



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii

data 14.09.2023 r.

dr hab. inż. Rafał Piątek, prof. uczelni

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Czechowskiej-Kryszk pt. **„Chemiluminogenne pochodne akrydyny jako nowe odczynniki przydatne w badaniach immunochemicznych”**.

Poniższa recenzja została wykonana w odpowiedzi na decyzję Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku, z dnia 5 lipca 2023, powołującej mnie do komisji doktorskiej w roli recenzenta, na podstawie następujących dokumentów:

- 1) egz. rozprawy doktorskiej;
- 2) spis dorobku naukowego;
- 3) regulamin wyróżniania doktoratów.

Jednoznacznie stwierdzam, że udostępnione mi dokumenty są kompletne, zarówno pod względem formalnym, jak i merytorycznym. Zapoznanie się z ww. materiałami pozwoliło mi na przygotowanie przedkładanej recenzji.

Ocena formy pracy i dorobku naukowego

Przedstawiona do oceny dysertacja została wykonana w Pracowni Badań Luminescencyjnych Katedry Chemii Fizycznej Wydziału Chemii UG pod promotorstwem Pana dr. hab. prof. UG Karola Krzymińskiego, oraz jako promotora pomocniczego Pani dr inż. Beata Zadykowicz. Praca ma formę rozprawy doktorskiej o łącznej liczbie stron: 91. Zasadnicza część pracy składa się z streszczenia, abstraktu w języku angielskim, wstępu, celu pracy, metodyki badań wyników z dyskusją, listą dorobku naukowego oraz literaturą. Dołączone jako załącznik publikacje stanowią bardzo istotny element rozprawy, wręcz bez ich udziału w wielu miejscach byłaby ona niezrozumiała, dotyczy to w szczególności metodyki i wyników. W tej sytuacji przed każdą publikacją warto byłoby zrobić wstęp, który jasno wskazywałby jaki był w niej udział

Doktorantki, a jakie badania były robione przez inne osoby. Doktorantka starała się w treści pracy określać swój udział w danym etapie badań, jednak nie było to konsekwentne.

Dorobek naukowy Doktorantki jest zamieszczony na stronach 83-85 rozprawy doktorskiej oraz został załączony jako oddzielny dokument. Doktorantka jest współautorką 4 publikacji z listy filadelfijskiej, w jednej z nich jest pierwszą autorką. Pod pozycją 5D w wykazie znajduje się polski patent. Dodatkowo Doktorantka wykazała 5 komunikatów ustnych, w tym jeden zagraniczny oraz 6 plakatów, w tym 3 prezentowane na konferencjach zagranicznych. Doktorantka brała udział w realizacji 5 projektów badawczych, w tym dwóch finansowanych przez NCN. Dorobek naukowy oraz doświadczenie laboratoryjne Doktorantki określam jako istotne.

Ocena merytoryczna osiągnięcia naukowego

Cele naukowe zawarte w pracy zostały w pełni zrealizowane przez Doktorantkę i opisane w rozprawie i dołączonych publikacjach. Ze względu na fakt, że znaczna część badań została opublikowana w 4 publikacjach naukowych i tym samym wyniki te podległy wnikliwej, pozytywnej ocenie, recenzent nie widzi konieczności ich dalszej dyskusji. Doktorantka wskazuje, że głównymi celami jej pracy było: dobranie optymalnych warunków przebiegu chemiluminescencji badanych związków oraz ich koniugatów z przeciwciałami w warunkach testu immunochemicznego. Jako recenzent krótko określiłbym charakter pracy, jako zdefiniowanie warunków konfekcjonowania układu detekcji immunochemicznej opartej na wykorzystaniu związków akrydyniowych, jako emiterów luminescencji. Konfekcjonowanie produktu, w tym przypadku koniugatów badanych związków z przeciwciałami jest kluczowym elementem, ponieważ decyduje o użyteczności uzyskanych związków. Doktorantka w tym kontekście przeprowadziła szereg badań obejmujących między innymi określenie rodzaju stosowanej zasady, pH reakcji, warunków reakcji sprzęgania, metodyki oczyszczania koniugatów oraz określenie wpływu rodzaju detergentu, co według recenzenta było najistotniejsze. Jako recenzent mam następujące sugestie, zapytania dotyczące prowadzonych badań:

1. W pracy, jako kryterium sukcesu dla reakcji sprzęgania badanych związków z przeciwciałami uznano zachowanie funkcjonalności przeciwciał – wiązanie antygeny oraz efektywność luminescencji. Jest to oczywiście najlepsze kryterium, bo istotne z punktu widzenia konstrukcji narzędzia do immunochemii. Zdaniem recenzenta należałoby jednak lepiej scharakteryzować przeciwciała po reakcji koniugacji (IgG-Z) np. chromatogramy sączenia molekularnego, określenie metodami spektroskopowymi liczby molekuł znacznika przypadających na przeciwciało, określenia stabilności koniugatów np. przez zastosowanie kalorymetrii DSC – wyznaczenie termogramu, temperatury topnienia i entalpii przemiany.
2. W części pracy dotyczącej badania własności luminogennych koniugatów IgG-Z w reakcji z antygenem w postaci ludzkich przeciwciał IgG Doktorantka jako odnośnik stosuje znacznik komercyjny oznaczany w pracy jako C, który należy do tej samej grupy związków, co oryginalne, badane związki Z1-Z5. To podejście pozwala jedynie na porównanie efektywności chemiluminescencji badanych związków w stosunku do jednego komercyjnie dostępnego znacznika luminescencyjnego. Celem Doktorantki było stworzenie narzędzia do immunochemii,

które konkurowałyby z dostępnymi na rynku układami ELISA i CLIA. Zdaniem recenzenta Doktorantka już na tym etapie powinna dokonać porównania efektywności wybranych, otrzymanych koniugatów z komercyjnymi antyludzkimi przeciwciałami znakowanymi HRP, gdzie jako substrat wykorzystywany byłoby dla ELISA złoty standard jakim jest dichlorowodorek o-fenylendiaminy, a dla CLIA luminol. Ten etap porównania nie jest obciążony ‘problemami związanymi’ z oddziaływaniami surowic z antygenami.

3. Ostatni etap wynikowy rozprawy dotyczy wykorzystania otrzymanych koniugatów IgG-Z w reakcji CLIA do detekcji przeciwciał IgG skierowanych przeciwko antygenom *T. gondii* w ludzkich surowicach. Zdaniem recenzenta jest to kluczowy etap pracy, ponieważ definiuje potencjalną konkurencyjność uzyskanych związków w immunochemii. Doktorantka wykonywała test w oparciu o chimeryczny antygen *T. gondii*, wykorzystując jako odnośnik II-rzędowe przeciwciała antyludzkie znakowane peroksydazą oraz dichlorowodorkiem o-fenylendiaminy jako substratem. Zdaniem recenzenta taki układ porównawczy jest niewystarczający. Do badań należałoby włączyć dodatkowo reakcję chemiluminescencji opartą na komercyjnie dostępnych substratach np. luminol lub jego pochodne. Dodatkowo dobrze byłoby się oprzeć na w pełni komercyjnym teście CLIA (np. płytki opłaszczane pełnym lizatem *T. gondii*), w którym zastąpione zostałyby komercyjne II-rzędowe przeciwciała oryginalnymi koniugatami Doktorantki. Takie podejście pozwoliłoby lepiej zdefiniować zalety i wady stworzonego układu do detekcji chemiluminescencyjnej w stosunku do komercyjnych standardów.

Ocena edytorska pracy

Praca zawiera liczne błędy edytorskie, których nie będę wymieniać, zapewne Doktorantka odkryła je sama. Za najbardziej istotne dla recenzenta błędy należy uznać: niekonsekwentne oznakowanie koniugatów Ig-Z lub IG-AE (str. 5 znaczenie stosowanych skrótów, str. 78), naprzemiennie pisanie wyrazów toxoplasmoza przez ‘x’ lub przez ‘ks’, w łacińskiej nazwie pasożyta człon określający gatunek ‘gondii’ pisany z dużej literatury (np. str. 77), zapewne autokorekta. Bardzo ciekawy jest tytuł rozdziału 4.6 Toxoplasmoza gondii, chyba powinno być ‘Toxoplasmoza albo Toksoplasmoza’ jako jednostka chorobowa lub Toxoplasma gondii jeżeli chodziłoby o pasożyta (podobnie str. 45). Na stronie 6 pojawia się sformułowanie: „...pacjentów zakażonych *T. gondii*...”, w przypadku pasożytów lepiej stosować określenie zarażonych. Podobnie na str. 32 pojawia się stwierdzenie: „Infekcja *T. gondii* u osób...” lepiej stosować określenie ‘inwazja’ w odniesieniu do pasożyta. Niefortunne określenie: ‘...osób negatywnych na ten antygen...’ (str. 77), lepiej pisać o osobach seronegatywnych. Na str. 43 podtytuł „Otrzymywanie i izolacja koniugatów białko-znacznik (IgG-Z)” jest nieadekwatny do treści paragrafu, który opisuje reakcję CLIA dla układu IgG-ludzkie z II-rzędowe anty-ludzkie IgG-Z. Nieopisany panel rysunku 14 na stronie 48. Rysunek 21 str. 64 użycie na wykresie dwóch odcieni niebieskiego powoduje nieczytelność. Na stronie 71 Doktorantka pisze o reakcji pierwszorzędowych grup aminowych zawartych np. w resztach cysteinowych.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Justyny Czechowskiej-Kryszk jest nowatorska i ma istotną wartość naukową potwierdzoną czterema publikacjami naukowymi. Dysertacja ze względu na swój rozprawowo-publikacyjny charakter dość trudna w czytaniu i analizie. Doktorantka osiągnęła zaplanowane cele tj. określenie optymalnych warunków reakcji chemiluminescencji badanych związków i ich koniugatów z przeciwciałami w kontekście reakcji immunochemicznych. Doktorantka przeprowadziła wstępną weryfikację przydatności otrzymanych koniugatów IgG-Z w reakcji CLIA detekcji przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom *T. gondii* występującym w surowicach ludzkich. Doktorantka w treści rozprawy wspomniała o dalszych planach publikacyjnych opartych o wyniki uzyskane w trakcie realizacji opisanych badań. Rozprawa doktorska oraz zaprezentowany dorobek naukowy świadczą o dużej wiedzy Doktorantki i praktycznych umiejętnościach w zakresie szeroko pojętej chemiluminescencji.

W związku z powyższym oświadczam, że przedłożona dysertacja doktorska spełnia wszelkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Badania wykonane przez Doktorantkę mogą mieć istotne znaczenie o szeroko pojętym charakterze poznawczym i praktycznym. Równocześnie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Justyny Czechowskiej-Kryszk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Gdańsk, 14.09.2023 r.

dr hab. inż. Rafał Piątek, prof. uczelni