



rozprawy doktorskiej pt. „*Ocena aktywności transdukcyjnej rekombinowanych wektorów wirusowych związanych z adenowirusami (rAAV) ex vivo*”, wykonanej przez Panią mgr Helenę Poławską, pod kierunkiem Promotora – Pana prof. dr hab. n. farm. Macieja Małeckiego.

Przeszczep serca aktualnie reprezentuje zabieg podejmowany z wyboru w przypadku zaburzenia czynności mięśnia sercowego, cechującego się ciężkim nasileniem oraz – nieodwracalnym charakterem uszkodzeń omawianego narządu. Zauważyć należy, iż wspomniane postępowanie, uwzględniając istotne ograniczenia wynikające z konieczności wdrożenia postępowania immunosupresyjnego, umożliwia osobie chorej – uskarżającej się na krańcową niewydolność krążeniową – ponowne podejmowanie aktywności fizycznej, aktywności społecznej czy też tej związanej z wykonywaną profesją, prolongując istotnie okres przeżycia (po wdrożeniu procedury zabiegowej) do blisko 15 lat. Pomimo zaś licznych i niewątpliwych sukcesów w sferze polskiej transplantologii i kardiologii e.g.: – przeprowadzenie 101 przeszczepów narządu przez Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu w minionym roku; skuteczną realizację transplantacji serca u chorego w Polsce, z zaznaczeniem pobrania narządu poza granicami Rzeczypospolitej; efektywne przeprowadzenie po 2 dekadach „oczekiwania” symultanicznej (trwającej kilkanaście godzin i cechującej się nierozdzielaniem pobieranych organów) transplantacji, serca i płuc u dwojga chorych – nie należy pomijać danych wysoce niepokojących, cechujących się wybitnie negatywnym wydźwiękiem/przekazem. I tak, zgodnie z informacjami sygnowanymi przez Najwyższą Izbę Kontroli wraz z końcem roku 2020-ego: – transplantacji serca wymagało 415 chorych; czas oczekiwania na transplantację przedmiotowego narządu wynosił ponad 600 dni (trybie pilnym osiągał liczbę blisko 100 dni). Uwzględniając zaś, wydłużanie okresu oczekiwania na transplantację serca, strategię doświadczalną odnoszącą się do wspomnianego przedziału czasowego – w tym także opracowana i wdrożona przez Doktorantkę Panią mgr Helenę Poławską, pod kierunkiem Promotora – Pana prof. dr hab. n. farm. Macieja Małeckiego, ścieżka badawcza obejmująca zaprojektowanie i ocenę technologii transdukcji rekombinowanych wirusów związanych z adenowirusami do tkanki mięśnia sercowego, odpowiadająca „okresowi” pomiędzy pobraniem organu od dawcy a przeszczepem serca pacjentowi, cechuje się zgodnością z problematyką naukową Jednostki kierowanej przez Pana Profesora Macieja Małeckiego oraz – kompatybilnością z aktualnym stanem wiedzy i kierunkiem rozwoju nauk farmaceutycznych i nauk o zdrowiu. Oceniany manuskrypt rozprawy liczy 100 strony tekstu wraz z piśmiennictwem, cechując się typowym rozplanowaniem rozdziałów oraz zachowaniem optymalnych, wzajemnych proporcji pomiędzy kolejnymi fragmentami dysertacji. Przedmiotowe opracowanie uwzględnia 21 tabel, 31 rycin i 28 wykresów.

Autorka pracy pierwszą część rozdziału „1. Wstęp” poświęca charakterystyce wskazań i przeciwwskazań do transplantacji serca, doboru dawcy czy techniki procedury operacyjnej – nie pomijając zagadnień pobrania serca od dawcy i wycięcia nieprawidłowo funkcjonującego narządu u biorcy. W dalszej części rozdziału Autorka przedstawia

wyczerpujące informacje na temat transplantacji organu od dawcy narządu do osoby ów narząd przyjmującej. W kolejnych podrozdziałach „1. Wstępu” Doktorantka opisuje wykorzystywane w praktyce około-transplantacyjnej płyny kardioplegiczne oraz implementację produktów leczniczych, w których funkcję aktywnej substancji czynnej pełni rekombinowany kwas nukleinowy. Ostatnią część rozdziału „1. Wstępu” poświęca Doktorantka omówieniu kluczowych wątków naukowych dedykowanych wirusom zależnym od adenowirusów, opisując m.in. następstwa zmienności struktury białkowej kapsydów oraz składu reszt aminokwasowych w odniesieniu do powinowactwa serotypów AAV względem komórek, tkanek, narządów nie pomijając przy tym sfery angiogenezy czy „materii” antyangiogenezy.

W kolejnym rozdziale „2. Cele pracy” Doktorantka jasno zdefiniowała wiodące/nadrzędne zagadnienie badawcze, formułując przy tym umożliwiające jego (nadrzędnego zagadnienia badawczego) realizację, trzy główne zadania doświadczalne. Pani magister postanowiła: – oszacować stabilność przedmiotowego wektora (rAAV/LacZ), w precyzyjnie określonych warunkach temperaturach (37°C, 4°C, -20°C, -80°C), nie pomijając oceny wpływu rozmrażania oraz zamrażania; – zaprojektować procedurę transdukcji; – ocenić przydatność wybranego płynu kardioplegicznego Custodiol w przebiegu implementacji opracowanego algorytmu transdukcji wektorem rAAV. Pragnę zaznaczyć, iż realizacja części eksperymentalnej wymagała znaczącej wiedzy i praktycznych zdolności, uzyskanych przez Doktorantkę w następstwie współpracy z Panem Profesorem Maciejem Małeckim, którego dokonania w sferze tematyki ocenianej dysertacji zasługują na powszechne uznanie. Fachowe opisy implementowanych – w przebiegu doświadczeń – materiału biologicznego, odczynników, zestawów laboratoryjnych, oligonukleotydów, płynu kardioplegicznego sprzętu laboratoryjnego oraz technik/metod naukowo-badawczych [ocena stabilności wektora rAAV/LacZ; wykonanie reakcja DNAzowania, realizacja transdukcji wektorem wirusowym w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanem, przeprowadzenie transdukcji wektora wirusowego w zastosowanym płynie kardioplegicznym, wdrożenie łańcuchowej reakcji polimerazy (w tym także w czasie rzeczywistym), zastosowanie elektroforezy w żelu agarozowym, oceny aktywności dehydrogenazy mleczowej, izolowanie DNA, opracowanie krzywej plazmidowej, implementacja technik statystycznych w tym m.in. ANCOVA, test Spearman’a, jednoczynnikowa analiza wariancji] jak i warunków realizacji eksperymentów przedstawiła Pani magister w rzetelnie opracowanych rozdziałach „3. Materiały” oraz odpowiednio – „4. Metody”. Rezultaty doświadczalnych dokonań Doktorantka wyczerpująco omówiła oraz zaprezentowała posiłkując się 6 tabelami, 26 rycinami czy 28 wykresami, których umieszczenie w manuskrypcie dysertacji istotnie ułatwiło lekturę omawianej części rozprawy. Treść przedmiotowego fragmentu dowodzi, pełnej realizacji celów pracy. Pani magister wykazała/zaobserwowała m.in. iż: – zmniejszenie miana wektora determinować może wybrany płyn kardioplegiczny; – wektor rAAV cechuje się trwałością w warunkach temperaturowych – tj. 4°C; – w warunkach temperaturowych tj. 37°C występować może redukcja miana omawianego wektora; – przechowywanie wektora w temperaturze -80°C nie modyfikuje miana (w okresie ½ roku) przedmiotowego wektora; – efektywność opracowanej metody „przenoszenia materiału

genetycznego”, w oparciu o implementację transdukcji serc myszy za pomocą wektora rAAV2/LacZ; – zależność aktywności dehydrogenazy mleczanowej od przedziału czasowego opisującego procedurę inkubacji.

Rzetelnej i opartej na faktach naukowych ewaluacji i interpretacji rezultatów poczyniań naukowo-badawczych dokonała Autorka rozprawy odpowiednio w rozdziałach „7. Podsumowanie wyników” oraz „8. Dyskusja”. Ten zwłaszcza rozdział dysertacji jednoznacznie potwierdza wiedzę Pani magister w przedmiotowym zakresie zagadnień naukowych, stanowiących główną sferę Jej dociekań badawczych oraz zdolności bezstronnego oszacowania uzyskanych wyników, zważywszy ograniczoną „dawkę” porównywalnych doniesień literaturowych, nawiązujących do precyzyjnie zaprojektowanej i wdrożonej z powodzeniem innowacyjnej materii eksperymentalnej.

Konkluzje zaproponowane przez Autorkę rozprawy korespondują jednoznacznie zarówno nadrzędnym celem pracy („Celem projektu badawczego”) oraz – z wybranymi dla jego (nadrzędnego celu pracy) realizacji trzema – wymagającymi nie tylko konsekwencji, ale i wiedzy, i umiejętności praktycznych – zadaniami badawczymi (określonych przez Panią mianem „Cele pracy”).

Piśmiennictwo, liczące 137 pozycji, zostało rzetelnie wykorzystane w manuskrypcie rozprawy pracy.

Z obowiązku recenzenta pozwalam sobie wskazać elementów, które należałoby uwzględnić przy przygotowywaniu manuskryptu do druku:

1. Autorka posługuje się nie w pełni „fortunnymi sformułowaniami” e.g.:

- „Gdy znamy stężenie plazmidu $2,5 \times 10^{11}$ na $1\mu\text{g}$ uzyskujemy przykładowo” (wers nr 13, str. 43);
- „mianem wektora rAAV/LacZ wprowadzanym, a otrzymanym w rozdziale 5.2, 5.3, 5.4, 5.5,” (wers nr 8/9str. 44)
- prób rozcieńczonych badanych (wers nr 12/13, str. 45)

2. Należy podkreślić brak przekonywującego – w manuskrypcie pracy – uzasadnienia/ wyjaśnienia następujących wyborów:

- wybór gatunku zwierząt (myszy Balb/c), od których pozyskiwano serca;
- wybór płynu kardioplegicznego (Custodiol);
- wybór warunków temperaturowych (37°C , 4°C , -20°C , -80°C);
- wybór metod statystycznych (podrozdział „4.7. Wykorzystane testy statystyczne”);

3. W podrozdziale „materiał biologiczny” nie dostrzegłem informacji nt. wieku i masy ciał zwierząt, od których pobierano serca;

4. Autorka rozprawy nie omawia ograniczeń strategii badawczej leżącej u podstaw niniejszej rozprawy doktorskiej;
5. Wnioski powinny cechować się klarownym przekazem tymczasem konkluzje nr 2), nr 3) oraz nr 6) cechują się niejednoznacznością wymową;
6. Wnioski ponadto powinny cechować się charakterem uogólnień – konkluzje nr 1) wydają się zawierać powtórzenie wyników badań;
7. Całokształt dokonań Autorki rozprawy potwierdza jednoznacznie jej rozległą wiedzę teoretyczną oraz zawansowane umiejętności laboratoryjne, co nie zwalnia jednak Doktorantki z dbałości o jasność przekazu naukowego „umiarkowanie” zaniedbanego w odniesieniu do wybranych sentencji rozdziału „8. Dyskusja” i.e.:
 - „W efektywności transdukcji kardiomiocytów wpływ ma również metoda dostarczania wektora. W pracy przeprowadzono optymalizację transdukcji ex vivo, przedstawiono efektywność transdukcji wektorem AAV w porównaniu w dwóch płynach PBS i Custodiolu. Porównano transdukcję serca myszy ex vivo ww. płynach, uzyskano cenną informację o efektywniejszej infekcyjności rAAV w Custodiolu. Wyniki mogą wynikać z charakteru płynu kardioplegicznego, którego celem jest ochrona narządu przed wpływem starzenia się serca.” (Str. 82) – względem do przytoczonego fragmentu należy wskazać błąd odniesień literaturowych;
 - „W wykorzystanie w toku pracy badania transdukcji ex vivo wektora AAV na sercu mysim znajdują się w aktualnym nurcie poszukiwań rozwiązań leczenia pacjentów kardiologicznych, W przyszłości wskazane jest wprowadzenie wektora AAV np. z genem VEGF w formie różnych serotypów.” – analogicznie należy podkreślić nieobecność odniesień literaturowych;
8. Autorka pracy niejednokrotnie unika stosowania powszechnie przyjętego zwyczaju, zgodnie z którym celem zakończenia myśli (zdania) należy zastosować kropkę i.e. wers nr 22 (str. 76) w rozdziale „8. Dyskusja” oraz wers nr 2 (str. 77) w rozdziale „8. Dyskusja”. Innym razem (być może celem uzupełnienia) stosuje dwie kropki jednocześnie t.j. wers nr 6 (str. 77) wers nr 19 (str. 84), w rozdziale „8. Dyskusja”
9. Wskazać należy pewną niekonsekwencję z opracowaniu cytowanej literatury czego wyraz może stanowić unikalne opracowanie cytowania publikacji, której przypisano nr [70]

jest:

B.A.F.D.P.J.Z.H.L.W.L.M.J.C.B.R.B.S.A.-M.M.B.S.CrossonSM, "Effects of Altering HSPG Binding and Capsid Hydrophilicity on Retinal Transduction by AAV," J Virol., pp. 95(10):e02440-20., 2021. „

powinno być:

Crosson SM, Bennett A, Fajardo D, Peterson JJ, Zhang H, Li W, Leahy MT, Jennings CK, Boyd RF, Boye SL, Agbandje-McKenna M, Boye SE. Effects of Altering HSPG Binding and Capsid Hydrophilicity on Retinal Transduction by AAV. J Virol, pp. 95(10):e02440-20., 2021.

10. Niekiedy autorka cytując publikację wymienia wszystkich (13) współautorów pozycja nr 65; innym razem Doktorantka wybiera 2 współautorów spośród 10 pozycja nr 23 Cytując Ustawy (pozycje w spisie piśmiennictwa nr [56] oraz nr [58]) – należy każdorazowo cytowanie uzupełnić należy o precyzyjne informacje dotyczące dziennika ustaw:

- Powinno być odnośnie pozycji nr 56 „Dz.U.2023.1516 t.j. z dnia 2023.08.04”

- Powinno być odnośnie pozycji nr 58 „Dz.U.2022.2301 t.j. z dnia 2022.11.14”

Reasumując stwierdzam, iż praca Pani mgr Heleny Poławskiej, nosząca tytuł: „Ocena aktywności transdukcyjnej rekombinowanych wektorów wirusowych związanych z adenowirusami (rAAV) ex vivo”, w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789).

Wnosi innowacyjne dane do wiedzy fachowej i materii naukowej stanowiąc przedmiot niniejszej dysertacji świadcząc o dużej wiedzy Autorki dysertacji, jej praktycznych umiejętnościach dotyczących różnorodnych technik eksperymentalnych.

Z pełnym zatem przekonaniem przedkładam Panu profesorowi Grzegorzowi Natęcz-Jaweckiemu – Przewodniczącemu Rady jak i Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Heleny Poławskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


prof. dr hab. n. farm. Paweł Olczyk

Sosnowiec, 07.09. 2023 r.

