



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ

Zakład Bromatologii

15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2D

Tel./Fax.(85) 748-54-68; (85) 748-54-69

bromatos@umb.edu.pl

Białystok 05 maja 2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Beaty Szymańskiej pt.:
„Test analityczny do oznaczeń wybranych biomarkerów
z wykorzystaniem biosensorów SPRI”

Choroby nowotworowe są od wielu lat, po chorobach układu krążenia, drugą przyczyną zgonów w Polsce. Prognozuje się, że liczba zachorowań i zgonów na nowotwory złośliwe będzie systematycznie wzrastać i mogą one stać się pierwszą przyczyną zgonów u osób przed 65. rokiem życia. Obserwowany w Polsce wzrost liczby zachorowań jest wynikiem zmian demograficznych (starzenia się społeczeństwa), jak i skutkiem narażenia na czynniki ryzyka, szczególnie wynikające ze zmian cywilizacyjnych i czynników środowiskowych, takich jak zanieczyszczenie powietrza, m.in. smog. Nie mniej istotne są czynniki związane ze stylem życia, w tym nieodpowiednia dieta – niskie spożycie warzyw i owoców, wzrost spożycia żywności wysoko przetworzonej, otyłość, brak aktywności fizycznej, nadużywanie wysokoprocenowych alkoholi, a także palenie papierosów, które łącznie, według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), mogą stanowić ponad 65% spośród wszystkich czynników ryzyka chorób nowotworowych.

Pomimo postępu w dziedzinie onkologii i większej dostępności innowacyjnych metod terapii liczba zgonów na nowotwory złośliwe w Polsce jest nadal wysoka. Jedną z głównych przyczyn dużej śmiertelności z powodu nowotworów jest ich zbyt późna diagnoza z powodu niewielkiej liczby wykonywanych badań kontrolnych. Dlatego wprowadzenie programów profilaktycznych, mających na celu wczesną diagnostykę chorób nowotworowych jest niezwykle istotne. W związku z tym istnieje potrzeba poszukiwania nowych, szybkich i skutecznych metod diagnostyki chorób nowotworowych.

Dlatego podjęty przez Panią mgr Beatę Szymańską temat rozprawy doktorskiej jest jak najbardziej aktualny i uzasadniony.

Głównym celem naukowym rozprawy doktorskiej było opracowanie nowego panelu analitycznego z użyciem nowoskonstruowanych biosensorów do jednoczesnego oznaczania wybranych biomarkerów w materiale biologicznym (surowicy/osoczu) z wykorzystaniem techniki Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging (SPRI), jako metody detekcji.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Ewy Gorodkiewicz, w Pracowni Bioanalizy Katedry Chemii Fizycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Rozprawa ma formę monografii (112 stron maszynopisu) i składa się z dwóch zasadniczych części – przeglądu literaturowego, wprowadzającego do tematu oraz badań własnych. W pierwszej części Doktorantka przedstawiła stosowane obecnie wybrane markery nowotworowe oraz potencjalne markery i ich znaczenie w diagnostyce onkologicznej. Następnie omówione zostały standardowe metody diagnostyczne wybranych markerów nowotworowych. W trzecim punkcie części teoretycznej Doktorantka dokonała charakterystyki biosensorów używanych do oznaczeń biomarkerów.

Cele szczegółowe rozprawy doktorskiej obejmują: 1. Konstrukcję i analityczne opracowanie biosensorów SPRI czułych na wybrane substancje biologicznie aktywne tj. CA-125, HE4, IL-6, CEA, które są zawarte w płynach ustrojowych: surowicy/osoczu krwi z wykorzystaniem: przeciwciał i inhibitorów jako receptorów w biosensorach; badane płyny ustrojowe pochodziły od pacjentów chorych na raka jajnika, torbiel endometrialną, raka jelita grubego oraz od osób zdrowych; 2. Wykorzystanie biosensora specyficznego na aromatazę do oznaczania tego białka w próbkach surowicy/osocza pacjentek z rakiem jajnika i torbielą endometrialną; 3. Utworzenie panelu analitycznego na podstawie nowoskonstruowanych biosensorów do jednoczesnych oznaczeń w próbkach biologicznych; 4. Wykorzystanie innych metod (np. testy ELISA, metody chemiluminescencyjne, fluorymetryczne itp.) oznaczania stężenia i aktywności biomarkerów w celach porównawczych.

Zarówno cel główny pracy, jak i postawione cele szczegółowe zostały w pełni zrealizowane. Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania niewątpliwie posiadają element nowatorski - przedmiotem badań było stworzenie nowego testu analitycznego jako instrumentu do oznaczeń wybranych biomarkerów w płynach ustrojowych człowieka (osocze i surowica krwi) z wykorzystaniem techniki Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging (SPRI) jako metody detekcji. Doktorantka skonstruowała i opracowała analitycznie 4 biosensory w oparciu o interakcje określonych białek (CA-125, HE4, IL-6 i CEA) z odpowiednimi przeciwciałami jako receptorami. Dla IL-6 opracowano także biosensor wykorzystując interakcje inhibitora z badanym białkiem. W celu szerszej diagnostyki badanych próbek w składzie testu analitycznego uwzględniono również aromatazę, na oznaczanie której biosensor został już wcześniej skonstruowany. Dla markera CA-125 wykonano równolegle konstrukcję i analityczne opracowanie biosensora na aparacie SPRI i jego nowym prototypie aparatu komercyjnego, gdzie uzyskano podobne analitycznie charakterystyki na obu aparatach. Oznaczono także badany analit w próbkach biologicznych (rak jajnika, torbiel endometrialna) z wykorzystaniem nowego prototypu aparatu SPRI. Biosensory zostały wykorzystane do przeprowadzenia analiz ilościowych badanych białek w próbkach biologicznych. Ostatecznym rezultatem badań było użycie wyżej wymienionych biomarkerów w jednym panelu (wraz z kalibracją) do jednoczesnego oznaczania pięciu markerów w próbkach pochodzących od

poszczególnych pacjentów z rakiem jajnika, torbielą endometrialną, rakiem jelita grubego, a także u osób zdrowych (grupa porównawcza).

Zastosowana w pracy metodyka nie budzi wątpliwości, wszystkie opracowane metody zostały poddane walidacji. Za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM) sprawdzono poprawność ułożenia kolejnych warstw na powierzchni biosensorów. Wyznaczone zostały parametry walidacyjne, takie jak LOD i LOQ dla oznaczanych biomarkerów. W ocenie selektywności zastosowanych metod, która w przypadku oceny ich przydatności do zastosowania w złożonych matrycowo próbkach biologicznych jest niezwykle istotna, uzyskano zadowalające odzyski. Jednym z etapów rozprawy doktorskiej była walidacja metod z użyciem diagnostycznych metod standardowych (porównawczych), w której uzyskano wysokie korelacje, potwierdzające zgodność metod standardowych z opracowanymi metodami z użyciem biosensorów, w związku z tym przydatność analityczna nowo opracowanych metod nie budzi wątpliwości. Wyznaczona została liniowość i możliwy zakres ilościowego oznaczania poszczególnych biomarkerów. Uzyskana precyzja i odzyski są zadowalające. Modyfikacje w budowie opracowanych biosensorów oraz zastosowanej technice pomiarowej SPRI umożliwiło oznaczanie biomarkerów bez wzmacniania sygnału analitycznego i bez wstępnego zatężania próbek.

Rozdział „Dyskusja” zgodnie z jego zawartością poprawniej byłoby nazwać: „Omówienie wyników i dyskusja”, gdyż niewątpliwie omówienie wyników zawiera. Przydatnym w powyższym rozdziale jest porównanie wyników własnych uzyskanych za pomocą konkretnego biosensora oraz panelu ginekologiczno – onkologicznego, zobrazowane na wykresach 52-56, w którym Doktorantka potwierdziła dużą zgodność. Ponieważ rozprawa doktorska dotyczy nowo opracowanej metody, dyskusja i porównanie wyników do danych literaturowych jest trudne. W mojej ocenie można było jednak podjąć próbę odniesienia się do danych z piśmiennictwa, przykładowo korzystając z publikacji źródłowej pracy przeglądowej „Electrochemical Biosensors for Determination of Colorectal Tumor Biomarkers”, opublikowanej w 2020 r. w Micromachines (MDPI), gdyż odczuwa się w tej kwestii pewien niedosyt.

Pracę kończy 7 wniosków sformułowanych na podstawie uzyskanych badań. Na końcu dysertacji dołączone jest streszczenie w języku polskim i angielskim, spis piśmiennictwa, dorobek naukowy Doktorantki oraz wykaz wzorów statystycznych.

W pracy zacytowano 94 pozycje prawidłowo dobrane piśmiennictwa. Jednak jeśli dane publikacje są tzw. „kamieniem milowym” odkrycia, przykładowo nowego markera CA-125, po raz pierwszy opisanego w 1981 r. przez Basta i wsp. czy w 1965 r. Gold i Freedman po raz pierwszy dokonali charakterystyki markera CEA lub czujnik do wykrywania markerów po raz pierwszy opisano w 1979 to właśnie te źródłowe prace należałoby zacytować, a nie nowsze. Na stronie 31 przy informacji, że grupa naukowców w 2001 r. przedstawiła biosensor do monitorowania pH brakuje odnośnika literaturowego. Piśmiennictwo należałoby ujednolicić, np. tytuły artykułów pisane są różnym stylem, tzw. „Jak w zdaniu” lub każdy wyraz zaczyna się od wielkiej litery.

Na uwagę zasługuje estetyka przygotowanej dysertacji - staranne, czytelne ryciny i tabele ułatwiają czytającemu przeanalizowanie najważniejszych rezultatów z wykonanych badań.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam kilka uwag:


- wstęp do badań własnych (str. 33) jest pewnym powtórzeniem wiadomości zawartych w streszczeniu i niepotrzebnie informuje czytającego o uzyskanych rezultatach, wystarczyłoby w tym miejscu, po krótkim wprowadzeniu, przedstawić cele szczegółowe rozprawy (które są umieszczone wcześniej);
- w podrozdziale „Materiał biologiczny” brakuje informacji o zgodzie Komisji Bioetycznej na pobranie surowicy, nie podano też ilości próbek pobranych od pacjentów z poszczególnymi schorzeniami oraz od osób zdrowych, informacje te zawarte są dopiero w ppkt. 6.1, 6.2 i 6.3. dotyczących walidacji metod;
- Doktorantka użyła kilku niefortunnych sformułowań, np.: „pacjentów z onkologią ginekologiczną”, „na podstawie stanu menopauzy”, bardziej poprawnie byłoby np.: „biorąc pod uwagę okres przed menopauzą i po menopauzie”, a także nie ustrzegła się kilku błędów literowych (str. 9, 13, 40, 91).

Powyższe drobne uchybienia w tekście dysertacji nie mają wpływu na jej wysoką jakość i wartość praktyczną przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

Załączony dorobek publikacyjny, obejmujący 9 publikacji o łącznym współczynniku IF = 22,516 oraz 9 streszczeń konferencyjnych potwierdza naukową dojrzałość Doktorantki, co znajduje odzwierciedlenie w starannym, przemyślanym podsumowaniu wyników dysertacji i formułowaniu wniosków. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka jest współautorem 1 patentu i 4 złożonych wniosków patentowych, powiązanych z tematyką rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż założenia i cel pracy zostały w pełni zrealizowane, a uzyskane z badań wyniki i wnioski niewątpliwie posiadają aspekt praktyczny. Realizacja badań wymagała od Doktorantki dużego nakładu pracy i pełnego zaangażowania w realizowane badania. Uważam, że przedstawiona do recenzji dysertacja spełnia ustawowe, z uwzględnieniem art. 13. ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym, przedkładałam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Beaty Szymańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę dorobek naukowy Doktorantki powiązany z tematyką rozprawy doktorskiej, oryginalność zastosowanych metod i narzędzi badawczych oraz walory poznawcze i praktyczne uzyskanych wyników, zgodnie z Uchwałą nr 1737 Senatu Uniwersytetu w Białymstoku z dnia 27 maja 2015, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK
Zakładu Bromatologii

dr hab. n. farm. Katarzyna Socha