



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ
p. lek. med. Hanny Konkołowicz-Wołośko,
pt. „Hemoglobin Based Oxygen Carrier (HBOC) - OxyVita®
Hb: development, current status and future plans
(Hemoglobinopochodny nośnik tlenu – OxyVita® Hb: rozwój,
obecny status i plany przyszłościowe)”

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska **pani lek. med. Hanny Konkołowicz-Wołośko** została wykonana pod kierunkiem Promotora, p. dr hab. Waldemara Grzegorzewskiego, prof. Uniwersytetu Rzeszowskiego. Rozprawa ma formę monografii, która odzwierciedla wiedzę, wieloletnie doświadczenie i pasję naukową. Doktorantki w tematyce badań nad poszukiwaniem substytutu krwi o potencjalnym wykorzystaniu terapeutycznym. Uwieńczeniem takich badań, prowadzonych w skali światowej z udokumentowanym udziałem Doktorantki, jest tytułowy hemoglobinopochodny nośnik tlenu OxyVita® Hb.

Leczenie z wykorzystaniem krwi jest niezwykle ważnym obszarem medycyny, w którym z pewnością najistotniejszym, aczkolwiek nie jedynym, aspektem jest transfuzja krwi, obarczona, jednakże, licznymi ograniczeniami wynikającymi głównie z faktu, że wykorzystuje naturalny „terapeutyk” pochodzący bezpośrednio z ludzkiego organizmu. Z tego powodu transfuzji, która niejednokrotnie jest niezastąpionym zabiegiem ratującym życie, towarzyszy ryzyko wystąpienia licznych powikłań, związanych z przeniesieniem czynników zakaźnych, czy pomyłkami w oznaczeniach grupy krwi. Dodatkowym ograniczeniem jest czas i wysoce sterylne niskotemperaturowe warunki przechowywania i transportu krwi stosowanej w terapii. Ponadto, w związku z postępującym starzeniem się społeczeństwa, globalne zapotrzebowanie na krew rośnie, zaś ilość potencjalnych dawców spada, co niesie groźbę niedoboru krwi w najbliższej przyszłości krwiolecznictwa. W świetle tych danych wdrażany w ostatnich dekadach program Zarządzania Krwią Pacjenta (PBM), jest w stanie tylko częściowo rozwiązywać problemy współczesnego krwiolecznictwa, a więc niezbędne jest poszukiwanie nowych podejść, które umożliwią zastąpienie pożądaných naturalnych składników krwi, sztucznie wyprodukowanymi zamiennikami. Opracowanie preparatu OxyVita®Hb – wielkocząsteczkowego kulistego polimeru uzyskanego z cząsteczek hemoglobiny, jest wspaniałym przykładem skutecznej odpowiedzi na nadmienione kluczowe wyzwanie współczesnej medycyny. Co więcej, z wnikliwej analizy wyników testów biologicznych z użyciem tego preparatu, wynika, że potencjalne wykorzystanie medyczne OxyVita®Hb jako nośnika tlenu znacznie wykracza poza ramy transfuzji i krwiolecznictwa, wskazując m.in. na leczenie zawału i zatrzymania akcji serca, zatruc tlenkiem węgla, utrzymywanie metabolizmu komórkowego w organach *ex vivo* przy transplantacjach i wiele innych. Nadmienić należy, że jest to w chwili obecnej jedyna imitacja naturalnej hemoglobiny, która, jak pisze Doktorantka, „przetwała próbę czasu”, tzn. nie została odrzucona jako nieskuteczna lub

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

niepełniająca bezpieczeństwa w szerokim skriningu testów przedklinicznych i klinicznych.

W tym miejscu chciałabym wyrazić moje słowa największego uznania dla wyboru tak interesującego i wartościowego pod względem naukowym i wdrożeniowym, tematu doktoratu, który niesie świetlane perspektywy dla rozwoju współczesnej medycyny, stwarzając szansę na skuteczniejsze ratowanie życia w nagłych i przewlekłych dolegliwościach. Bardzo trafna jest również decyzja p. Doktorantki, aby przygotować doktorat w formie monografii, która daje znacznie bardziej wszechstronne spojrzenie na ten innowacyjny kierunek medycyny, niż gdyby wybiórczo przedstawiono tylko własne wyniki Doktorantki decydując się na klasyczną formę dysertacji z badań.

Pisząc monografię doktorską, Autorka obrała za cel wszechstronną charakterystykę preparatu OxyVita®Hb: od historii jego otrzymywania, poprzez analizę jego struktury chemicznej, metody syntezy, w tym na skalę produkcyjną, specyfikację, by następnie w oparciu o bogatą literaturę naukową skoncentrowaną głównie na skriningu biologicznym, udowodnić szerokie możliwości medycznego wykorzystania tego niezwykłego polimeru. Cel ten został szczegółowo przedstawiony i uzasadniony na początku dysertacji, a zrealizowany w dalszym toku, w rozważaniach podzielonych na 10 rozdziałów, w listę cytowanej literatury.

We Wprowadzeniu (**rozdział 1**) Autorka przedstawiła historię badań nad poszukiwaniem hemoglobinopodobnych nośników tlenu - rozwój produktów i ich losy w badaniach przedklinicznych i klinicznych, z szczególnym uwzględnieniem głównego bohatera dysertacji - produktu nowej generacji OxyVita, wypuklając niepodważalne, w porównaniu do innych preparatów i naturalnej hemoglobiny, walory struktury chemicznej tego polimeru oraz wykorzystania polimeryzacji „zero-link” do jego otrzymywania. Technologia polimeryzacji „zero-link” umożliwia, bowiem, kontrolę wielkości powstałego polimeru i gwarantuje, że w końcowej cząsteczce będzie obecna wyłącznie hemoglobina. Kontrolowanie wielkości polimeru ma, zaś, kluczowe znaczenie, aby zapobiec jego wyciekaniu z naczyń krwionośnych i uszkodzaniu otaczających tkanek w związku z wychwytem NO, co mogłoby skutkować wzrostem ciśnienia krwi.

Następnie jednostronicowy rozdział „**2. Definitions**” definiuje 4 różne formy handlowe preparatu OxyVita – ich parametry, sposób pakowania i różne formułacje, umożliwiające zróżnicowany sposób podania w celach terapeutycznych. Po nim następuje 15-stronicowy rozdział „**3. Materials and methods**”, w którym przedstawiono metody produkcyjne i analityczne stosowane w technologii przemysłowego otrzymywania i kontroli jakości OxyVita®, a także te wykorzystywane do eksperymentalnej oceny działań polimeru OxyVita®. Rozdział przytacza bogactwo materiałów – związków chemicznych, aparatury i sprzętu, wykorzystywanego do badań nad i z udziałem preparatu OxyVita, a także dokładną procedurę otrzymywania tego

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

polimeru na skalę przemysłową. Mimo bardzo dużej ilości danych czyta się go z przyjemnością, czemu służy przejrzysta kompozycja oraz stosowne ilustracje.

W następującym potem rozdziale „**4. Relationship between OxyVita®’s Physicochemical Properties and its Functional Attributes**” Autorka przedstawia zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi OxyVita® a jej funkcjonalnością. Szczególnie dokładnie wyjaśnia kwestie stabilności konformacyjnej, nawiązując również do 17 innych parametrów fizyko-chemicznych przedstawionych w Tabeli 3.7 w poprzednim rozdziale. Odwołuje się do danych eksperymentalnych charakteryzujących zdolność OxyVita do dostarczania tlenu, a także wpływ na mikrokrążenie mózgowe i przepływ krwi, aktywność koagulacyjną, możliwość wykorzystania w ciężkich krwotokach, leczeniu urazów i w resuscytacji.

Rozdział „**5. Studies with Zero-Linked Polymer/ OxyVita®Published to Date**” jest skrócowym przeglądem danych literaturowych dedykowanych studiom przedklinicznym nad zdolnością przenoszenia tlenu, właściwościami farmakologicznymi i bezpieczeństwem preparatu OxyVita. Autorka odnosi się tu do 27 pozycji literaturowych, w tym 16 opisujących testowanie preparatu w modelach zwierzęcych – głównie z wykorzystaniem kotów i szczurów, a także myszy oraz 7 odwołujących się do modeli *in vitro*. Rozdział jest skonstruowany w formie zwięzłych zestawień danych z krótkimi konkluzjami płynącymi z każdej pracy. Taka forma jest przejrzysta i ułatwia szybki wychwyty potrzebnych informacji.

W kolejnym rozdziale Autorka zdecydowała się bardziej szczegółowo przedstawić wybrane aspekty badań nad preparatem OxyVita w oparciu o dane literaturowe ostatnich 20-lat. W tym rozdziale możemy zaznajomić się między innymi z badaniami nad zdolnością redox preparatu w porównaniu z naturalną hemoglobina, a także wpływem OxyVita® na ciśnienie tętnicze krwi, średnicę tętniczą i dotlenienie tkanek, czy wpływem na mikrokrążenie mózgowe i układowe. Podejmuje następnie ocenę możliwości zastosowania OxyVita® w leczeniu urazowego uszkodzenia mózgu (TBI), wykorzystania tego preparatu do resuscytacji i wstępnego wspomaganie transfuzji w traumatycznym wstrząsie krwotocznym w środowisku bojowym lub urazie pozaszpitalnym w wyniku wypadków. W tym rozdziale przedstawiono również różnorodność wykorzystania farmakologicznego OxyVita w zależności od formulacji – w postaci zawiesiny czy proszkowej.

Kolejny rozdział (7) przedstawia dane z trwających badań dotyczących wykorzystania OxyVita jako adjuwanta w leczeniu zawału i zatrzymania akcji serca, a następnie możliwości użycia go do przechowywania organów przy transplantacjach, jego właściwości w przeciwdziałaniu stresowi oksydacyjnemu wywołanemu reaktywnymi formami tlenu czy w zatruciach tlenkiem węgla. Ciekawym wątkiem zamykającym ten rozdział są badania nad immunobezpieczeństwem stosowania OxyVita w modelu zwierzęcym. Wyniki wskazują na silną odpowiedź przeciwciał w surowicy na wstrzyknięcia polimeru OxyVita®, która nie wydaje się być powiązana z patologią. Ogólna

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

odpowieź immunologiczna może być tu regulowana równowagą pomiędzy sygnałami pro- i przeciwzapalnymi.

Ósmy rozdział monografii jest dedykowany perspektywom przyszłościowego wykorzystania preparatów OxyVita: w terapii niedokrwistości sierpowatokrwinkowej, leczeniu choroby wysokościowej oraz poprawie wydajności prac na dużych wysokościach.

Rozważania zamyka rozdział podsumowujący (9), w którym Autorka zebrała w postaci 24 punktów główne konkluzje badań przeprowadzonych nad preparatem OxyVita®.

Dysertacja została przygotowana w języku angielskim, liczy 184 strony, cechuje ją bogata szata graficzna, na którą składa się: 96 rycin zawierających zdjęcia i schematy oraz 47 Tabel. Autorka odniosła się do 142 pozycji literaturowych, skrupulatnie zestawionych w zamykającym dysertację rozdziale (10). Ponadto w pracy zawarte są streszczenia w języku polskim i angielskim, lista skrótów, spis treści oraz spis elementów graficznych.

Całość przygotowana jest bardzo starannie – znalazłam tylko nieliczne uchybienia redakcyjne, wprowadzające drobne zamieszanie na liście stosowanych skrótów, czyli:

- widnieją dwa skróty dotyczące masy cząsteczkowej (MW i M.wt.) powinien być ustalony jeden
- skrót „ZL-HbBv”, ma z kolei 2 różne objaśnienia: „ZL-HbBv: OxyVita®” i „ZL-HbBv: Zero-Linked Bovine Hemoglobin”

Czytając monografię nasunęło mi się pytanie: **jakie są perspektywy wykorzystania preparatu OxyVita w terapii/prewencji chorób neurodegeneracyjnych np. choroby Alzheimera, biorąc pod uwagę niezaprzeczalny związek ich etiologii ze stresem oksydacyjnym? Czy podjęto do tej pory jakieś badania w tym kierunku i czy w ogóle byłyby celowe?**

Niniejsza praca doktorska świadczy o szerokiej wiedzy, zrozumieniu i doświadczeniu Doktorantki w obszarze tego innowacyjnego i interdyscyplinarnego tematu wpisującego się w nauki biologiczne, chemiczne i medyczne, czyli szeroko rozumianą dziedzinę nauk przyrodniczych i ścisłych. Nadmienić należy, że **p. lek. med. Hanna Konkołowicz-Woźło** jest współautorem 12 publikacji powiązanych z tematyką doktoratu, w tym w 5 w roli pierwszego autora. Ponadto prezentowała tę tematykę na licznych kongresach naukowych w postaci 7 wystąpień ustnych i 15 posterów, kierowała czterema amerykańskimi projektami badawczymi, pełniła i pełni rolę głównego wykonawcy w kilku projektach we współpracy ze studentami i profesorami z *Touro College of Osteopathic Medicine, Middletown* w Nowym Jorku. Przyczyniła się do rozpowszechnienia wiedzy na temat produktu OxyVita poprzez wystąpienia medialne, a także była laureatką dwóch prestiżowych nagród.

Reasumując, poziom i walory naukowe przedstawionej do oceny dysertacji doktorskiej oraz całokształt działalności naukowo-badawczej w pełni

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

upoważniają **p. lek. med. Hannę Konkołowicz-Wołośko** do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne,

Zwracam się, zatem do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie p. lek. med. Hanny Konkołowicz-Wołośko do finalnych etapów przewodu doktorskiego.

W związku z wysokimi wartościami naukowymi i wdrożeniowymi tematu przedstawionego w dysertacji, innowacyjnym pierwiastkiem w poszukiwaniu przełomowych rozwiązań terapeutycznych oraz udokumentowaną szeroką wiedzą i doświadczeniem p. lek. med. Hanny Konkołowicz-Wołośko w badaniach nad preparatem OxyVita, wnioskuję o wyróżnienie tego doktoratu.

Kraków, 11 września 2023

Katedra i Zakład Technologii
i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM

prof. dr hab. inż. *Jadwiga Handzlik*
kierownik



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl