacji, lecz nie wiadomo jaka była ich objętość. W badanych próbkach oznaczano **cztery** parametry, a mianowicie stężenie hemoglobiny (Hb),

stężenie wolnej hemoglobiny (fHb), hematokryt i aktywowany czas krzepnięcia (ACT). Analizy dokonano klasycznymi, powszechnie stosowanymi od lat metodami jak choćby metoda Drabkina dla oznaczania hemoglobiny wolnej i całkowitej. Dlatego też podawanie szczegółowego opisu metody w tym przypadku, moim zdaniem, nie ma sensu, tym bardziej, że nie opisano metod pozostałych oznaczeń (hematokryt i ACT).

Druga część eksperymentu została przeprowadzona w okresie od maja do sierpnia 2017, czyli dwa lata po pierwszym etapie i przeprowadzono łącznie 10 prób (10 kontrolnych i 10 eksperymentalnych). Nie bardzo rozumiem stwierdzenie, że to zasoby zadecydowały o liczbie wykonanych serii. Autor wspomniał, że pętle Chandlera konstruowane były z nadmiarowych drenów z firmy Chalice, ale jest to duże ograniczenie autorów w planowaniu eksperymentów. Moje zastrzeżenie nie jest bezzasadne, gdyż na stronie 129 w dyskusji Autor ujawnia, że w niektórych pętlach wytworzyła się piana i doszło do przepływu burzliwego, który skutkowało zwiększeniem hemolizy prowadzącym do wzrostu fHb. Czyli w tych próbkach warunki eksperymentu (prawdopodobnie na skutek zbyt grubego skrawka BNC) okazały się inne, bo zaistniał nowy czynnik prohemolityczny. Tego typu niespodzianek można uniknąć, wykonując eksperymenty pilotowe, co nie miało miejsca. Doświadczony badacz wie, że rzadko eksperyment przebiega całkowicie bez zakłóceń i zgodnie z danymi literaturowymi. W przypadku próbek krwi z pętli Chandlera, mimo że w metodyce zakładano zbadanie stężenia Hb, stężenia fHb i hematokryt, finalnie analizowano tylko fHb. Szkoda, że nie pokuszono się o analizę wieloczynnikową, choć byłoby to utrudnione ze względu na małą liczbę badań.

Wracając do materiałów i metodyki rozdział ten napisany jest, jak wspomniałam, w sposób chaotyczny i sprawia wrażenie, jakby Autor nie wzorował się na rozprawach sporządzonych zgodnie z zasadami. Może to zresztą świadczyć na jego korzyść, będąc dowodem niezależności. Widać Panowie Promotorzy byli podobnego zdania. W rozdziale tym znajdują się fotografie, z których jedne, jak 23, 25, 31 i 32 mają swoje uzasadnienie, bo prezentują bardzo specyficzne systemy badawcze, lecz pozostałe to zdjęcia powszechnie używanej aparatury, jak wirówka

hematokrytowa, spektrofotometr czy worek na krew, co uważam za niepotrzebne, bo każdy student medycyny ma z nimi kontakt w czasie studiów i należy założyć, że recenzent też je widział. W końcowej części metodyki przedstawiono sposoby obliczania Indeksu Hemolizy, Znormalizowanego Indeksu Hemolizy oraz Zmodyfikowanego Indeksu Hemolizy mogących, zdaniem Doktoranta, usprawnić analizę wyników pomiarów rzeczywistych. Przedstawiono także użyte narzędzia statystyczne.

Rozdział 10 „Wyniki” przedstawia w podrozdziale 10.1 wyniki otrzymane w trakcie badań z wykorzystaniem pompy LVAD. Zostały one pokazane w jednej tabeli oraz 12 rycinach dobrej jakości. Poza parametrami sygnalizowanymi w metodyce pod koniec omawiania wyników nagle pojawia się nowa wartość, a mianowicie czas trwania badania. Analiza ta jest jak najbardziej zasadna, bo kryterium przerwania badania był ACT powyżej 200 s. Czyli spadek do wartości ACT poniżej tej wartości kończył eksperyment, świadcząc o dużej tendencji do wykrzepiania. Okazało się jednak, że podobnie jak w przypadku innych parametrów nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną i badaną. Należy jednak pamiętać o potencjalnych własnościach trombogennych BNC. Moim zdaniem jest to bardzo ważna obserwacja, zwłaszcza w związku z planami endowaskularnego jej zastosowania. W metodyce powinno być wskazane, że czas trwania badania również był oceniany. Przecież Autor, mam nadzieję, był tego świadomy przed przystąpieniem do redagowania dysertacji.

W podrozdziale 10.2 w tabeli 8 przedstawiono wyniki fHb w testach opartych na pętli Chandlera. W konkluzji napisano, że w tym modelu BNC nasila hemolizę, co moim zdaniem jest stwierdzeniem obciążonym błędem zważywszy problemy metodyczne. Chyba podobne jest zdanie Autora, gdyż nie odniósł się do tych wyników we wnioskach, natomiast poświęcił in sporo uwagi w dyskusji. Moim zdaniem celowe byłoby powtórzenie tej serii badań ze zwróceniem szczególnej uwagi na morfologię badanej próbki BNC.

Dyskusja licząca 24 strony konfrontuje uzyskane wyniki z danymi literaturowymi, niekiedy bardzo krytycznie jak to miało miejsce w odniesieniu do pętli

Chandlera. Niestety w wielu przypadkach znajdują się w niej informacje, które były już nie raz przedstawione w niniejszej rozprawie. Autor ma bowiem skłonność do wielokrotnego prezentowania tych samych informacji, często w dość nieoczekiwanych miejscach. Sprawia to wrażenie składania tekstu metodą patchwork, czyli wykorzystania fragmentów już wcześniej napisanych na inną okazję.

Odnosząc się do danych literaturowych (Rocha i wsp.2018), w niektórych przypadkach niepotrzebnie opisuje wykonane eksperymenty ze szczegółami, a nawet przedstawia ryciny z cytowanej pracy. Najwyraźniej ma trudność ze zwięzłym posumowaniem analizowanej pracy. Natomiast nie waha się dokonać bardzo pozytywnej samooceny pisząc na stronie 135 o swojej rozprawie doktorskiej: „Cenną wartość dodaną stanowi natomiast analiza obecnego stanu badań hematologicznych *in vitro* oraz przedstawienie przykładów nowatorskiego podejścia do tematyki” a na stronie 149 : „Wartością dodaną do badań nad celulozą było zaprezentowanie dwóch innowacyjnych metod prowadzenia inkubacji dynamicznej”. Właściwie recenzent jest już niepotrzebny.

Pracę kończy podsumowanie i 6 wniosków. Wniosek pierwszy jest pozytywną odpowiedzią na cel pracy, czyli właściwie zamyka sprawę. Autor korzysta jednak z doświadczenia wynikającego z opracowania i zastosowania oryginalnej metodyki i formułuje prawidłowo wnioski 2, 3, 4 i ewentualnie 6. Natomiast wniosek 5 dotyczący sugestii użycia urządzenia Hemobile w żadnym razie nie może być uznany za wynikający z przeprowadzonych badań.

Autor swobodnie porusza się w zagadnieniach związanych z przeprowadzonymi badaniami, co nie jest łatwe, bo oprócz wiedzy biologiczno-medycznej wykazuje się znajomością skomplikowanych zagadnień biotechnologicznych i nie tylko.

Piśmiennictwo liczy 123 pozycje, z których tylko 13 pochodzi z ostatnich 5 lat, a żadna praca nie powstała w latach dwudziestych 21. wieku. Doktorant wykazał się umiejętnością zaplanowania złożonego cyklu eksperymentów i wykorzystania adekwatnych metod do zweryfikowania hipotezy badawczej. Praca ma niewątpliwą wartość potencjalnie aplikacyjną i jak stwierdzono w podsumowaniu:

„stanowi element badań przedklinicznych przed dopuszczeniem do testów klinicznych celulozy produkowanej przez *G. xylinus E₂₅*”, z czym zgadzam się w całej rozciągłości. Podsumowując pragnę stwierdzić, że mimo kilku uwag krytycznych uważam, że Magister Jabłoński wykazał się umiejętnością postawienia interesujących hipotez badawczych o znacznym potencjale aplikacyjnym oraz zorganizowania i wykonania badań pozwalających na ich weryfikację. Potrafi także w sposób właściwy oceniać i interpretować uzyskane przez swój zespół badawczy wyniki oraz wyciągać i formułować adekwatne wnioski.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do oceny rozprawa mgr Grzegorza Jabłońskiego pod tytułem „Badanie *in vitro* potencjału hemolitycznego bakteryjnej nanocelulozy ” spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14marca 2003 r.o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr65. poz. 595 z późn. zm. w zw .z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018) i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana mgr Grzegorza Jabłońskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med.

Joanna Lewin-Kowalik

