

Prof. dr hab. Wojciech Piątkiewicz

Instytut Technologii Eksploatacji – Państwowy Instytut Badawczy

26-600 Radom

Ul. Pułaskiego 6/10

e-mail: w.piatkiewicz@ichip.pw.edu.pl

w.piatkiewicz@polymemtech.pl

Warszawa 16.01.2017

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Mazurkiewicz-Pisarek pt.:

„Biotechnologiczna metoda otrzymywania rekombinowanego VIII ludzkiego czynnika krzepnięcia krwi”

Promotor rozprawy: Prof. nzw. Dr hab. Tomasz Ciach

Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera 138 stron tekstu zasadniczego, 10 i 1/3 strony spisu przywołanej literatury (142 pozycje), 4 strony wykazu załączonych rysunków, 1,5 strony wykazu załączonych Tabel i ok. 1/3 strony wykazu ilustracji w postaci fotografii. Praca zawiera także 14 stron Załączników (3 Załączniki)

WSTĘP

W rozdziale „Wstęp” Autorka w sposób zwięzły, klarowny, ale niezmiernie skrótowy opisuje problem, z jakim chce się zmierzyć. Rozwinięcie tej problematyki znajduje się w rozdziale drugim „Geneza i uzasadnienie wyboru tematu” W rozdziale trzecim „Cel, zakres i tezy pracy” Autorka definiuje zarówno „Cele pracy” jak i jej „Tezy”.

Moja uwaga w tym punkcie dotyczy słowa „Tezy”- Teza to **coś** co należy dowieść. Bardziej odpowiada mi słowo „Hipoteza”. Hipoteza to **coś** co należy potwierdzić, ale nie dowieść. Zgodnie ze znanym powiedzeniem, dowolna ilość

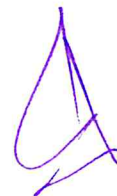


pozytywnych wyników nie udowadnia tezy, zaś jeden negatywny ją obala. Bez wątpienie, przedstawiona metodyka badań oraz uzyskane wyniki potwierdzają, że w określonych warunkach można pozyskać substancję wykazującą własności podobne do własności Faktora VIII, ale wg mnie nie udowodniła tego. Nie mniej, w mojej ocenie jest to istotny krok do przodu - krok, który otwiera olbrzymie, nie do przecenienia potencjalne możliwości na przyszłość. Powyższa uwaga odnosząca się do zastosowanego terminu „Teza” ma tylko charakter porządkowy, ponieważ coraz częściej Hipotezie przypisuje się znaczenie Tezy. Konkludując uważam, że Autorka potwierdziła zdefiniowane w swojej pracy hipotezy tj.:

1. Możliwe jest wklonowanie ludzkiego genu czynnika VIII krzepnięcia krwi do prokariotycznego wektora ekspresyjnego.
2. Możliwe jest uzyskanie ekspresji ludzkiego genu kodującego czynnika VIII krzepnięcia krwi w prokariotycznym systemie ekspresyjnym.
3. Możliwe jest uzyskanie aktywnego białka czynnika VIII krzepnięcia krwi w prokariotycznym systemie ekspresyjnym.

Na marginesie niniejszej recenzji pojawia się pytanie poboczne, ale nie mniej istotne z punktu widzenia semantyki słowa „wektor”. Wektor to termin matematyczny i jest to wielkość charakteryzująca się, modułem, kierunkiem i zwrotem. Te dwie ostatnie cechy związane są z przyjętym układem odniesienia. O ile stosowane pojęcie wektora jest dla mnie jasne w zakresie modułu (wartości) to cechy kierunku i zwrotu mogą nasuwać wątpliwości, o ile w sposób jednoznaczny nie zostanie określony układ odniesienia. Zatem proszę o wyjaśnienie, jak ten termin źródłowy (rodowód matematyczny) odnosi się do terminu „Wektor” stosowanego w dysertacji tzn. co jest modułem, co reprezentuje kierunek a co zwrot ?

W Rozdziale „Geneza i uzasadnienie wyboru tematu” Autorka w sposób drobiazgowy opisuje potencjalne ryzyka związane ze stosowaniem (terapia substytucyjna) pozyskiwanego w sposób laboratoryjny/przemysłowy VIII czynnika krzepliwości krwi za pomocą obecnie dostępnych technologii. To bardzo ważny aspekt uzasadniający podjęcie tematyki opracowania technologii/metody pozyskiwania czynnika VIII krzepliwości wykorzystując do tego celu jako surowiec podstawowy bakterie. *Nasuwa się zatem pytanie, jak może wyglądać analiza **potencjalnego** ryzyka (Risk Assestment) w przypadku długookresowego stosowania „VIII czynnika krzepliwości krwi” pozyskanego przy pomocy proponowanej technologii.*



W rozdziale 3.1 Autorka opisuje budowę VIII czynnika krzepliwości krwi w jego naturalnej postaci. Jak wynika z tego opisu jest różnica pomiędzy budową naturalnego VIII czynnika krzepliwości krwi a jego substytutami pozyskiwanym metodami inżynierii genetycznej. Na stronie 24 Autorka konstatuje „ Wytworzenie czynnika VIII pozbawionego domeny B stanowi przykład , w jaki sposób inżynieria genetyczna może „udoskonalić naturę””. Nasuwają mi się tu dwa pytania:

1. *Czy właściwym jest nazywanie substytutu VIII czynnika krzepliwości w takim wyrażeniu jak oryginał. Autorka sama podkreśla istniejącą różnicę w strukturze oryginału i substytutu.*
2. *Czy tzw. „udoskonalenie natury” nie może sugerować negatywnych konsekwencji w dłuższej perspektywie czasowej. Autorka słusznie podkreśla, że „Funkcja domeny B, która stanowi 40% masy FVIII, nie jest dokładnie poznana” Czy nie jest to wystarczającą przesłanką do przeprowadzenia analizy ryzyka chociażby w postaci szkicowej ?*

Na stronie 25 Autorka w sposób klarowny, jasny, logiczny, ale skondensowany formułuje uzasadnienie podjęcia swoich badań w kierunku metody/technologii pozyskania rekombinowanego czynnika VIII krzepnięcia krwi w tańszym, prokariotycznym systemie ekspresyjnym stwierdzając:

„Kolejny krok w rozwoju leczenia hemofilii stanowi uzyskanie rekombinowanego czynnika VIII krzepnięcia krwi w tańszym, prokariotycznym systemie ekspresyjnym. Pozwoli to na znaczne obniżenie kosztów produkcji, skrócenia czasu wytwarzania takich preparatów, większą dostępność produktu, ale przede wszystkim na wyeliminowanie ryzyka zakażenia pacjenta” Stwierdzenie bardzo prawdziwe, ale naukowe podejście do tak sformułowanego problemu powinno jednocześnie przynajmniej zwrócić uwagę na ewentualne zagrożenia tzn. jak już wspomniano uprzednio przeprowadzić chociażby uproszczoną analizę potencjalnie możliwych „ryzyk”.

Każdy proces, a w szczególności proces wytwarzania określonych substancji jest obarczony problemem czystości produktu. Jeżeli tak, to nasuwa się pytania, jak potencjalne możliwe zanieczyszczenia mogą wpłynąć na bezpieczeństwo stosowania preparatu. Historia zna znaczną ilość takiego niedoszacowania możliwych „ryzyk” (uboczne skutki stosowania streptomycyny w początkowym etapie technologii produkcji, TALIDOMID i obecność enancjomerów substancji czynnej i inne). Niniejsza uwaga nie ma

na celu w jakikolwiek sposób dyskredytacji zarówno genialnej koncepcji pozyskania VIII czynnika krzepliwo, jak bardzo udanej próby potwierdzenia założonej hipotezy, że jest to możliwe. Celem niniejszego komentarza jest zwrócenia uwagi, że przy opracowywaniu nowych metod, technologii konieczne jest zawsze wzięcie pod uwagę potencjalnie możliwych do określenia ujemnych skutków opracowania. Taki bilans nawet w przypadku znacznych „ryzyk” nie oznacza, że nie należy podjąć prac badawczych. Taki bilans jest niezwykle pomocny przy opracowywaniu technologii wytwarzania w większej skali – Autorka jako istotną zaletę tej metody/sposobu wskazuje właśnie ten czynnik (taniać metody, zwiększona dostępność, zmniejszenie ryzyka zarażenia).

Kolejna moja uwaga dotyczy równania (brak numeru) opisującego szybkość wzrostu biomasy przy wykorzystaniu charakterystycznej szybkości wzrostu. Autorka odwołuje przy tym do publikacji Prof. Bałdygi i współautorów z 2000r. W moim przekonaniu zapis ten jest konfudujący:

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dT} = \frac{1}{X} r_x = \mu(X, S) \quad (A)$$

Gdzie:

X - stężenie biomasy wyrażone np. w kg/m^3

Tak naprawdę omawiane równanie to równanie Monoda (Monod, 1979).

Jego oryginalna forma to:

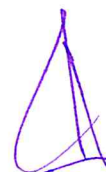
$$\frac{dX}{dt} = X\mu \quad (B)$$

Gdzie:

μ – nosi nazwę specyficznej prędkości wzrostu [$1/\text{s}$]

W mojej ocenie zapis równania przedstawiony w rozprawie jest niepoprawny. Biorąc pod uwagę powyższe oraz komentarz do tego równania zamieszczony w rozprawie, popełniony błąd odnoszę raczej do błędu drukarskiego a nie merytorycznego. Byłbym wdzięczny za wyjaśnienie tych wątpliwości.

Na stronie 40 w drugim akapicie od góry Autorka konstatuje, że sprawa kluczową w hodowli reaktorowej jest między innymi odprowadzenie ciepła wydzielanego podczas procesu – ciekawe, jaką mocą charakteryzuje się proces realizowany przez Autorkę.



PODSUMOWANIE

W pewnym uproszczeniu przedstawiona do recenzji rozprawa traktuje na temat możliwości pozyskania VIII czynnika krzepliwości krwi metodami inżynierii genetycznej wykorzystując do tego fragmenty białka pozyskanego z hodowli bakteryjnej. Olbrzymia siłą tej rozprawy jest sam pomysł /koncepcja takiego podejścia (gratulacje). Nie zależnie czy uznamy, że Autorka rozwiązała problem czy nie (wg mnie to tylko przyczynek) to wątpliwości, że zarówno sama koncepcja jak i proponowana metodologia (technologia) to olbrzymi krok do przodu w głębszym poznaniu mechanizmu krzepnięcia krwi jak i propozycji przyszłościowego rozwiązania problemu hemofilii. Praca bez wątpliwości ma charakter eksperymentalny, aczkolwiek sam pomysł to wynik głębokiej analizy teoretycznej opartej na wiedzy zarówno na problematyce krzepliwości krwi jak na możliwościach inżynierii genetycznej.

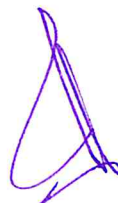
Autorka wsparła swoje rozważania bardzo dobrze dobraną literaturą. Zarówno wprowadzenie do zagadnienia, jak i rozeznanie w problematyce, a także potrzebach współczesnej hematologii świadczą o tym, że Autorka doskonale orientuje się w tej tematyce. Jedyne moje zastrzeżenie dotyczy stosunkowo ubożego wsparcia się literaturą w obszarze bioreaktorów. Powołanie się na pozycję Prof. Z. Bałdygi i współautorów wydaje się niewystarczające (w literaturze krajowej dostępne są także inne pozycje: *Anna Trusek-Holownia, Membrane Bioreactors- Models for Bioprocess Design, Balaban Desalination Publication, 2011* czy też starsza pozycja – *U.E Viesturs, A.M. Kuzniecowa, W.W. Sawienkow, Bioreaktory -zasady obliczeń i doboru, WNT Warszawa 1990*). Ta uwaga ma charakter czysto formalny, ponieważ opis działania i doboru bioreaktora to tylko pośrednio wspomagający aspekt niniejszej rozprawy.

Autorka bardzo czytelnie i jasno sformułowała metodykę (koncepcję) skonstruowania VIII czynnika krzepliwości z bakterii wykorzystując do tego techniki inżynierii genetycznej. Sformułowała tezy pracy (wg mnie to raczej hipotezy – uzasadnienie w tekście) i w sposób doświadczalny potwierdziła możliwość realizacji celu. Nie ulega wątpliwości, że dalsze i bardzo pogłębione badania są konieczne, ale pierwszy fundamentalny krok został poczyniony. Ten pierwszy i przełomowy zarówno w aspekcie pomysłu, jak i metodyki to główny atut tej pracy. Autorka w sposób bardzo konsekwentny dąży do potwierdzenia hipotezy o możliwości pozyskania VIII czynnika krzepliwości krwi wykorzystując do tego celu białka bakterii. Autorka uzyskuje wynik pozytywny, nie mniej nie zwraca uwagi, czy materiał w postaci pozyskanej będzie mógł, zarówno w

sferze teoretycznej jak i w praktyce być wykorzystany do celu jakiego ma służyć. Inaczej mówiąc nie próbuje Ona nawet przeprowadzić chociażby bardzo pobieżnej analizy możliwych „ryzyk” (Risk Assessment). Taka analiza byłaby bardzo przydatna i znakomicie podniosła by walor aplikacyjny wykonanej pracy. Nie mniej postawione na we wstępie Tezy (Hipotezy) nie obligują Autorkę do tego, a sam pomysł już sam w sobie jest na tyle przełomowy, że w mojej ocenie te zastrzeżenie usuwa daleko na dalszy plan.

Praca zawiera kilka niedoróbek redakcyjnych i formalnych. I tak w zakresie błędów formalnych (nie mających najmniejszego wpływu na uzyskane wyniki wpływające z nich wnioski) to mylenie funkcji wykładniczej z funkcją potęgową (Przykład: str. 130, Rys 6.44 przedstawiona na rysunku zależność jest aproksymowana wielomianem potęgowym 5 –tego stopnia a nie wielomianem wykładniczym. Kilka linijek poniżej Autorka odwołuje się do tego eksperymentu i stwierdza, że „zaobserwowano w hodowli wzrost wykładniczy”. I tu kolejna uwaga – Rys 6.44 przedstawia krzywą dopasowaną do 26 punktów wyznaczonych doświadczalnie a ta krzywa z kolei jest aproksymowana wielomianem potęgowym piątego stopnia. Brak jest informacji z jaką dokładnością został wyznaczony poszczególny punkt – np. czy jest to pojedynczy pomiar, czy jest to punkt będący wynikiem odpowiedniej obróbki kilkunastu pomiarowych. Pytanie to ma swoje uzasadnienie w szczególności, gdy porównuje się Rys. 6.44 i Rys. 6.45. Na Rys. 6.45 Autorka uwidoczniła granice dokładności pomiaru poszczególnego punktu pomiarowego a na Rys.6.44 nie. I tu kolejna uwaga (formalna) - nie wiem, jak jest zdefiniowany dopuszczalny błąd pomiaru stężenia glukozy w danym przyrządzie pomiarowym. Na ogół, w przyrządach pomiarowych błąd procentowy to maks. możliwy błąd bezwzględny odniesiony do końca skali. Jeżeli tak, to zakres możliwych błędów (dopuszczalny rozrzut) dla poszczególnych pomiarów zaprezentowanych na Rys. 6.45 powinien być taki sam dla każdego punktu pomiarowego i znacznie większy, bo powinien stanowić 10% od jego zakresu pomiarowego. Wówczas interpretacja intrygującego kształtu zaprezentowanej krzywej była by prawdopodobnie łatwiejsza.

Przykładem niedoróbki redakcyjnej jest to, że na niektórych wykresach jest brak oznaczania jednostek (np. Rys. 6.44, Rys.6.45, 6.46 itp.). Autorka nie podaje w jakich jednostkach jest oznaczony czas, stężenie czy też inne parametry.



WNIOSEK KOŃCOWY

Wymienione w pracy niedociągnięcia, w moim przekonaniu nie umniejszają w żaden sposób merytorycznego sukcesu, którego zasadniczą część odnoszę do samego pomysłu (koncepcji), jak i sposobu potwierdzenia postawionych na początku pracy Hipotez. Autorka wykazała się niebywałą pomysłowością i intuicją badawczą. Moje krytyczne uwagi nie umniejszają wagi naukowego osiągnięcia zaprezentowanego w przedstawionej do oceny Rozprawie Doktorskiej Pani Anny Mazurkiewicz –Pisarek. W tej sytuacji wnioskuję o wyróżnienie pracy, jako wybitnego dzieła i jednocześnie stwierdzam, że w/w rozprawa, w mojej ocenie, spełnia wymogi stawiane odpowiednią ustawą rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN im. Prof. Macieja Nałęcz o jej przyjęcie i dopuszczenia do dalszej obrony.

