



Dr hab. n. med. Michał Pikuła  
Pracownia Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej  
Zakład Embriologii, Wydział Lekarski  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, bud. CBM  
tel. 58 3491368, 58 3491495  
E-mail: [pikula@gumed.edu.pl](mailto:pikula@gumed.edu.pl)

Gdańsk, 20.03.2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Rafalik pt. „Badanie oddziaływań ludzkiej cystatyny C z monoklonalnym przeciwciałem HCC3”, napisanej pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Aleksandry S. Kołodziejczyk, prof. UG oraz promotora pomocniczego dr Pauliny Czaplewskiej. Recenzja opracowana na zlecenie Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.**

Z dużym zainteresowaniem zapoznałem się z rozprawą doktorską Pani mgr Moniki Rafalik pt. „Badanie oddziaływań ludzkiej cystatyny C z monoklonalnym przeciwciałem HCC3”. Praca została zrealizowana w Katedrze Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Aleksandry S. Kołodziejczyk, prof. UG oraz promotora pomocniczego dr Pauliny Czaplewskiej. Recenzowana praca stanowi część badań nad ludzką cystatyną C, prowadzonych od wielu lat w Katedrze Chemii Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego, kierowanej przez dr hab. Sylwię Rodziewicz-Motowidło, prof. UG. Praca była finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki (grant Sonata Bis) oraz ze środków na Badania Naukowe Służące Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich.

Cystatyna C jest białkiem wstępującym w płynach ustrojowych człowieka i ważnym inhibitorem proteaz cysteinowych, takich jak katepsyna B, H, L, S i papaina. Białko to, obok funkcji fizjologicznych zaangażowane jest w patologiczne procesy zachodzące w ludzkim organizmie podczas których dochodzi do dimeryzacji i tworzenia amyloidów. Są one bezpośrednio związane z występowaniem zaburzeń neurodegeneracyjnych, m.in. choroby Alzheimerera oraz dziedzicznej amyloidowej angiopatii mózgowej (HCCAA). Jednym ze związków efektywnie hamujących dimeryzację hCC jest przeciwciało monoklonalne HCC3. Dokładna charakterystyka kompleksu hCC-HCC3 oraz określenie miejsc wiązania może potencjalnie przyczynić się do opracowania skutecznej metody leczenia niektórych chorób człowieka. Dobór tematyki badawczej recenzowanej dysertacji uważam zatem za trafny i uzasadniony.



Recenzowaną pracę Pani mgr Moniki Rafalik stanowi przygotowane w języku polskim klasyczne opracowanie liczące 155 stron, zawierające 70 rysunków, 13 tabel, 1 wykres oraz 6 załączników umieszczonych na końcu pracy. Rozprawa podzielona jest na następujące części: wprowadzenie, cel pracy, część eksperymentalna, omówienie wyników, podsumowanie. Pracę uzupełnia wykaz skrótów umieszczony na jej początku oraz zawarte na końcu dysertacji: dorobek naukowy Doktorantki, spis rysunków, tabel i wykresów oraz bibliografia obejmująca 199 pozycji. Jednakże, w pracy wystąpił błąd w numeracji rozdziałów; rozdziały „Omówienie wyników” i „Podsumowanie” są oznaczone tym samym numerem (IV). Należy również zwrócić uwagę na brak typowych dla tego typu pracy rozdziałów, tj. dyskusji wyników oraz wniosków. Doktorantka nie zawarła również streszczenia pracy. Rozprawa doktorska przygotowana jest jednak starannie i przejrzysto. Posiada stosunkowo dobrze dopracowaną stronę graficzną, w większości klarowne ryciny, tabele i wykresy.

Wprowadzenie, zawarte na 37 stronach, stanowi bardzo obszerny i dokładny opis podjętej tematyki. Napisany jest przejrzysto i starannie pod względem stylistycznym. W części tej można znaleźć jedynie kilka niewielkich błędów literowych, językowych i stylistycznych (np. strony 17, 18, 36, 37). W pierwszym podrozdziale Doktorantka szczegółowo charakteryzuje ludzką cystatynę C (jej strukturę, funkcje, rozpowszechnienie w organizmie, choroby związane ze zmianą poziomu cystatyny C w organizmie, mechanizm dimeryzacji, oligomeryzacji i agregacji hCC oraz czynniki ograniczające jej dimeryzację). Następnie opisuje przeciwciała (ich właściwości i funkcje pełnione w organizmie, budowę, biosyntezę i zastosowanie w medycynie). W ostatniej części wprowadzenia dokonuje opisu metod identyfikacji miejsc wiążących między antygenem a przeciwciałem (wycinanie i ekstrakcja epitopu oraz wycinanie paratopu, testy immunoenzymatyczne oraz wymiana wodoru-deuterium połączona ze spektrometrią mas). Do opisów Doktorantka dołączyła 26 rysunków. Ta część pracy nie budzi zastrzeżeń Recenzenta. Świadczy o bardzo dobrej znajomości tematyki badawczej oraz umiejętności korzystania z piśmiennictwa. Należy jednak zaznaczyć, iż duża część cytowanych prac została opublikowana ponad 10 lat temu. Ponadto część rysunków załączonych do wprowadzenia mogłaby być lepszej jakości (np. rysunek 1, 14).

Cel pracy oraz krótką charakterystykę jej założeń Doktorantka przedstawiła na jednej stronie maszynopisu. Podstawowym celem badań Pani mgr Moniki Rafalik była



charakterystyka kompleksu hCC-HCC3, którą Doktorantka postanowiła zrealizować poprzez wykonanie 6 zadań badawczych:

- identyfikację epitopu w kompleksie metodą wycinania i ekstrakcji epitopu,
- sprawdzenie powinowactwa syntetycznych peptydów otrzymanych w oparciu o wyniki identyfikacji epitopu metodą wycinania i ekstrakcji za pomocą chromatografii powinowactwa oraz testu immunoenzymatycznego,
- identyfikację epitopu w kompleksie hCC-HCC3 metodą wymiany wodoru- deuter sprzężonej ze spektrometrią mas,
- charakterystykę przeciwciała HCC3 metodą spektrometrii mas,
- określenie struktury pierwszorzędowej przeciwciała HCC3,
- próbę identyfikacji paratopu w kompleksie HCC3-hCC z wykorzystaniem teoretycznego przewidywania Chothia i Kabata, metody wymiany wodoru- deuter sprzężonej ze spektrometrią mas i metody Parexprot.

Cel pracy oraz sposoby jego osiągnięcia został przedstawiony prawidłowo. W tej części zabrakło mi jednak bardziej szczegółowej charakterystyki założeń pracy oraz chociażby krótkiej informacji na temat jej potencjalnego praktycznego znaczenia.

W kolejnym rozdziale, zatytułowanym „Część eksperymentalna” Doktorantka z dużą dokładnością opisuje zastosowane metody. W części tej znalazły się bardzo szczegółowe opisy syntezy peptydów, wykorzystanych metod chromatograficznych, elektroforetycznych oraz spektrometrycznych, a także procedury otrzymywania ludzkiej cystatyny C i metod stosowanych do charakterystyki przeciwciała HCC3. Do tej części również nie mam dużych zastrzeżeń. Jednak uważam, że cennym uzupełnieniem tego rozdziału byłby dokładniejszy opis produkcji przeciwciał monoklonalnych. Opis ten wraz z podaniem charakterystyki komórek produkujących przeciwciała mógłby być ważnym elementem interpretacji wyników. Chciałbym także zwrócić uwagę, że podczas opisywania otrzymywania cystatyny C, Doktorantka osad powstały po wirowaniu, niefortunnie nazywa „pastylką”. Zdecydowanie sugeruję używanie terminu „osad komórkowy”. Wartościową częścią tego rozdziału pracy są precyzyjne schematy, np. schemat syntezy peptydu na nośniku stałym czy schematyczne przedstawienie ważniejszych etapów charakterystyki przeciwciała HCC3. Ułatwiają one śledzenie kolejnych etapów pracy oraz technik doświadczalnych.



W rozdziale „Omówienie wyników” Doktorantka szczegółowo omawia rezultaty przeprowadzonych doświadczeń. Wyniki są przedstawione klarownie z podziałem na 4 części: otrzymywanie ludzkiej cystatyny C, charakterystyka przeciwciała HCC3, identyfikacja epitopu w kompleksie hCC-HCC3 oraz próby identyfikacji paratopu HCC3. Dużym atutem tej części pracy jest również graficzna prezentacja wyników. Wszystkie analizy zostały zaplanowane i wykonane prawidłowo. Właściwie dobrano metody badawcze. Podczas realizacji pracy Doktorantka wykorzystowała szereg metod in. syntezę peptydów na nośniku stałym, spektrometrię mas, elektroforezę SDS-PAGE i metody chromatograficzne. Dokonała również izolacji i oczyszczania ludzkiej cystatyny C. Autorka zrealizowała postawione cele badawcze. Dowiodła, że oddziaływanie HCC3 nie zależy bezpośrednio od struktury przestrzennej, ale od sekwencji wiążanego białka. Dokonała także charakterystyki przeciwciała HCC3 poprzez określenie jego masy, jakościowego i ilościowego profilu oligosacharydów oraz sekwencji. Dzięki analizie z wykorzystaniem kilku metod badawczych zidentyfikowała epitop w kompleksie hCC-HCC3. Określiła również paratop HCC3. Zwłaszcza część pracy poświęcona identyfikacji epitopu świadczy o dużej umiejętności poszukiwania kompleksowego rozwiązania problemu badawczego na podstawie racjonalnego dobierania właściwych metod eksperymentalnych.

W pracy zabrakło mi jednak właściwej dyskusji wyników. Co prawda Doktorantka podczas omawiania rezultatów dokonuje ich interpretacji, ale bardziej szeroka i szczegółowa dyskusja zdecydowanie podniosłaby wartość naukową dysertacji. Jedyne w podrozdziale 3, dotyczącym identyfikacji epitopu w kompleksie hCC-HCC3 zostało przedstawione podsumowanie, w którym Doktorantka krytycznie porównuje rezultaty uzyskane różnymi metodami, analizując rozbieżności w wynikach uzyskanych przy pomocy każdej z nich. Podobna analiza byłaby przydatna w pozostałych zadaniach badawczych. W ostatniej części rozprawy Pani mgr Monika Rafalik dokonuje krótkiego podsumowania uzyskanych rezultatów. Na końcu pracy warto by było również przedstawić ogólne wnioski płynące z analizy otrzymanych wyników, o co proszę Doktorantkę w trakcie publicznej obrony pracy. Czy Autorka widzi jakieś możliwości praktycznego wykorzystania rezultatów swojej pracy?

Na uwagę zasługuje stosunkowo wysoki dorobek naukowy Doktorantki. W jego skład wchodzi 2 publikacje oryginalne oraz 11 doniesień konferencyjnych (2 prezentacje ustne i 9 posterowych). Co ważne, wszystkie wystąpienia konferencyjne, zarówno polskie





i zagraniczne, są związane z tematyką recenzowanej pracy doktorskiej. Dodatkowo część wyników niniejszej rozprawy doktorskiej została opublikowana w *Journal of Proteomics* (IF=3,722), a Pani mgr Monika Rafalik jest pierwszym autorem tej publikacji. Uczestniczyła także w realizacji projektów naukowych, jak również w dwóch kursach dotyczących proteomiki oraz spektrometrii mas. Ponadto w ramach programu Erasmus Doktorantka odbyła trzymiesięczny staż naukowy na Wydziale Biochemii i Biofizyki Medycznej Instytutu Karolinska, podczas którego wykonała część eksperymentów, których wyniki zawarła w niniejszej rozprawie (m.in. identyfikacja paratopu). Wszystko to świadczy o dużym zaangażowaniu i aktywności naukowej Doktorantki.

Chciałbym zaznaczyć, że w realizację zadań badawczych, Autorka włożyła ogromny wkład pracy laboratoryjnej. Dowiodła, że potrafi samodzielnie prowadzić interesujące badania naukowe. Wykazała się znaczną wiedzą teoretyczną i dużymi umiejętnościami praktycznymi. Ponadto rozprawa jest przygotowana starannie pod względem edytorskim i stylistycznym. W całej pracy można znaleźć jedynie kilka błędów językowych, stylistycznych i tzw. „literówek”. Nie mają one jednak wpływu na ogólnie bardzo dobrą ocenę recenzowanej dysertacji.

**Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Rafalik pt. „Badanie oddziaływań ludzkiej cystatyny C z monoklonalnym przeciwciałem HCC3” spełnia ustawowe oraz zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Moniki Rafalik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wysoki poziom rozprawy oraz przedstawione bardzo obszerne wyniki badań wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie pracy.**

Dr hab. n. med. Michał Pikuła