

Prof. dr hab. med. Jarosław Czubak,
Kierownik Kliniki Ortopedii,
Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego
w Otwocku

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Grązki

p.t. „Ocena wpływu sposobu przygotowania i warunków sterylizacji radiacyjnej na wiązania sieciujące w kolagenie kości i radiacyjnie indukowaną degradację kolagenu przeszczepów kości zbitej”

Przedstawiona do oceny 166 stronicowa rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Grązki ma jak to wynika ze spisu treści klasyczny układ odpowiadający tego rodzaju pracom. Składa się z 7-miu zasadniczych rozdziałów oraz spisu piśmiennictwa. Dodatkowo zawiera spis tabel i rycin. Praca powstała w ramach realizacji przez zakład Transplantologii i Centralny Bank Tkanek Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego projektu Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej (IAEA) w latach 2010-2013 dotyczącego bezpieczeństwa i optymalizacji radiacyjnej sterylizacji dla przechowywania tkanek: z uwzględnieniem oceny właściwości funkcjonalnych tkanek. Badania finansowane były również ze środków pozyskanych w ramach subwencji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz środków statutowych przyznanych przez Warszawski Uniwersytet Medyczny. Skala finansowania projektu sama świadczy o jego rozmiarach. Dołączone informacje dotyczące finansowania projektu są moim zdaniem bardzo ważne, gdyż świadczą o wielokrotnej pozytywnej opinii ekspertów na temat poszczególnych etapów podjętych badań.

W tej części znajduje się również informacja na temat zgody Komisji Bioetycznej na podjęcie badań podjętej w 2004 roku.

Temat pracy doktorskiej jest niezwykle celowy. Jako ortopeda muszę nadmienić, że w czasie ostatnich lat nastąpił rozkwit ortopedii i chirurgii urazowej w tym chirurgii urazowej narządu ruchu. Jest on związany przede wszystkim z postępem technologicznym, gdyż dzięki rozwojowi produkcji biomateriałów, możliwym stało się coraz lepsze zastępowanie zużytych powierzchni stawowych przez nowe materiały. Drugim elementem związanym z rozwojem ortopedii i traumatologii narządu ruchu jest

doskonalenie się lekarzy ortopedów w technice implantacji nowoczesnych endoprotez oraz innych materiałów pozwalających osiągnąć główny cel jakim jest maksymalnie odległy dobry wynik tego działania.

Niestety wymienione czynniki nie są jedynymi, które mają wpływ na wczesny i odległy wynik. Niedoskonałości techniczne w pozycjonowaniu implantów, skomplikowane deformacje pierwotne kości, choroby ogólne (cukrzyca), warunki miejscowe (infekcja) istotnie wpływają na trwałość wyniku implantacji czy korekcji. Jednym z następstw niepowodzeń leczenia w ortopedii są postępujące niedobory tkanki kostnej, które bardzo istotnie ograniczają możliwości leczenia rewizyjnego i rekonstrukcyjnego. Wpływa to istotnie na wzrost kosztów leczenia. Materiał kostny – przeszczepy był stosowany od dawna, jak tylko pojawiły się możliwości odpowiedniego znieczulania chorych. Przeszczepy kostne przed erą endoprotezoplastyk były powszechnie stosowanym narzędziem. Wykorzystywano cechy osteoindukcji i osteokondukcji, a także używano kości jako elementów mechanicznie podtrzymujących uzyskane korekcie położenia części powierzchni stawowych (panewki, kolana, stopy) obciążanych w poszczególnych stawach. W związku z postępem technologicznym, ale również działań globalnych koncernów ortopedycznych mogą wykonywać operację „na miarę” z użyciem implantów dopasowanych indywidualnie dla chorych – custom made. Jest to związane z implantacją dużych implantów i wykonywaniem rozległych operacji. Dla tych kosztownych i ryzykownych operacji jest jednak alternatywna metoda zastosowania dużych przeszczepów kostnych, pozyskanych od dawców za pośrednictwem banków tkanek. Naturalnie operacje rewizyjne pomimo zastosowania tych przeszczepów nie przestają być operacjami pozbawionymi ryzyka, zawsze są wyzwaniem dla lekarzy i samych chorych. Jednak zastosowanie przeszczepów wypełniających duże ubytki kostne zwłaszcza w obrębie miednicy jest alternatywą, którą należy brać pod uwagę przed podjęciem decyzji o zamówieniu implantu „na miarę” przygotowanego w fabryce.

Dotychczasowy dorobek Centralnego Banku Tkanek w tym zakresie pozwala stwierdzić, że podjęcie takiego tematu pracy doktoratu mgr Eweliny Grązki jest z pewnością kolejnym krokiem w drodze ewaluacji bankowania tkanek i oceny znaczenia sposobów przygotowania przeszczepów kostnych na ich jakość pod względem bezpieczeństwa dla chorych jak i osiągnięcia pokładanych celów przez leczących. Jako praktykujący, operujący ortopeda posługujący się na co dzień produktami Centralnego Banku Tkanek z wielką przyjemnością przystąpiłem do recenzji tej pracy.

We Wstępie doktorantka przedstawiła znaczenie kliniczne stosowania przeszczepów kostnych. Następnie szeroko omówiła budowę tkanki kostnej, analizując syntezę kolagenu I, enzymatyczne i nie enzymatyczne wiązania sieciujące oraz metabolizm tkanki kostnej zwłaszcza w aspekcie wgajania się i przebudowy wewnętrznej biostatycznych auto i alogenicznych przeszczepów kostnych. Dla uzasadnienia podjęcia swoich badań autorka opisała zasady sterylizacji radiacyjnej. Przedstawiła szczegółowo wpływ dawki promieniowania, wrażliwość mikroorganizmów i oddziaływanie promieniowania na macierz

organiczną kości. Ten obszerny rozdział posłużył autorce do sformułowania przesłanek, na podstawie których mgr inż. Ewelina Grązka postawiła sobie główne cele swojej pracy.

W Rozdziale Cele doktorantka precyzuje co jest celem pracy: dla spełnienia podstawowego warunku, którym jest zapewnienie zakładanego poziomu jałowości stosuje się sterylizację radiacyjną. Ten sposób zmienia jednak właściwości przeszczepu. Stąd ważnym jest właściwy sposób jego przygotowania, spełniający warunki bezpieczeństwa mikrobiologicznego, jak i wysoką jakość tkanki kostnej. W swojej pracy autorka postawiła sobie za cel zbadanie i porównanie wpływu przygotowania przeszczepów alogenicznej ludzkiej kości zbitej: rodzaju promieniowania, jego dawki oraz temperatury na: gęstość wiązań sieciujących w kolagenie typu I oraz na degradację kolagenu typu I mierzoną jego rozpuszczalnością.

W rozdziale Materiały i Metodyka doktorantka przedstawiła szczegółowo odczynniki oraz aparaturę z której korzystała. Przedstawiła dwie metody analityczne: ultrasprawną chromatografię cieczową UPLC oraz spektrofotometrię absorpcyjną w zakresie światła widzialnego.

Materiał stanowiły próbki ludzkiej tkanki kostnej zbitej, uzyskanej z kości udowych sześciu dawców w wieku 46-54 lat. Materiał pozyskano zgodnie z obowiązującymi wymogami opisanymi w ustawie z dnia 1 lipca 2005 roku o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów. Materiał doktorantka przygotowywała w pięciu etapach: utworzenie krążków, odtłuszczenie, podział krążków na grupy, napromieniowanie i etap ostatni izolacja wiązań sieciujących z kolagenu I. Zwróciło moją uwagę szczegółowe przypisanie poszczególnych krążków do grup badawczych w zależności od sposobu przygotowania, rodzaju przyszłego napromieniowania, jego dawki oraz od temperatury. W ten sposób powstało 16 grup eksperymentalnych. Każda grupa eksperymentalna składała się z 12 krążków, a grupa kontrolna z 18 krążków (po trzy od każdego dawcy). Szczegóły dotyczące sposobów przygotowania poszczególnych etapów przekraczają kompetencje recenzenta. W ostatniej części tego rozdziału doktorantka przedstawiła metodykę identyfikacji i oznaczeń ilościowych pirydynoliny, dezoksyperydynoliny oraz pentozydyny z zastosowaniem chromatografii cieczowej z fluorymetryczną detekcją oraz sposób oznaczania hydroksyproliny. Pomimo ograniczeń kompetencyjnych recenzenta, uważam, że przedstawiony plan badań pozwolił na zrozumienie poszczególnych kroków i uważam, opis ten za wzorcowy dla dość skomplikowanej metodyki postępowania praktycznego i laboratoryjnego. Rozdział zakończyło opisanie technik statystycznych użytych do oceny wyników badań. Nie mam do tej części żadnych zastrzeżeń.

Rozdział Wyniki przedstawia syntetycznie obserwacje uzyskane z poszczególnych testów. Zgodnie z przyjętą metodyką w pierwszej części pracy doktorantka oceniła wpływ sposobu przygotowania przeszczepów i warunków ich sterylizacji na gęstość wiązań sieciujących w kolagenie macierzy kostnej. Ocena gęstości pirydynoliny, dezoksyperydynoliny wykazała brak wpływu zadanych i badanych parametrów. Wskazuje to na stabilność chemiczną próbek w badanych warunkach

odtłuszczenia, niezależnej od rodzaju i dawki sterylizacji radiacyjnej oraz temperatury napromieniowania. W przypadku oceny gęstości pentozydyny doktorantka zaobserwowała znamienne niższe wartości w badanych warunkach. Autorka skomentowała ten fakt możliwością wymywania pentozydyny w fazie odtłuszczenia lub degradacją pod wpływem użytych odczynników chemicznych.

Wyniki w drugiej części wykazały znamienny wpływ na rozpuszczalność kolagenu krążków kostnych z dwóch zadanych eksperymentalnie czynników: odtłuszczenia oraz dawki promieniowania. Rozpuszczalność kolagenu w krążkach odtłuszczonych przed napromieniowaniem była znamienne niższa w porównaniu do nieodtłuszczonych krążków (niezależnie od rodzaju napromieniowania, jego rodzaju i temperatury). Niezależnie doktorantka wykazała, że dawka napromieniowania 35kGy powoduje większą rozpuszczalność kolagenu w porównaniu z dawką 25kGy (niezależnie od procesu odtłuszczenia, rodzaju promieniowania i temperatury).

Sposób przedstawienia wyników uważam, za właściwy, gdyż jako osoba niezajmująca się na co dzień tymi zagadnieniami mogłem podążając za metodyką badań prześledzić proces i sposoby uzyskiwania wyników i ich analizy.

W rozdziale Dyskusja mgr inż. Ewelina Grązka omawia uzyskane wyniki i właściwie dyskutuje z prezentowanymi w piśmiennictwie. Przedstawiony przegląd piśmiennictwa wykazuje istotnie wpływ metod konserwacji i warunków przygotowania na poradiacyjne uszkodzenia kolagenu. Autorka wskazuje zgodność swoich badań w zakresie wpływu dawki promieniowania powyżej 35kGy na zwiększoną rozpuszczalność kolagenu przy braku stosowania odtłuszczenia. To samo zjawisko nie występuje w przypadku odtłuszczenia przeszczepów. Te informacje mają istotne praktyczne znaczenie, gdyż pozwalają zoptymalizować proces przygotowania przeszczepów do użycia klinicznego. Podsumowując doktorantka stwierdza, że w procesie przygotowywania przeszczepów kluczową rolę odgrywają sposoby ich konserwacji oraz warunki sterylizacji, a nie rodzaj użytego promieniowania.

Te sformułowania świadczą o dojrzałości doktorantki i umiejętności w rozwiązywaniu problemów badawczych dotyczących zwłaszcza, tak pośrednio jak i bezpośrednio codziennej praktyki klinicznej.

Pracę kończy część Wnioski, których jest 6 i odpowiadają one na postawione w pracy cele. Uważam, że są sformułowane w sposób wzorcowy, gdyż pomimo, że nie są syntetyczne, wynikają z pracy i precyzyjnie przedstawiają wynikające z pracy informacje.

Praca zawiera 137 pozycji piśmiennictwa i doniesień internetowych, poprawnie cytowanego.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Eweliny Grązki jest przejrzysta, Metodyka opisana wzorcowo, przez co pozwala na śledzenie przebiegu badań. Praca jest czytelna, napisana poprawnym językiem, nie zawiera sprzeczności i powtórzeń.

Chciałbym na końcu podkreślić dużą staranność w przygotowaniu estetycznym pracy oraz czytelne tabele, właściwie przedstawiające wyniki.

Przedstawiona mi rozprawa mgr inż. Eweliny Grązki spełnia kryteria przewidziane ustawą dla prac doktorskich, co upoważnia mnie do przedłożenia Radzie Naukowej Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosku o wszczęcie dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. med. Jarosław Czubak
Kierownik Kliniki Ortopedii,
Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej CMKP