

Dr hab. Zbigniew Warkocki, prof. ICHB PAN
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Zakład Metabolizmu RNA

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marii Łęckiej pt. „Otrzymywanie przeciwciał IgY specyficznych wobec białka tNOX i jego wybranych epitopów”

Praca doktorska mgr inż. Marii Łęckiej została wykonana w Zakładzie Chemii Medycznej i Mikrobiologii, Katedrze Chemii Organicznej i Medycznej, Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej. Promotorem pracy jest dr hab. Marcin Sieńczyk, prof. uczelni.

W tytule pracy zastosowano nazwę białka tNOX, podczas gdy w całej pozostałej rozprawie białko to nazywane jest ENOX2. Obie nazwy dotyczą tego samego białka i są akceptowane w literaturze naukowej, co autorka zaznacza we wprowadzeniu. W obrębie rozprawy, i każdej innej pracy naukowej, powinno się jednak konsekwentnie używać tej samej nazwy.

Wprowadzenie do tematyki – przedmiot i cele rozprawy

Przedmiotem przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej są ludzkie białko ENOX2 oraz kurze przeciwciała żółtkowe, IgY. Celem pracy było natomiast wyprodukowanie przeciwciał IgY specyficznie rozpoznającego białko ENOX2 lub jego peptydowe fragmenty, które można by wykorzystać do detekcji tego białka w testach diagnostycznych nowotworów. We wprowadzeniu do pracy autorka zwięźle i w uporządkowany sposób przedstawia syntezę kilku poruszanych tematów. W pierwszej kolejności pokrótce opisując skalę wyzwań związanych z diagnostyką i terapią chorób nowotworowych. W dalszej części autorka opisuje czym są markery nowotworowe oraz jakie jest ich zastosowanie, aby przejść do charakterystyki białek zewnątrzkomórkowych oksydaz zwanych ENOX obecnych w różnych organizmach od roślin do zwierząt, wśród których wyróżnia ENOX1, ENOX2 i arNOX. U człowieka białko ENOX2 jest związane z nowotworami i obecne na powierzchni komórek nowotworowych, z której może być uwalnianie. W efekcie staje się dostępne do detekcji w surowicy osób, u których rozwija się nowotwór. Tym samym ENOX2 jest potencjalnym markerem nowotworowym. Dalszą część wprowadzenia autorka poświęca przeciwciałom opisując ich ogólne zastosowania, a następnie opisuje kurze przeciwciała IgY, porównuje ich charakterystykę molekularną z przeciwciałami ssaczymi IgG oraz opisuje dotychczasowe zastosowanie przeciwciał IgY. Spośród wymienionych przez autorkę zalet produkcji przeciwciał IgY specyficznie rozpoznających ludzkie epitopy są m.in. wyższe prawdopodobieństwo skutecznej immunizacji zwierząt wynikające z dalszego pokrewieństwa filogenetycznego kur względem człowieka, aniżeli ma to miejsce w przypadku myszy czy królika, oraz stosunkowo łatwe i etycznie nie budzące oporu pozyskiwanie przeciwciał z żółtka jaja kurzego, w przeciwieństwie do skrwawiania zwierząt np. królików.

Opinia o przedstawionej do oceny rozprawie

Rozprawa doktorska pani mgr inż. Marii Łęckiej dokumentuje ambitny plan badawczy, którego celem było pozyskanie kurzych przeciwciał IgY skierowanych na ludzkie białko ENOX2, będące potencjalnym markerem nowotworowym, celem opracowania prototypów oznaczeń w diagnostyce nowotworowej. Plan badań był bardzo szeroki i obejmował kompletny proces tworzenia przeciwciał od wyboru epitopów, poprzez immunizację kur i ocenę postępów w produkcji przeciwciał, oczyszczanie przeciwciał IgY metodą precypitacyjną i oczyszczanie przeciwciał antygenowo specyficznych metodą chromatografii powinowactwa, charakterystykę biochemiczną oczyszczonych przeciwciał, ich sprzęganie z grupami funkcyjnymi i ostatecznie ich wykorzystanie do detekcji ENOX2 z zastosowaniem różnych metod obejmujących test sandwich ELISA, western blot i mikroskopię. Sumarycznie wykonanie planu badań obejmujące zastosowanie wszystkich wymienionych (i kilku niewymienionych) podejść badawczych powinno zapewnić doktorantce szerokie zrozumienie przeprowadzania wieloetapowego procesu eksperymentalnego oraz zapewnić jej praktykę w przeprowadzaniu wielu bardzo różnych oznaczeń. W realizacji badań autorka nawiązała współpracę z ekspertami w różnych dziedzinach m.in. spektrometrii masowej, weterynarii, czy onkologii. Jest to atutem pracy. Największym atutem pracy jest obietnica wytworzenia nowoczesnych molekularnych narzędzi diagnostycznych w oparciu o przeciwciała i znane podejścia metodyczne. Zatem z punktu widzenia *stricte* naukowego praca cechuje się ograniczoną nowatorskością, gdyż nie opisuje nieznanych dotychczas procesów czy funkcjonalności komponentów biologicznych.

Końcowy efekt pracy, jak wiadomo, wieńczy dzieło. Takim efektem wyrażonym w liście celów pracy było opracowanie prototypów testów diagnostycznych w kierunku małoinwazyjnej lub nieinwazyjnej diagnostyki nowotworów. Pomimo sukcesów w wykonaniu poszczególnych celów cząstkowych, tego ostatecznego celu nie udało się osiągnąć. W moim odczuciu wraz z zaawansowaniem realizacji projektu jakość wykonania poszczególnych zadań spadała, a analiza zaprezentowanych wyników skłania ku przekonaniu, że analizy wykonano dość „powierzchniowo”. Mam również wrażenie, że możliwe było przeprowadzenie bardziej wnikliwych analiz wstępnych. W dalszej części recenzji przystępuję do analizy szczegółowej rozprawy rozpoczynając od sekcji wyników.

Uwagi szczegółowe dotyczące wyników

Część zatytułowaną „badania własne” rozpoczynają analizy obliczeniowe wykonane z zastosowaniem narzędzi bioinformatycznych. Autorka przedstawia analizę sekwencji białka ENOX2 celem zdefiniowania fragmentów sekwencji o najwyższym potencjale immunogennym. Następnie analizuje m.in. potencjalną strukturę ENOX2 oraz wybranych fragmentów peptydowych tego białka w oparciu o narzędzia wykorzystujące homologię strukturalną. We wprowadzeniu autorka pokrótce przytacza literaturę, w której udowodniono istnienie 10 wariantów białka ENOX2 o masach cząsteczkowych w zakresie od 34 do 94 kDa. Autorka nie wykonała jednak analiz pod kątem ekspresji ENOX2 w różnych nowotworach i tkankach oraz nie przeanalizowała możliwości specyficznego wzbogacenia różnych izoform ENOX2 w różnych nowotworach czy tkanek. Uprzejmie proszę o rozwinięcie tej tematyki w kontekście fragmentów peptydowych wybranych do produkcji peptydowo-specyficznych IgY. Czy można określić w jakich tkankach i jakiego typu nowotworach zaproponowane

epitopy charakteryzowałyby się największą wartością diagnostyczną? Uprzejmie proszę również o przygotowanie analizy ekspresji białka ENOX2 w różnych typach nowotworów w oparciu o dostępne online bazy danych i narzędzia do wizualizacji.

Czy ze względu na bardzo wysokie podobieństwo sekwencji ENOX1 i ENOX2 obejmujące nieprzerwane ciągi kilkunastu aminokwasów identycznych w obu białkach rozważono i sprawdzono reaktywność anti-ENOX2(292-610) IgY względem ENOX1? Proszę o szersze odniesienie się do tego zagadnienia. Ponadto uważam, że Rysunek 3 zamieszczony we wprowadzeniu, powinien raczej znaleźć się w sekcji z wynikami. Po pierwsze dlatego, że przedstawiona analiza porównawcza ma istotne implikacje w kontekście tej pracy, po drugie ze względu na to, że analiza ta ma porównywalną wartość naukową z innymi wykonanymi przez autorkę analizami *in silico* przedstawionymi w sekcji wyników.

W dalszej części pracy autorka opisuje przygotowanie i oczyszczanie wybranych peptydów ENOX2 za pomocą syntezy chemicznej i HPLC, oraz zgrubną analizę ich struktury za pomocą dichroizmu kołowego. Po tym następuje opis wyników koniugacji peptydów białka ENOX2 z białkami nośnikowymi: BSA, KLH i OVA. W Tabeli 6 udokumentowano ogromną różnicę w obsadzeniu KLH peptydami w porównaniu do BSA i OVA. Szacunkowa ilość peptydów na jedno KLH oscyluje pomiędzy 354 a 980, podczas gdy w dwóch pozostałych przypadkach nie wykracza poza 6. Z czego wynika różnica i jakie mogła mieć konsekwencje dla jakości przeciwciał wytworzonych po immunizacji z koniugatem KLH?

Dalsza część opisuje immunizację kur oraz jej wstępne wyniki. W Tabeli 7 (oznaczonej 3.7.) podsumowuje zakres użytych antygenów i schemat podawania dawek oraz ich skład. W części poświęconej izolacji IgY z żółtek autorka opisuje metodę precypitacji PEGiem błędnie podając nazwisko pierwszego autora cytowanej pracy źródłowej (Polson zamiast Pauly). W dalszych częściach poświęconych oznaczaniu czystości i wstępnej analizie swoistości przeciwciał autorka słusznie zwróciła uwagę na obecność specyficznych przeciwciał zdumiewająco szybko po pierwszej immunizacji i przedstawiła dowód na obecność przeciwciał anti-BSA u części immunizowanych kur, co niestety miało istotne negatywne reperkusje w dalszych częściach pracy. W różnych miejscach w pracy autorka używa wymiennie skrótów „OVA” i „OVO” gdy referuje owoalbuminę białka jaja kurzego (ang. *ovoalbumin*). Białka tego użyto jako alternatywy dla BSA i KLH celem koniugacji z wybranymi peptydami i wykorzystania koniugatów w testach na miano przeciwciał, limitu detekcji i innych. Wstępne analizy awidności i powinowactwa przeciwciał podczas cyklu immunizacji kur oceniam pozytywnie.

W następnych podrozdziałach autorka przechodzi do opisu wyników oczyszczania przeciwciał. Podrozdział poświęcony przygotowaniu złoża chromatografii powinowactwa jest raczej opisem metody niż wynikiem. Oczyszczanie i późniejszą analizę zaplanowano bardzo dobrze, testując 3 różne roztwory elucyjne ze złoża. W tej części zabrakło mi informacji z jakiej wyjściowej ilości IgY uzyskano podane ilości przeciwciał specyficznych. Ile jajek przekłada się na ok 100µg antygenowo specyficznych IgY? Uprzejmie proszę o przedstawienie odpowiednich obliczeń.

Następnie autorka opisuje wyniki szczegółowej analizy biochemicznej oczyszczonych chromatografią powinowactwa przeciwciał poczynając od określenia miana przeciwciał stosując trzy różne metody: ELISA, Western blot oraz dot blot. Uzyskane miana, które w zamyśle reprezentują najniższe stężenia przeciwciał umożliwiające wykrycie antygeny, oscylowały dla większości przeciwciał w okolicach 1 µg/ml, co w porównaniu do przeciwciał polikonalnych IgG jest wynikiem stosunkowo słabym, ale oczekiwanym dla przeciwciał IgY. Dla części epitopów miana były jednak znacząco wyższe.

od 5 do 25 µg/ml. Jest to o tyle istotne, że w kolejnym podrozdziale poświęconym oznaczeniu limitu detekcji autorka zastosowała do detekcji serii rozcieńczeń antygenów oczyszczone przeciwciała w stężeniu 1 µg/ml, czyli poniżej oznaczonego miana (podobnie sprawa ma się w podrozdziale 3.14.). Pomimo tego uzyskując sygnały. W jaki sposób autorka wytłumaczyłaby te wydaje się niespójne wyniki? W dalszych częściach pracy stężenia przeciwciał wykorzystywanych w testach detekcji antygeny są z reguły wyższe niż 1µg/ml. Co istotne autorce udało się wykazać, że przeciwciała względem 3 z 4 wybranych epitopów faktycznie rozpoznają te epitopy zarówno w formie skoniugowanej z białkiem nośnikowym (owoalbumina) jak i obecne na powierzchni rekombinowanego białka ENOX2(292-610), co jest sukcesem tej pracy.

W odniesieniu do przeciwciał specyficznych względem jednego z peptydowych epitopów poczyniono ciekawą obserwację, a mianowicie wykazano, że przeciwciała wykrywają ten epitop ENOX2(483-505) w formie natywnej, najprawdopodobniej α -helisy, co niewątpliwie nadaje takiemu przeciwciału specyficzną funkcjonalność. Niemniej te obserwacje stoją w sprzeczności z informacjami podanymi w podrozdziale 3.13. i na Rysunku 30, z których wynika, że ENOX2(483-505) jest rozpoznawane przez przeciwciała anti-ENOX2(483-505)-BSA/KLH w analizie Western blot przeprowadzonej po rozdiale SDS-PAGE w warunkach redukujących. Faktycznie na podstawie dodatkowych eksperymentów (3.14.) autorka przyznaje, że przeciwciała anti-ENOX2(483-505)-BSA/KLH mogą również rozpoznawać zdenaturowany epitop, choć z niższym mianem.

Uzyskane i scharakteryzowane biochemicznie przeciwciała autorka poddała modyfikacjom poprzez związanie do nich pochodnych biotyny, izotiocyjanianu fluoresceiny (FITC) lub peroksydazy chrzanowej (HRP), po raz kolejny wykonując bardzo szeroki i przeglądowy plan stworzenia i przetestowania przeciwciał możliwych do zastosowania w wielu różnych podejściach badawczych. W opisie procedur autorka używa kilku określeń tej samej metody: sączenie molekularne, chromatografia żelowa, chromatografia wykluczenia oraz filtracja żelowa. W obrębie jednej pracy sugerowałbym zachować spójną terminologię. Zajście pożądaných modyfikacji oraz funkcjonalność modyfikowanych przeciwciał autorka monitorowała stosując różne techniki. W jaki sposób monitorowano postęp i końcowy efekt modyfikacji FITC? Odpowiedniej informacji nie podano ani w wynikach, ani w metodach. Drobną uwagę kieruję w odniesieniu do Rysunku 38, w którym grafika sugeruje oddziaływanie biotyny z HRP, nie streptawidyną.

Zmodyfikowane przeciwciała zostały następnie wykorzystane do przygotowania prototypowych testów diagnostycznych typu sandwich ELISA, oraz przetestowane w kontekście diagnostyki nowotworowej. W mojej ocenie próby przygotowania testu diagnostycznego metodą sandwich ELISA, próby detekcji ENOX2 w lizatach komórkowych i surowicy pacjentów, oraz próby wizualizacji ENOX2 przy pomocy mikroskopii sprawiają wrażenie powierzchownych. Oceniam wszystkie te próby jako nieudane. Tym samym cele pracy zostały osiągnięte tylko częściowo.

Autorka zaprezentowała dwa podejścia do opracowania testu typu sandwich ELISA w celu detekcji ENOX2. Użycie zestawu przeciwciał anti-ENOX2(483-505) IgY i anti-ENOX2(292-610) IgY uważam za słuszne. Kombinację przeciwciał anti-ENOX2(292-610) IgY i anti-ENOX2 IgG uważam za mniej trafioną, ponieważ anti-ENOX2(292-610) może rozpoznawać ENOX1, czego nie sprawdzono, oraz blokować epitopy anti-ENOX2 IgG. Uważam, że należałoby również spróbować kombinacji anti-ENOX2 IgG i anti-ENOX2(292-610) lub peptydowo-specyficznego, a także podjąć próby optymalizacji wstępnych testów, które w zaprezentowanej formie wykazywały zbyt ograniczony zakres dynamiczny detekcji antygeny oraz nie sprawdzono ich w odniesieniu do próbek typu surowica.

Niestety nieudane były również próby detekcji białka ENOX2 w lizatach komórek nowotworowych oraz surowicach pacjentów. W mojej ocenie jakość blotów jest bardzo słaba, co może wynikać z nieodpowiedniego przygotowania próbek lizatów do elektroforezy np. obecności frakcji chromatynowej. Jeśli takie problemy faktycznie miały miejsce sugeruję korzystać z enzymu typu viscolase lub benzonazy celem usunięcia chromatyny. W kontekście uzyskanych wyników kontrolne komercyjnie dostępne przeciwciała anti-ENOX2 IgG umożliwiało detekcję prążka migrującego na poziomie około 40kDa, co może sugerować ekspresję w analizowanych komórkach izoformy ENOX2. Doceniam wnikliwość autorki i oznaczenie BSA/ HSA jako antygenów rozpoznawanych przez testowane białka.

Jako niezadowolające oceniam próby wizualizacji ENOX2 w wykorzystaniem przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie FITC oraz pośrednio poprzez przeciwciała specyficzne względem ENOX2 i następujące barwienie przeciwciałami drugorzędowymi sprzęgniętymi z FITC. W mojej ocenie próby te należało wykonać z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego zapewniającego rozdzielczość w osi z, nieosiągalną przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego. Jaki rodzaj sygnału doktorantka spodziewała się otrzymać zakładając, że ENOX2 wykazuje lokalizacją na zewnętrznej błonie komórkowej? Proszę o eksperyment myślowy lub przykład literaturowy wizualizacji białka zewnątrz błonowego porównawczo za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej. Zamieszczone w wersji drukowanej oraz w wersji pdf zdjęcia wykonane mikroskopem konfokalnym są zbyt ciemne, aby móc je należycie ocenić. Wydaje mi się, że sygnał lokalizuje w cytoplazmie analizowanych komórek, i nie cechuje się lokalizacją powierzchniową jak napisano w pracy. Uważam, że kontrolą dla testowanych przeciwciał powinno być komercyjnie dostępne przeciwciała anti-ENOX2 IgG. Podobnie kontrolę taką należało zastosować w odniesieniu do histochemicznego barwienia tkanek.

Cześć wynikową kończy rozdział zatytułowany „Podsumowanie i wnioski”. Ta część jest bardzo krótka i nie odniesiono się w niej do żadnej innej pracy badawczej, patentu, bądź informacji o działalności komercyjnej. Tym sposobem rozdział ten znacząco odbiega od rozdziałów typu „Dyskusja” w artykułach naukowych i rozprawach doktorskich.

Uwagi szczegółowe dotyczące wprowadzenia

W pierwszych 2 zdaniach rozprawy autorka przedstawia istotność diagnostyki i terapii chorób nowotworowych w kontekście ilości odnotowanych rocznie zachorowań i zgonów, opierając się, jak domniemam, na raporcie WHO z 2018r. Materiał źródłowy zacytowany w tym miejscu tj. referencja nr 1 pochodzi z roku 2012r. Referencje powinny być zawsze podawane z dużą starannością.

Podtytuł 1.1. „*Markery użyteczne w diagnostyce chorób nowotworowych*” nie jest adekwatny do następującej treści, ponieważ autorka w żaden sposób nie odnosi się do chorób nowotworowych. Podtytuł ten powinien raczej brzmieć „*Markery biologiczne użyteczne w diagnostyce chorób*”.

Rysunek 1 jest zorganizowany w sposób logiczny i chronologiczny w odniesieniu do tekstu o ile odczytany zgodnie z ruchem wskazówek zegara. Wyjątkiem psującym ten koncept jest umieszczenie w pierwszej kolejności „monitorowania stanu pacjentów po terapii”, a później dopiero „dobór odpowiedniej terapii”.

W części tekstu w podrozdziale 1.2. w którym autorka wymienia markery nowotworowe i odsyła do Rysunku 2, wymienia 1 marker (PSA), natomiast nie wymienia 2 (HER2 i PALP) z 3 markerów przedstawionych na rysunku, co powinna była zrobić.

A podrozdziale 1.3.1. oraz 1.3.2. autorka wymienia funkcjonalne elementy w obrębie białka ENOX2 w tym miejsce wiązania NADH, miejsce wymiany disiarczkowo-tiolowej (motyw cysteinowy), potencjalne miejsce wiązania jonu miedzi, motywy wiążące odpowiednio adeninę i chinon. Te i inne wymienione w tekście motywy strukturalne powinny zostać przedstawione na odrębnym rysunku z zaznaczeniem ich lokalizacji w obrębie pełnej długości białka.

Pierwsze zdanie podrozdziału 1.3.2. jest niepoprawne: „Masa cząsteczkowa ENOX2 wynosi około 70 kDa i składa się z 610 reszt aminokwasowych”. Masa cząsteczkowa nie składa się z aminokwasów.

Opis Rysunku 5 jest niewystarczający. W opisie powinna się znaleźć informacja w jaki sposób zaznaczono błonę komórkową, oraz, że na rysunku przedstawiono inne białka katalityczne i docelowo modyfikowane aktywnością ENOX2.

Zaciekawiła mnie informacja w podrozdziale 1.4., że kura może rocznie wyprodukować 18g specyficznych IgY. Czy specyficznych względem konkretnego zadanego antygeny, którym immunizowano? Jeśli tak, proszę o wyliczenie ile jajek dziennie musiałyby znosić kura w ciągu roku aby osiągnąć ten poziom produkcji (18g) przy założeniu danych z Tabeli 2 i podrozdziału 1.4.2. tj., że z żółtka można pozyskać 100-150 mg przeciwciał poliklonalnych, spośród których 2-10% stanowią przeciwciała o pożądanej specyficzności antygenowej.

W rozdziale 1.4.1. autorka charakteryzując ptasie IgY odnosi się do pracy źródłowej z 1969r., pisząc „dopiero w 1969 roku Leslie i Clem zasugerowali zmianę stosowanego nazewnictwa na IgY”. Rok 1969 w odniesieniu do postępów w biologii molekularnej i immunologii to czas naprawdę odległy, stąd „dopiero w 1969 roku” brzmi nieco kuriozalnie.

W Tabeli 2 zawarto wiersz „Ilość”. Należałoby sprecyzować czego i w czym np. „Przeciętna ilość pozyskiwanych przeciwciał” : 100-150mg/ jajko (kurze); 200mg/ skrwawienie (królika?).

Tytuł podrozdziału 1.4.2. powinien brzmieć „Otrzymywanie przeciwciał IgG i IgY” ponieważ cały pierwszy akapit poświęcony jest IgG.

Czy Rysunek 9 przedstawia ogólny schemat oczyszczania IgY z żółtka metodami strącaniowymi, czy specyficznie z zastosowaniem PEG? Jeśli z zastosowaniem PEG, powinno to być uzupełnione w tytule.

Brak odnośnika do Tabeli 3 w tekście.

W odniesieniu do zastosowania IgY w diagnostyce nowotworów autorka powołuje się na 4 prace źródłowe, spośród których 3 są autorstwa badaczy z Politechniki Wrocławskiej. Uprzejmie proszę o krótką dyskusję czy ta tematyka jest adresowana i realizowana również w obrębie innych ośrodków naukowych i przez producentów komercyjnych. Czy ta specyficzna tematyka staje się obecnie obiektem szerszego zainteresowania?

Uwagi szczegółowe dotyczące opisów materiałów, metod, wykazów i bibliografii

Opis materiałów jest wyczerpujący. Natomiast z całą pewnością nie jest szczegółowy. W opisie np. odczynników warto podawać numery katalogowe, jak również numery lot zwłaszcza w kontekście przeciwciał i odczynników złożonych. W przypadku prostych odczynników chemicznych warto również podać deklarowaną przez producenta czystość. W przypadku linii komórkowych często wymagane jest podanie źródła pozyskania lub zakupu, ewentualnie walidacji danej linii.

W sekcji metod. Autorka szczegółowo opisuje procedury, które zastosowała często odnosząc się do konkretnych rysunków. Metody są uszeregowane w bloki tematyczne. Jest to dobra praktyka. Sugerowałbym, żeby w obrębie bloków elementy wspólne dla wszystkich opisów wyodrębnić w jeden wspólny opis. Ogólnie zastosowane metody są poprawne i adekwatne do zadanych pytań badawczych za wyjątkiem mikroskopii fluorescencyjnej, autorka powinna zastosować mikroskopię konfokalną, a komórki najlepiej gdyby rosły bezpośrednio na szkiełkach przez dobę lub dwie przed utrwalaniem. Dla części metod istnieją szybsze i równie dobre, lub lepsze, alternatywy np. dla barwienia białek w żelach PAA Coomasie (bez metanolu) lub srebrem (bez formaldehydu w etapie utrwalania).

W podrozdziale 6.6. jest błąd. Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda jest instytutem Polskiej, a nie „Państwowej” Akademii Nauk. Brakuje wyjaśnień do danych tabelarycznych w tym podrozdziale.

W odniesieniu do prędkości wirowania najlepiej podawać uśrednione wartości rcf (lub siły odśrodkowej) zamiast rpm, które bez podania parametrów rotora na niewiele się zdają.

„W przeliczeniu na całkowitą ilość białka” w odniesieniu do ENOX2(292-610) lub lizatów komórkowych jest zbędne.

Podrozdział 6.13.11. Jaką metodą oznaczono stężenie białka w próbkach?

Podrozdział 6.14.1. w tytule jest ENOX2(292-610), w opisie ENOX2(483-505)-OVO, w opisie pod rysunkiem 27 są wymienione indywidualne peptydy sprzęgnięte z OVA. Proszę o wyjaśnienie co zostało zrobione.

Fisherbrand DotBlot Hybridization Manifold System nie jest membraną nitrocellulozową.

W wykazach tabel i rysunków powinny znajdować się tylko ich tytuły.

Wykaz literatury zawiera 146 pozycji, w tym ok 57 prac opublikowanych w lub po 2012r. Udział najnowszych prac jest stosunkowo niski. Co jest tego przyczyną? W odnośnikach literaturowych są błędy m.in. poz. 65 (inicjały zamiast nazwisk plus inicjałów imion), poz. 130 brak odniesienia do numeru i zakresu stron, ewentualnie doi, poz. 145 i 146 brak informacji o roku publikacji.

Uwagi ogólne

Praca posiada dobrze zarysowaną i logiczną strukturę. Rysunki i Tabele umieszczono we właściwych miejscach, co pomaga w śledzeniu postępów wykonanych badań. Praca czyta się łatwo i w większości fragmentów z przyjemnością.

Brak numeracji stron.

Marginesy nie zostały dopasowane lustrzanie, co nieco razi po złożeniu pracy w książkę.

W tekście jest bardzo dużo błędów ortograficznych polegających na przestawieniu kolejności liter (tzw. inwersja), obecności dodatkowych liter lub braku pewnych liter. Szczególnie widoczne jest to w opisach metod, w których autorka kopiowała i wklejała części tekstu np. zamiast przedstawiają jest „przestawiają”, zamiast Western blot jest „Westen blot”, zamiast przeprowadzono jest „pzzprzeprowadzono” itp. Również we fragmentach unikalnych nie ustrzeżono się błędów np. tytuł podrozdziału 6.20. zamiast kowalencyjna jest „kowalnecyjna”.

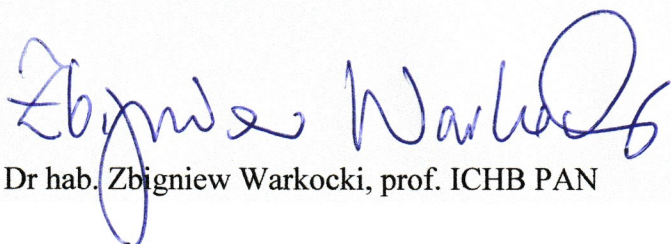
Każdy rysunek i tabela powinny posiadać tytuł oraz opis pozwalający zrozumieć przedstawione na rysunku lub w tabeli informacje. Autorka nie rozdzieliła tytułów od opisów rysunków, oraz nie zaopatrzyła tabeli w opisy, co jest błędem.

Autorka zaznacza, że część prac powstała w ramach prac dyplomowych studentów. W sumie naliczyłem 5 takich prac, przy czym jeden autor pan Karkowski występuje w połączeniu z dwoma tytułami prac dyplomowych. Zamieszczenie takiej informacji jest słuszne. Czy pani mgr inż. Maria Łęcka była bezpośrednią opiekunką naukową studentów w laboratorium?

Autorka w części poświęconej swojemu dorobkowi naukowemu wymienia współautorstwo w 5 wieloautorskich pracach naukowych, jednak żadnej z nich nie cytuje w swojej rozprawie. Nasuwa się pytanie dlaczego? Autorka jest również współautorką 6 patentów. Dużym atutem jest odbycie 4 staży naukowych w zagranicznych jednostkach naukowych. W liście tych staży brakuje mi informacji o kierownikach zespołów badawczych, w których realizowane były staże oraz informacji o opiekunach.

Podsumowanie recenzji i rekomendacja

Biorąc pod uwagę kompletny i ambitny plan badań, duży wkład pracy w przygotowanie zaprezentowanych w rozprawie oznaczeń oraz podjęcie prób stworzenia narzędzi do nieinwazyjnej lub minimalnie inwazyjnej diagnostyki nowotworów pozytywnie oceniam rozprawę doktorską przygotowaną przez mgr inż. Marię Łęcką. Przedłożona rozprawa doktorska spełnia wymagania konieczne do uzyskania stopnia naukowego doktora. Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne w Politechnice Wrocławskiej z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Marii Łęckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Zbigniew Warkocki, prof. ICHB PAN

Poznań, 9. września 2022 r.