

Prof. ndzw. dr hab. Sławomira Skrzypek  
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej  
Wydział Chemii UŁ  
Łódź, ul. Tamka 12  
e-mail: skrzypek@uni.lodz.pl

Łódź 04.11.2017

## RECENZJA

### rozprawy doktorskiej mgr Anny Tokarzewicz pt. „Rozwój metod oznaczania wybranych proteaz oraz inhibitorów proteaz z wykorzystaniem biosensorów SPRI”

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Anny Tokarzewicz została wykonana na Wydziale Biologiczno-Chemicznym pod kierunkiem Pani dr hab. Ewy Gorodkiewicz jako promotora. Mianem nowotworów złośliwych określa się grupę około 100 schorzeń, które zostały sklasyfikowane w Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych. Nowotwory są drugą przyczyną zgonów w Polsce. Liczba zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce w ciągu ostatnich trzech dekad wrosła ponad dwukrotnie, osiągając w 2010 roku ponad 140,5 tys. zachorowań. Jak podają źródła ([www.onkologia.org.pl](http://www.onkologia.org.pl)) zachorowalność na nowotwory złośliwe w Polsce jest u obu płci niższa niż średnia dla krajów Unii Europejskiej, ale już umieralność z powodu nowotworów złośliwych jest w Polsce wyższa niż średnia dla tych krajów o około 20% u mężczyzn i około 10% u kobiet. Chociażby w świetle przytoczonych faktów można stwierdzić, że tematyka prac naukowych związana z wykrywaniem, diagnozowaniem czy leczeniem nowotworów jest jedną z najbardziej aktualnych. Przedstawiona mi do recenzji praca mgr Anny Tokarzewicz trafnie wpisuje się w ten nurt jakże potrzebnych badań.

Ogólnie wiadomo, że rozwój nowotworu jak i innych jednostek chorobowych jest związany ze zmianą ilości i/ lub aktywności różnego rodzaju związków chemicznych w organizmie. Bardzo często, są to zmiany związane z ilością/aktywnością enzymów - proteaz. Jak wynika z doniesień literaturowych, wybrane enzymy mają znaczący udział w procesach zachodzących w organizmie. Zmiany aktywności różnego rodzaju proteaz, zaobserwowano w wielu stanach patologicznych, na przykład: w procesach zapalnych, chorobach degeneracyjnych oraz w nowotworach. Są to związki bardzo istotne z punktu widzenia starzejącego się społeczeństwa, gdyż pozwalają na kontrolę wielu chorób, umożliwiają wczesną interwencję i dostarczają informacji o ich przebiegu bądź reemisji. Dlatego, tak ważne jest, poszukiwanie nowych metod oznaczeń ilościowych tych enzymów.

Metody obecnie funkcjonujące, wykorzystywane do oznaczeń ilościowych proteaz w większości oparte są na badaniach ekspresji oraz na wykorzystaniu testów immunoenzymatycznych - testów ELISA (z ang. enzyme-linked immunosorbent assay) Znane są też metody, które poprzez wykorzystanie znaczników, w różnym stopniu spełniają kryteria czułości i selektywności oznaczeń. Nie mniej jednak, zachodzi duża potrzeba opracowania nowych, selektywnych procedur analitycznych. Biosensory z detekcją sygnału techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (z ang. Surface Plasmon Resonance Imaging - SPRI) wychodzą naprzeciw tym oczekiwaniom. Umożliwiają one pomiary ilościowe tych enzymów znacznie szybciej, niż ma to miejsce technikami obecnie wykorzystywanymi w laboratoriach diagnostycznych. Takie też biosensory zostały skonstruowane i opisane w przedstawionej pracy doktorskiej. Cześć opisanych przez Autorkę badań, stanowią również badania umożliwiające udoskonalanie już istniejących biosensorów SPRI.

Praca doktorska ma układ klasyczny i składa się z wstępu, przeglądu literatury, części doświadczalnej, dyskusji wyników, wnioski oraz wykazu cytowanej literatury. Rozprawa obejmuje 124

strony, posiada 71 rysunków, 13 tablic, a przegląd literatury jest oparty na 111 pozycjach literaturowych.

**Część literaturowa** stanowi interesujące studium biochemiczne. W części tej Autorka opisała proteazy w oparciu o ich podział, a więc macierzową metaloproteinazę-1, macierzową metaloproteinazę-2, katepsynę L, katepsynę B, katepsynę D, zwracając uwagę jak w/w związki biologicznie czynne wpływają na przebudowę tkanek prawidłowych i rozwój wielu rodzajów chorób. Autorka zwraca też uwagę na inhibitory proteaz, np. cystatynę C która hamuje większość proteaz cysteinowych u ludzi (w tym katepsyn) i pełni przede wszystkim funkcję obronną przeciwko „działalności” tych enzymów. W kolejnym rozdziale Doktorantka opisuje biosensory, w sposób klarowny przedstawia schemat ideowy działania biosensorów, przykładowe analizy i receptory. Jednymi z przedstawicieli biosensorów optycznych są biosensory oparte na zjawisku fizycznym - powierzchniowym rezonansie plazmonów (SPR). Autorka wyjaśnia powierzchniowy rezonans plazmonów jako bez znacznikową technikę, która umożliwia obserwację zmian współczynnika załamania światła w zależności od masy związanej na powierzchni biosensora. Wykorzystuje się tu plazmony powierzchniowe, które są powierzchniowymi falami elektromagnetycznymi generowanymi przez oscylacje wokół położenia równowagi - rezonans wolnych elektronów metalu. Dalej doktorantka wyjaśnia warunki jakie są niezbędne aby zaszło opisywane wyżej zjawisko fizyczne związane ze światłem płasko spolaryzowanym, jego energią, absorpcją światła przez plazmony poprzez dopasowanie wektora falowego światła padającego ( $k_x$ ) oraz wektora falowego plazmonów ( $k_{sp}$ ). Zachodzące zjawisko SPR obserwowane jest jako pojawienie się wyraźnego minimum (tzw. kąt SPR) na krzywej reflektancji w zależności od kąta padania promieniowania laserowego, co jest spowodowane absorpcją energii niezbędnej do generowania plazmonów powierzchniowych. Tak jak wcześniej wspomniano, związanie z powierzchnią biosensora cząsteczek biologicznych o określonej masie, powoduje zmiany współczynnika załamania światła ośrodka znajdującego się nad tym metalem (zmiany pola wygaszającego), co powoduje przesunięcie minimum (kąta SPR) w kierunku większych wartości na krzywej reflektancji. Aby móc w dalszym ciągu obserwować zjawisko SPR niezbędna jest wówczas zmiana kąta padania światła (tzw. skanowanie kąta). Dokonywanie pomiarów przy określonym kącie padania i zbierania światła za pomocą kamery która odczytuje natężenie światła w postaci obrazu to właśnie technika powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej SPRI. Ponieważ o skuteczności działania biosensorów decyduje wytworzona powierzchnia, ważne jest przeprowadzenie badań zmian topografii powierzchni, grubości poszczególnych warstw, właściwości powierzchni, np. zwilżalności, składu chemicznego. Dlatego w dalszej części Autorka opisała wybrane metody kontroli powierzchni biosensorów takie jak skaningowa mikroskopia elektronowa, mikroskopia sil atomowych, spektroskopia w podczerwieni z transformacją Furiera, pomiary kąta zwilżania czy elipsometrię. Część z tych metod Autorka zastosowała w swoich badaniach.

Podsumowując część literaturową mogę stwierdzić, że została ona ciekawie przedstawiona i dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia konstrukcji biosensorów SPRI. Na uwagę zasługuje przedstawienie informacji w postaci bardzo dobrze dobranych i czytelnych rysunków. Ułatwia to znacznie zrozumienie niełatwych badań biochemicznych.

**Część eksperymentalna pracy** związana jest z opracowaniem trzech nowych biosensorów z detekcją metodą SPRI do oznaczeń ilościowych proteaz: MMP-1, MMP-2, katepsyny L. Opracowanie nowych biosensorów czułych na wymienione proteazy składało się z następujących etapów: wybór odpowiedniego tiolu, wybór odpowiedniego receptora wiążącego badany enzym z próbki oraz wyznaczenie jego optymalnego stężenia na powierzchni biosensora, sporządzenie krzywej kalibracyjnej

na podstawie, której wyznaczano stężenie tego enzymu w próbkach, dla biosensora czułego na katepsynę L wyznaczenie pH roztworu, w którym wykazuje ona optymalną aktywność w stosunku do receptora- inhibitora i najefektywniej się z nim wiąże, ponadto określenie selektywności, określenie precyzji i dokładności metody, wyznaczenie limitu detekcji oraz oznaczalności, pomiary stężenia każdego z enzymów w różnego rodzaju próbkach naturalnych. Przy konstrukcji poszczególnych biosensorów monitorowano tworzenie się kolejnych warstw związków na powierzchni poprzez badania z użyciem mikroskopu sił atomowych- AFM (dla MMP-1 i MMP-2) lub skaningowego mikroskopu elektronowego- SEM (dla katepsyny L).

Bardzo ważnym elementem w procesie walidacji nowo opracowanych metod było porównanie stężeń każdego z enzymów oznaczonych, w różnego rodzaju próbkach naturalnych, za pomocą biosensorów SPRI z wynikami otrzymanymi przy użyciu testów ELISA. Porównanie potwierdziło dobrą korelację wyników z obu metod co stwarza możliwość wykorzystania tych biosensorów w diagnostyce laboratoryjnej jako metodę konkurencyjną w stosunku do testów immunoenzymatycznych. W pracy przedstawiono również pomiary aktywności enzymatycznej katepsyny L, co potwierdziło tendencję zmian ilości tego enzymu w próbkach naturalnych wyznaczoną z użyciem biosensora SPRI. W celu potwierdzenia użyteczności diagnostycznej biosensorów SPRI czułych na takie proteazy jak: katepsyny B, D i oraz inhibitor katepsyny B - cystatynę C przeprowadzono szereg pomiarów stężenia tych enzymów w różnych próbkach naturalnych (osocze, surowica krwi, mocz). Otrzymane wyniki tych badań potwierdziły możliwość zastosowania pomiarów stężenia tych enzymów w kontroli przebiegu choroby oraz monitoringu chorego po przebytych procesach zapalnych, zabiegach, urazach.

Badania opisane w recenzowanej dysertacji stanowią znaczące osiągnięcie naukowe z punktu widzenia chemii analitycznej. Skonstruowanie trzech nowych biosensorów stanowi rozszerzenie listy enzymów oznaczanych techniką SPRI oraz alternatywę do metody ELISA, niemal monopolizującej dotychczas oznaczanie ilościowe enzymów. Godna podkreślenia jest różnorodność konstrukcji opracowanych biosensorów: dwa z nich są oparte na immobilizacji inhibitorów a jeden na zastosowaniu antyciała. Połączenie receptorów ze złotą powierzchnią biosensora zostało dokonane za pomocą wiązania peptydowego lub na zasadzie oddziaływań hydrofobowych. Również różnorodne są stosowane metody obserwacji powierzchni tworzonego biosensora na różnych etapach tworzenia: w części eksperymentów jest stosowana mikroskopia sił atomowych a w innej części – skaningowa mikroskopia elektronowa. Ta różnorodność konstrukcji i narzędzi świadczy o osiągnięciu przez Doktorantkę wysokich kompetencji w zakresie badań opisanych w dysertacji, a także potwierdza wysoki poziom merytoryczny Promotora pracy. Doktorantka może poszczycić się siedmioma publikacjami i ósmą przyjętą do druku, trzema zgłoszeniami patentowymi, czterema wygłoszonymi komunikatami, prezentacją czterech posterów. Z drugiej strony stosowane charakterystyki analityczne zostały dokonane w sposób typowy dla chemii analitycznej: selektywność- zakres liniowej odpowiedzi biosensora- odzysk- precyzja- granice wykrywalności i oznaczalności. Jest to konieczne w celu porównania różnych tworzonych metod. Należy zauważyć także, że oznaczanie analitów w próbkach medycznych było oparte o różnorodny bogaty zestaw próbek. Na uwagę zasługuje tu współpraca z klinikami Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz z medycznymi jednostkami prywatnymi.

Recenzowana praca jest dobrze zredagowana i nie mam do niej zasadniczych uwag. Nie mniej jednak po przeczytaniu nasuwa się kilka pytań i drobnych spostrzeżeń które z pewnością mogą być wyjaśnione w trakcie publicznej obrony pracy.

1. Przygotowanie biosensora wymaga zastosowania do jego budowy materiału biologicznego (w tym przypadku np. inhibitory ARP 101 czy inhibitor katepsyny L jako warstwy receptorowe). Jak trwałe są takie biosensory? Czy temperatura ma wpływ na ich działanie? Czy immobilizacja oznaczanej proteazy zachodzi w tych samych warunkach w tym samym stopniu? Czy Autorka

porównywała wyniki oznaczeń danej proteazy uzyskane za pomocą tego samego rodzaju biosensorów ale przygotowywanych w różnych dniach pracy eksperymentalnej?

2. Badając zależności wielkości sygnału SPRI od stężenia badanej proteazy w zoptymalizowanych wcześniej warunkach daje się wyznaczyć zależność prostoliniową opisaną równaniem liniowym. Czym Autorka wyjaśniłaby fakt, że dla stężenia proteazy równego zero rejestruje się sygnał SPRI (wykres 31, 32, 41, 51, 62)?
3. Niektóre badane stężenia katepsyny L w surowicy pacjentów (Tablica 13) nie mieszczą się w zakresie liniowym wyznaczonej wcześniej zależności sygnał  $S(\text{SPRI}) = f(c)$
4. W Tablicy 10 dotyczącej MMP-2 opis prawej kolumny sugeruje, że chodzi o MMP-1
5. Badając wpływ interferencji na rejestrowane sygnały (np. tabela 5, 8, 11) Autorka podaje wartości Odzysku bez uwzględniania znaczących miejsc po przecinku. Wydaje się, że tak jak dla stężeń Dodanego i Oznaczanego, konsekwentnie wartość odzysku powinna być również podana do drugiego miejsca po przecinku.
6. Opracowując statystycznie uzyskane wyniki badań i licząc przedział ufności Autorka nie podaje wartości prawdopodobieństwa dla jakich te obliczenia zostały przeprowadzone.

Reasumując, przedstawiona do oceny praca jest przykładem zgłębiania jakże ważnej tematyki badań nad nowotworami. Rezultaty i opisy przeprowadzonych eksperymentów dowodzą, iż Doktorantka bardzo dobrze opanowała złożone instrumentarium trudnego warsztatu pomiarowego oraz w pełni zrealizowała założone cele. Bardzo dobrze oceniam przygotowanie Doktorantki do samodzielnych badań, co wyraża się w umiejętności połączenia pracy doświadczalnej i koncepcyjnej. Przedstawioną do recenzji pracę cechuje wysoki poziom naukowy, praca wykazuje oryginalność rozwiązań, posiada wyraźny element nowości naukowej i spełnia wszelkie wymagania Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 17 marca 2003 r. (wraz z późniejszymi zmianami) stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Anny Tokarzewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę dorobek publikacyjny, uzyskane rezultaty i skalę trudności przeprowadzonych badań wnoszę również o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

Sławomira Skrzypek

