

Gdańsk, 2024-01-10

## Recenzja

rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Justyny Czechowskiej-Kryszk zatytułowanej

*„Chemiluminogenne pochodne akrydyny jako nowe odczynniki przydatne w badaniach*

*immunochemicznych”*

Pomimo ciągłej poprawy jakości diagnostyki obrazowej oraz technik analitycznych wykorzystywanych w bioanalizie, wiele chorób pozostaje trudne do rozpoznania na odpowiednio wczesnym etapie, znacznie zwiększającym szanse na uzyskanie sukcesu terapeutycznego. Aktualnie wysokim zainteresowaniem badaczy cieszą się procedury diagnostyki immunologicznej opartej na znakowaniu chemiluminescencyjnym, które wykazują się m.in. wysoką czułością pozwalającą na wykrywanie śladowych ilości molekuł i stosunkowo krótkim czasem uzyskania wyniku. Ze względu na względnie proste metody otrzymywania związki z grupy estrów akrydyniowych należą do jednej z najważniejszych grup związków wykorzystywanych w tego typu oznaczeniach. Chociaż znaczniki akrydyniowe po raz pierwszy z sukcesem zastosowano w diagnostyce medycznej ok. 40 lat temu, to nadal do najważniejszych wyzwań badawczych należy zwiększanie wydajności kwantowej chemiluminescencji.

W ten obszar badawczy perfekcyjnie wpisuje się oceniana praca doktorska mgr Justyny Czechowskiej-Kryszk wykonana pod kierunkiem dr hab. Karola Krzywińskiego, prof. UG pełniącego funkcję Promotora oraz dr inż. Beaty Zadykowicz jako Promotor pomocniczej w Pracowni Badań Luminescencyjnych, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Jest podsumowaniem badań nad

właściami fizykochemicznymi i zastosowaniami związków pochodnych kwasu akrydyno-9-karboksylowego, prostych monoestrów akrydyniowych oraz bardziej złożonych strukturalnie układów znaczników chemiluminescencyjnych. Wyniki badań opisywane w dysertacji przez Doktorantkę a dotyczące bezpośrednio ocenianej rozprawy opublikowane zostały w czterech artykułach oryginalnych w renomowanych czasopismach naukowych takich jak: *Organic and Biomolecular Chemistry*, *Journal of Luminescence*, i *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* oraz w jednym wniosku patentowym złożonym do Urzędu Patentowego RP. Wszystkie wyżej wymienione prace ukazały się w latach 2016 – 2018 a patent na wynalazek nr 240086 udzielony został w 2021 roku. Sumaryczna wartość współczynnika wpływu (*Impact Factor*, IF) czterech publikacji to 12,9. W jednym z wyżej wymienionych artykułów Pani mgr Justyny Czechowska-Kryszk jest pierwszym autorem oraz raz drugim autorem. Ponieważ oceniana rozprawa nie stanowi cyklu publikacji jako osiągnięcia w rozumieniu przepisów, stąd też nie są wymagane oświadczenia określające wkład poszczególnych autorów w powstanie dzieła. Niemniej jednak na podstawie opisu na str. 81 potwierdzonego udziałem wśród autorów publikacji i patentu można sądzić, że Doktorantka odegrała istotną rolę w realizacji badań oraz powstawaniu prac. Wyniki badań mgr Justyny Czechowskiej-Kryszk były przedstawiane podczas krajowych i międzynarodowych konferencji zarówno w postaci wystąpień ustnych jak i prezentacji plakatowych. Doktorantka brała udział jako wykonawca w dwóch projektach finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki („Nowe odczynniki do badań immunochemicznych na bazie indykatorów i znaczników akrydynowych połączonych z białkami” w latach 2013 - 2016 oraz „Chemiluminescencyjne i luminescencyjne indykatory i znaczniki akrydyniowe /akrydynowe/akrydonowe – synteza, struktura, właściwości fizykochemiczne i luminogenne, zastosowania” w latach 2011 - 2014) oraz była kierownikiem trzech projektów w ramach Badań Młodych Naukowców finansowanych przez Uniwersytet Gdański w latach 2015 - 2017.

Rozprawa doktorska mgr Justyny Czechowskiej-Kryszk jest w języku polskim i ma charakter klasycznej rozprawy doktorskiej napisanej w formie monografii naukowej. We wstępie obejmującym

ok. 30 stron przedstawione są podstawowe informacje z zakresu chemiluminescencji soli akrydyniowych, zastosowania chemiluminogennych pochodnych akrydyny, indykatorów i znaczników luminescencyjnych oraz wybrane zagadnienia dotyczące badań immunodiagnostycznych i zastosowania immunodiagnostycznych układów chemiluminezujących. Krótko omówiono także problem kliniczny jakim jest wywoływana przez pasożyta wewnątrzkomórkowego *Toxoplasma gondii* jednostka chorobowa toksoplazmoza, stanowiąca poważny problem u osób z zaburzeniami odporności oraz niemowląt. Przedstawienie wyników badań poprzedza cel i uzasadnienie podjęcia tematu badań rozprawy doktorskiej.

Wyniki badań i ich dyskusja zostały omówione na 40 stronach tekstu (w tym 10 tabel i liczne ryciny - 28). Całość dysertacji kończy 'Dorobek naukowy' mgr Czechowskiej-Kryszk oraz spis piśmiennictwa określony jako 'Literatura cytowana'. Integralną częścią dysertacji są załączniki I i II, w których zebrane zostały i przedstawione publikacje współautorstwa mgr Czechowskiej-Kryszk z udziałem na ich tematykę. I tak Załącznik I przedstawia dokonania opublikowane w ramach badań fizykochemicznych soli estrów akrydyniowych a Załącznik II jest zbiorem dwóch publikacji oraz wniosku patentowego dotyczących badań immunodiagnostycznych koniugatów przeciwciał IgG z akrydyniowym znacznikiem chemiluminescencyjnym na modelu toksoplazmozy. Jest to bardzo dobre podejście, ponieważ pozwala całościowo spojrzeć na problematykę badawczą podejmowaną w badaniach opisaną w dysertacji a przedstawioną w publikacjach, a także kompleksowo ocenić efekty i jakość realizowanych badań. Całość dysertacji, wraz z chronologicznie przedstawionym dorobkiem naukowym oraz załączonymi publikacjami i wnioskiem patentowym to prawie 300 stronicowe dzieło. Rozprawę uzupełniają streszczenie w języku polskim i angielskim, oraz wykaz skrótów.

Podstawowym celem badań Doktorantki było poszukiwanie zależności pomiędzy procesami emisyjnymi a właściwościami chemiluminogennymi i fizykochemicznymi układów opartych na otrzymanych uprzednio związkach soli akrydyniowych. Osiągnięcie tego celu możliwe było poprzez zrealizowanie kolejnych etapów polegających na: i) dobraniu optymalnych warunków przebiegu



procesów chemiluminescencyjnych takich jak środowisko reakcji, stężenia reagentów czy optymalizacja aparatury pomiarowej; ii) zbadaniu, w grupie podstawionych pochodnych akrydyniowych, wpływu rodzaju użytych zasad oraz obecności surfaktantów na wydajności reakcji i kinetykę emisji CL; iii) dobór i optymalizację parametrów emisji promieniowania znaczników akrydyniowych w środowisku wodnym; iv) opracowanie optymalnej metody sprzęgania i izolacji koniugatów chemiluminogennych znaczników akrydyniowych połączonych z przeciwciałem; v) określenie warunków emisji CL koniugatów chemiluminogennych typu białko-znacznik w środowisku wykonywania badań serologicznych, oraz vi) zmierzenie reaktywności immunodiagnostycznej i w konsekwencji użyteczności otrzymanych koniugatów w reakcjach typu antygen-przeciwciało do potencjalnej diagnostyki toksoplazmozy.

Do wymiernych efektów prowadzonych badań Doktorantki opisanych w rozprawie i opublikowanych pracach oraz uzyskanym patencie należą:

- opracowanie oryginalnych układów luminogennych składających się z monoestrów akrydyniowych i zoptymalizowanie ich właściwości emisyjnych w tym dla układów zawierających środki powierzchniowo-czynne jako substancje pomocnicze;
- scharakteryzowanie parametrów emisyjnych oryginalnych koniugatów o potencjalnym znaczeniu immunodiagnostycznym w oparciu o pomiar intensywności emisji chemicznie generowanego światła;
- uzyskanie wyższej czułości i specyficzności opracowanych testów immunochemicznych opartych o odczyty chemiluminescencji (CLIA) pod kątem różnicowania pacjentów zakażonych *T. gondii* od osób zdrowych w porównaniu do standardowo wykorzystywanych testów enzymatycznych typu ELISA.

Czytając dysertację oraz załączone publikacje nasunęły mi się następujące pytania i komentarze. Czym konkretnie, zdaniem Doktorantki, kierowano się przy wyborze związków Z1, Z3 i Z4

do dalszych analiz chemiluminescencyjnych (str. 69)? Pisząc o uzyskanych wysokich współczynnikach  $R^2$  dla wykresów kalibracyjnych badanych znaczników chemiluminescencyjnych (Rys. 25), czy wzięto pod uwagę szeroki zakres analizowanych stężeń, co może mieć korzystny wpływ na obserwowane parametry równania regresji? Dla związku Z4 na Rysunku 25 zabrakło zaznaczenia kilku punktów stężeń na wykresie albo nieprawidłowo wykreślono linię regresji. Czy wyniki analizy względnej intensywności integralnej emisji (RCLE) przedstawione na Rysunkach 26, 27, 28 i 29 pochodzą z jednorazowych pomiarów czy są wynikami średnimi? Jakie znaczenie miało stężenie związków powierzchniowo-czynnych użytych do optymalizacji warunków emisji CL (Rysunek 29)?

Powyższe uwagi i pytania nie wpływają na ogólną wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Praca doktorska mgr Justyny Czechowskiej-Kryszk ma walory nowości i oryginalności naukowej. Dysertacja potwierdza wysoką wiedzę i umiejętności Kandydatki do stopnia naukowego doktora nauk chemicznych. Zawiera także elementy wyników potencjalnie atrakcyjne do komercyjnego wykorzystania co zostało udokumentowane przyznaniem w 2021 roku patentem RP. Rozprawa doktorska mgr Justyny Czechowskiej-Kryszk spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.).

Biorąc powyższe pod uwagę wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Justyny Czechowskiej-Kryszk do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dyscyplinie nauki chemiczne.

KIEROWNIK ZAKŁADU  
Biofarmacji i Farmakokinetyki  
  
prof. dr hab. Michał J. Markuszewski

