

Prof. dr hab. inż. Waldemar Wardencki  
Katedra Chemii Analitycznej  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Gdańska

## RECENZJA

### **rozprawy doktorskiej mgr Anny Tokarzewicz**

pt.: Rozwój metod oznaczania wybranych proteaz oraz inhibitorów proteaz z wykorzystaniem biosensorów SPRI.

zrealizowanej na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku,

promotor rozprawy: dr hab. Ewa Gorodkiewicz

Poszukiwanie nowych narzędzi analitycznych i opracowywanie nowych metodyk oznaczania wielu substancji chemicznych i biologicznych to ważne i trudne wyzwanie dla chemików analityków. Jednym z przykładów takiej potrzeby jest analiza substancji biologicznych przydatnych diagnostycznie w analizie klinicznej. Dostępność wiarygodnych, czułych i szybkich metodyk analitycznych ma na celu szybką diagnozę wielu chorób cywilizacyjnych, np. chorób nowotworowych, których problemem jak i innych, jest wczesna diagnostyka i monitorowanie stanu zdrowia w procesie leczenia. Obecnie stosowane metody oznaczania większości substancji biologicznych to czasochłonne i kosztowne badania laboratoryjne. Obiecujące rozwiązania w tej dziedzinie dotyczą zastosowanie biocujników, które pozwalają wykrywać różne substancje biologiczne, a tym samym pomagać w diagnozie różnych stanów chorobowych zachodzących w organizmie człowieka. W większości są to czujniki enzymatyczne, chociaż w przypadku np. diagnostyki nowotworów mogą to być również czujniki bakteryjne lub immunologiczne. Czujniki takie mogą być pomocne m.in. w oznaczaniu mediatorów reakcji odpornościowych, czyli biomarkerów, które są przydatne w monitorowaniu stanu zdrowia pacjentów w celu wykrycia na przykład wczesnych stadiów nowotworów. Coraz częstsze stosowanie biocujników wynika z ich zalet w stosunku do metod standardowych. Przede wszystkim tego typu badanie prowadzone jest w czasie rzeczywistym, dlatego łatwo je dopasować do stanu pacjenta czy też innej zaistniałej sytuacji.

Ponadto jest to metoda szybka, tańsza, często w pełni zautomatyzowana i pozwalająca na analizę kilku substancji jednocześnie.

Opracowanie nowych bioczuJNIKÓW obejmuje zwykle kilka etapów i ma charakter inter/multidyscyplinarny. Pierwszy związany jest z chemią ciała stałego, czyli przygotowaniem podłoża bioczuJNIKA. Następnie konieczne jest zaprojektowanie odpowiedniej reakcji biochemicznej umożliwiającej wykrywanie oznaczanej substancji. Ważną czynnością jest dobranie odpowiedniej metody, która umożliwi detekcję sygnału i przełożenie jego wartości na konkretne stężenia. W ostatnim etapie należy uwiarygodnić opracowany czujnik i procedurę jego użycia poprzez wyznaczenia użytecznych parametrów analitycznych. Jeżeli wszystkie etapy przeprowadzi się prawidłowo to otrzymany bioczuJNIK będzie charakteryzował się oczekiwaną selektywnością oraz specyficznością, a tym samym będzie mógł być zastosowany w diagnostyce wykrywania markerów wielu chorób.

Praca doktorska mgr Anny Tokarzewskiej w pełni wpisuje się w nowatorski nurt badań dotyczących opracowania nowych metod oznaczania określonej grupy ważnych substancji biologicznych, a mianowicie wybranych proteaz i inhibitorów proteaz z wykorzystaniem bioczuJNIKÓW z detekcją sygnału techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (SPRI). Realizacja tej pracy musiała obejmować wszystkie wyżej wymienione etapy. Można więc jednoznacznie stwierdzić, że Doktorantka podjęła się realizacji ambitnego zadania w ramach ważnej i aktualnej tematyki, ponadto mającej wyraźny aspekt użytkowy.

### **Ocena redakcyjna rozprawy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa, wykonana pod opieką naukową dr hab. Ewy Gorodkiewicz, obejmuje 128 stron maszynopisu i ma tradycyjny układ dla tego typu prac. Rozprawa obejmuje: wstęp (2 strony), przegląd literaturowy będący w zasadzie częścią teoretyczną (26 stron), obszerny opis badań własnych (65 stron), obejmujący opis sprzętu, odczynników i materiału biologicznego oraz szczegółowy opis konstrukcji trzech biosensorów wraz z ich określoną charakterystyką analityczną. Pracę kończy dyskusja wyników (6,5 strony) i wnioski (1,5 strony) oraz jednostronicowe streszczenia pracy, zarówno w języku polskim jak i angielskim i wykaz cytowanej literatury (111 pozycji). Pochwalić należy Doktorantkę za użyteczny ze względów nomenklaturowych, wykaz stosowanych w pracy skrótów. Struktura pracy jest poprawna i typowa dla doświadczalnych prac badawczych. Można mieć jedynie zastrzeżenia, że Autorka nie wyodrębniła, jak się zwyczajowo przyjęło, we wstępie lub przed częścią doświadczalną, celu pracy. Wprawdzie cel podjętych badań

wynika z części literaturowej, w której Kandydatka ze znanstwem przedstawia fizjologiczne znaczenie wybranych analitów, a tym samym oczywista staje się potrzeba ich oznaczania ale wyraźnie wyartykułowany cel znajduje się dopiero w streszczeniu pracy.

Tytuł pracy jest w pełni zgodny z jej treścią, chociaż osobiście uważam, że tytuł „Opracowanie metod oznaczania....” zamiast „Rozwój metod oznaczania....” lepiej odzwierciedlałby jej treść gdyż w obecnej formie jest on moim zdaniem zbyt ogólny.

W rozdziale „Przegląd literaturowy” Doktorantka przedstawiła trzy odrębne zagadnienia, reprezentujące różne zakresy wiedzy ale ściśle wiążące się z celem pracy, a mianowicie:

- charakterystykę wybranych proteaz i inhibitorów proteaz;
- charakterystykę biosensorów z detekcją SPRI;
- istotę wybranych metod stosowanych do kontroli powierzchni podłoża biosensorów.

Ta część pracy jest dobrze zredagowana i w sposób zwięzły, bez zbędnych treści przedstawia zarówno zagadnienia związane z projektowaniem i konstrukcją określonego typu bioczuJNIKÓW jak i krytyczną charakterystykę analitów - enzymów i ich inhibitorów - pełniących ważną rolę w funkcjonowaniu organizmów.

W części doświadczalnej Autorka szczegółowo przedstawia w sposób bardzo konsekwentny projektowanie, konstrukcję i wyznaczanie charakterystyk analitycznych procedur służących do oznaczania wybranych enzymów. Odnosi się jednak wrażenie, że o ile omawianie każdego bioczuJNIKA ze względu na swoją specyfikę wymaga oddzielnego potraktowania to wydzielenie w jeden podrozdział zagadnień walidacyjnych, ze względu na stosowaną identyczną metodologię pozwoliłoby skrócić pracę a jednocześnie ją uczynić poprzez tabelaryczne zestawienie wyznaczonych parametrów walidacyjnych dla wszystkich trzech bioczuJNIKÓW.

### **Ocena merytoryczna i użytkowa rozprawy**

Zasadniczym celem pracy było opracowanie trzech nowych bioczuJNIKÓW i metod analitycznych do oznaczania wybranych substancji biologicznych, spełniających ważne role fizjologiczne. Istotne znaczenie w podjętym przedsięwzięciu tym pełni wybrana i zastosowana metoda detekcji interakcji biologiczna warstwa receptorowa-analit, a mianowicie technika SPRI. Chcąc zrealizować tak postawione zadanie należało:

1. dobrać odpowiednie warstwy receptorowe do mierzonych analitów (metaloproteinazy-1; metaloproteinazy-2 i katepsyny L);
2. zaproponować metody unieruchomienia cząsteczek biologicznie czynnych w warstwie receptorowej;
3. dobrać optymalne warunki sygnału ( przede wszystkim intensywność, selektywność).

Jako receptory wiążące Doktorantka zaproponowała:

- królicze, anty-ludzkie przeciwciała do oznaczania MMP-1;
- handlowy inhibitor ARP 101 do oznaczania MMP-2;
- handlowy inhibitor RKLLW-NH<sub>2</sub> do oznaczania katepsyny L.

Z kolei do związania receptora z podłożem (złoto) istotny był również dobór substancji pełniącej rolę tzw łącznika, determinującego sposób związania (immobilizacja kowalencyjna, immobilizacja za pomocą wiązań hydrofobowych). W pierwszym przypadku łącznikiem była cysteamina, a w dwóch ostatnich 1-oktadekanotiol. W celu sprawdzenia czy substancja biologiczna osadziła się na podłożu Doktorantka zastosowała nowoczesne metody analityczne, a mianowicie: mikroskopię sił atomowych (AFM) oraz skaningową mikroskopię elektronową (SEM). Moim zdaniem wszystkie wymienione czynności zostały przeprowadzone zgodnie z zasadami projektowania i wykonania biosensorów i świadczą o właściwym opanowaniu tego trudnego etapu.

O praktycznej przydatności bioczuJNIKÓW i opracowanych z ich użyciem metod analitycznych decydują ich parametry analityczne, takie jak: dokładność, precyzja, selektywność i specyficzność względem badanej substancji, powtarzalność wyników; czas odpowiedzi lub inaczej szybkość czasu detekcji; czas życia, czyli trwałość sensora, uzależniona zarówno od jego rodzaju, jak i trybu pracy. Duża część pracy doświadczalnej poświęcona jest właśnie określeniu tych parametrów. Doktorantka w konsekwentny sposób przeprowadziła określenie dokładności, precyzji, selektywności oraz granic wykrywalności i oznaczalności opracowanych procedur. Przekonywującym dowodem na poprawność realizacji celu jest porównanie wyników oznaczeń ilościowych wybranych analitów metodami opracowanymi w rozprawie z wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem powszechnie stosowanego testu immunologicznego - testu ELISA. Sposób realizacji części doświadczalnej recenzowanej pracy potwierdza umiejętności w zakresie samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Bardzo ważnym elementem rozprawy, szczególnie ze względu na jej praktyczną użyteczność, są wykonane z wykorzystaniem opracowanych bioczuJNIKÓW, pomiary stężeń MMP-1 w próbkach naturalnych (osocze i mocz), MMP-2 (osocze oraz płyny hodowlane zarodków do stadium blastocysty) i katepsyny L (surowica krwi) i stwierdzone korelacje ich ilości ze stanem zdrowia (osoby zdrowe i osoby z określoną dolegliwością). Stwarza to możliwość zastosowania opracowanych bioczuJNIKÓW i procedur analitycznych do oceny poziomów biomarkerów określonych chorób i kontroli ich leczenia. Warto dodać, że to kolejne zastosowania praktyczne bo swoje badania Doktorantka rozpoczęła od zastosowania wcześniej opracowanych bioczuJNIKÓW w zespole dr hab. inż. Ewy Gorodkiewicz do

oznaczania stężeń katepsyn B i D oraz cystatyny w próbkach naturalnych (osocze, surowica krwi, mocz). Ten fragment badań potwierdził jednoznacznie możliwość zastosowania pomiarów stężenia tych enzymów w kontroli zarówno przebiegu różnych chorób jak i w monitoringu procesów leczenia.

Większość z uzyskanych przez kandydatkę wyników oceniam wysoko. Za najważniejsze osiągnięcia doktorantki uważam:

- **Stworzenie nowych narzędzi analitycznych poprzez kompletne opracowanie trzech bioczujników do oznaczeń ważnych substancji biologicznych;**
- **Opracowanie trzech procedur analitycznych w oparciu o zaprojektowane i wykonane bioczujniki;**
- **Udokumentowane zvalidowanie wszystkich opracowanych procedur analitycznych;**
- **Wykazanie użyteczności klinicznej opracowanych metodyk do diagnostyki medycznej poprzez oznaczenie wybranych proteinaz i ich inhibitorów;**
- **Wykazanie, że istnieje związek ilości proteaz i ich inhibitorów, jako biomarkerów, z wieloma schorzeniami.**

Jak w każdej pracy doszukać się można różnych uchybień i niejasności. Zadaniem recenzenta jest je wyłowić, poddać krytycznej ocenie i dyskusji. Poniżej przedstawiam zagadnienia budzące moje wątpliwości oraz pytania jakie pojawiły się w trakcie lektury dysertacji:

- Czym podyktowany jest wybór konkretnych analitów – proteinaz i ich inhibitorów? Czy decydującym argumentem było zapotrzebowanie środowiskowe czy możliwości wykonawcze?
- Czy umieszczenie podrozdziału dotyczącego oznaczania katepsyn B, D oraz cystatyny w próbkach naturalnych, łącznie z opracowaną procedurą oznaczania katepsyny L nie byłoby bardziej konsekwentne, a tym samym korzystniejsze dla czytelności pracy?
- Czy postulowana przez Kandydatkę przyczyna nieprzechodzenia krzywych kalibracyjnych przez zero jest uzasadniona i czy jest to przyczyna jedyna?
- Czy w oparciu o dotychczasowe badanie możliwe jest określenie trwałości, a więc i czasu życia opracowanych bioczujników;

- Czy nie lepszy jest termin „unieruchomienie receptora” niż stosowany wielokrotnie w tekście rozprawy termin „zimmobilizowanie receptora” (np. na s. 63)?
- Proszę o wyjaśnienie co reprezentują wartości  $\pm$  podane w tabelach 7, 10 i 13 w liniach, w których zamieszczone są średnie wartości stężeń odpowiednich analitów oznaczone dwiema metodami: testem ELISA i odpowiednimi bioczujujnikami. Z pewnością nie są to wartości odchyłeń standardowych jak to ma miejsce w przypadku wyników poszczególnych próbek.

Przytoczone wątpliwości nie mają istotnego znaczenia i nie podważają w żadnej mierze wartości rozprawy i mojej pozytywnej jej oceny. Spodziewam się, że uzyskam na nie wyjaśnienia podczas publicznej obrony. Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany a potwierdzeniem użyteczności badań są dwa zgłoszenia patentowe (nr P.412411 dotyczący bioczujujnika do oznaczeń MMP-1 i P.422097 bioczujujnika czułego na katepsynę L).

#### **Wniosek końcowy:**

Na podstawie analizy przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej mgr Anny Tokarzewskiej mogę stwierdzić, że zawiera ona **elementy nowości naukowej a charakter podjętych badań ma charakter innowacyjny**. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego - konstrukcji nowych bioczujujników i opracowania nowych procedur analitycznych - poparte wiarygodnymi wynikami badań. Autorka wykazała się dobrym przyswojeniem wiedzy teoretycznej a jednocześnie dowiodła umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Uwzględniając interdyscyplinarny charakter pracy, jej potencjał aplikacyjny i dorobek publikacyjny Kandydatki (7 publikacji o sumarycznym IF=10.273 i jedna bez IF) uważam, że w świetle Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 14.03. 2003 r., (Dz. U. nr 65, poz. 595 z 2003 r., ze zm. w Dz. U. z 2005 r. nr 164, poz.1365) recenzowane opracowanie **spełnia wszystkie wymogi** stawiane tego typu pracom i dlatego wnoszę do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie mgr Anny Tokarzewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk , 19.10.2017