Lublin, dn. 16.12.2024r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra Grzegorza Wołąkiewicza

pt. „Detekcja α-defensyn metodami wzmocnionej fluorescencji na powierzchni nanocząstek metalu szlachetnego w diagnostyce infekcji okołoprotezowych" wykonanej pod kierunkiem:

dr hab. Mariusza Szabelskiego, prof. UWM, promotora z Katedry Fizyki i Biofizyki, Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie oraz promotora pomocniczego: dr n. med. Marka Gojło z Oddziału Klinicznego Chirurgii Urazowo-Ortopedycznej i Chirurgii Kręgosłupa Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Olsztynie.

Dobór, znaczenie tematu i cel pracy:

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgra Grzegorza Wołąkiewicza jest pracą interdyscyplinarną z pogranicza fizyki, biologii oraz diagnostyki medycznej. Niniejsza praca doktorska była realizowana we współpracy ekspertów dwóch dyscyplin, czyli nauk fizycznych (biofizyka) oraz medycznych (chirurgia). Przeprowadzone badania łączą dziedziny: biofizyki (spektroskopii molekularnej) oraz biologii i diagnostyki medycznej realizowanej w ramach programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego pn. „Doktorat wdrożeniowy" DWD/4/80/2020.

Celem recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej było opracowanie testu i układu pomiarowego do wykrywania alfa-defensyn (zaliczanych do anionowych i kationowych peptydów, o strukturze stabilizowanej przez mostki dwusiarczkowe, znajdujące się pomiędzy resztami cysteinowymi) w płynie stawowym, który mógłby poszerzyć panel badań diagnostycznych, rutynowo stosowany w praktyce klinicznej przy ocenie występowania bakteryjnego zakażenia okołoprotezowego. Zakażenie okołoprotezowe jest jednym z najczęstszych powikłań po zabiegach endoprotezoplastyki stawu biodrowego oraz kolanowego. Należy do zakażeń, których rozpoznanie i leczenie jest bardzo trudne i może zakończyć się operacją chirurgiczną.

Należy dodać, że ilość zabiegów z roku na rok rośnie, tylko w Polsce grono pacjentów jest na poziomie ponad 100 tysięcy rocznie. Leczenie często prowadzi do wymiany endoprotezy, co wiąże się ze znacznymi kosztami, obciążeniem dla pacjenta i systemu opieki zdrowotnej. Obecność alfa-defensyn w płynie stawowym została skorelowana z występowaniem infekcji okołoprotezowych. Liczne badania naukowe wskazują na znaczącą rolę detekcji tego markera w procesie diagnostyki infekcji okołoprotezowych. W wyniku potrzeb sugerowanych przez lekarzy, którzy na co dzień zmagają się z problemem właściwej diagnostyki zakażeń okołoprotezowych i ograniczeniami w dostępie do wiarygodnych i stosunkowo niedrogich testów utworzono interdyscyplinarną grupę badawczą, w której Doktorant podjął się realizacji recenzowanej przeze mnie pracy. Koncepcja badań zakładała opracowanie metody, która w prosty sposób, bez konieczności stosowania skomplikowanych urządzeń pomiarowych i analizatorów laboratoryjnych, pozwoli na oznaczanie ilości alfa-defensyn w płynie stawowym.

Celem pracy było zweryfikowanie hipotezy badawczej zakładającej, że dedykowane przeciwciała pozwolą na stworzenie efektywnego biosensora do detekcji alfa-defensyn w płynie stawowym o złożonym składzie biologicznym. Wykorzystany w badaniach biosensor opiera się na reakcji antygen-przeciwciało w konfiguracji „kanapkowej", umożliwiając selektywną detekcję alfa-defensyn za pomocą specyficznych przeciwciał wychwytujących i potwierdzających, wyznakowanych różnymi fluoroforami. Dodatkowo sformułowano hipotezę, która zakłada, że wykorzystanie zjawiska wzmocnionej fluorescencji na powierzchni nanocząstek srebra, umożliwi wykrywanie małych ilości alfa-defensyn w próbce. Zastosowane w tym celu nanowarstwy srebra na powierzchni sensora pozwalają na wzmocnienie rejestrowanego sygnału, co przełoży się na uzyskanie wysokiej czułości detekcji.

W mojej opinii zamierzone cele zostały osiągnięte, a publikacje naukowe dotychczas opublikowane oraz te w przygotowaniu są na to dowodem. Panom Promotorom mogę pogratulować bardzo dobrego doboru tematu oraz aktywnej współpracy, dzięki której stało się możliwe, aby Pan mgr Grzegorz Wołąkiewicz stał się ekspertem poruszającym się swobodnie na pograniczu biofizyki i biologii molekularnej oraz dynamicznie rozwijającej się analityki medycznej. Opóźnione rozpoznanie choroby może się wiązać z gorszym rokowaniem. Dlatego tak istotne jest poszukiwanie nowych, szybkich i skutecznych metod diagnostycznych pozwalających na zwiększenie szans wygrania z czasem.

Ocena formalna i merytoryczna pracy:

Rozprawa doktorska Pana mgra Grzegorza Wołąkiewicza zawiera cztery rozdziały napisane na 196 stronach, zawierające obszerny „Wstęp" gdzie Doktorant w sposób wyczerpujący zaprezentował wiedzę na temat różnego typu technik spektroskopii fluorescencyjnej zwłaszcza w odniesieniu do nanocząstek srebra (w tym także chemiczne metody syntezy), a zwłaszcza efektów plazmonicznych, które leżą u podstaw pracy nad fluorescencyjnym sensorem detekcji alfa-defensyn. Doktorant omawia szczegółowo aktualnie dostępne na rynku testy alfa-defensyn podając ich zalety oraz wady. Wspomina także o innych nowych badaniach nad markerami spektroskopowymi, które mogą być konkurencyjne. W rozdziale drugim „Cel zakres i znaczenie badań" Doktorant omawia ogólne i szczegółowe cele jego pracy. Następnie prezentuje „Materiały i metody badawcze". W swojej pracy, omawiając szczegółowo w Rozdziale czwartym „Wyniki Badań i dyskusja" Doktorant skupia się na doborze metod syntezy nanoczastek srebra oraz sprawdzenia ich oczekiwanych właściwości. Poszukuje właściwych spektroskopowo fluoroforów zdolnych do interakcji z przeciwciałami. Potwierdza ich interakcję w układzie makroskopowym roztworu. W rezultacie buduje układ pomiarowy zdolny do detekcji, metodą TIRF alfa-defensyn poprzez wzbudzane fluorofory związane z przeciwciałami. Bada czułość metody dla różnych stężeń alfa-defensyn. Testuje układ na próbkach płynu stawowego pobranych od pacjentów uczestniczących w badaniu. Porównuje wyniki opracowanego testu z komercyjnym testem immunochromatograficznym. Na zakończenie Doktorant prezentuje sześć wniosków spójnych z postawionymi wcześniej celami szczegółowymi. Osobiście uważam, że wniosek piąty dotyczący walidacji: „...porównanie wyników z oceną tych samych próbek za pomocą medycznego testu immunochromatograficznego, pozwoliła na stwierdzenie, że zaproponowany test jest, co najmniej równoważny komercyjnemu, a w przypadku niższych stężeń antygenu, wykazuje przewagę nad powszechnie dostępnym testem" jest kwintesencją całej pracy i należy łączyć go z sukcesem aktywności całego Zespołu. Tekst rozprawy napisany jest bardzo dobrze, poprawnym językiem polskim, czyta się go z przyjemnością. Szata graficzna pracy jest także dopracowana. Znalazłem kilkanaście literówek, ale to nie ma większego znaczenia.

Badania Doktoranta są interdyscyplinarne, gdyż obejmują swoim zasięgiem nie tylko nauki fizyczne (biofizykę), biologiczne (biologia molekularna), ale również nauki medyczne o potencjalnej możliwości wykorzystania ich wyników w rozwiązaniach komercyjnych.

Jedyna moja uwaga związana jest z liczbą pacjentów, która moim zdaniem nie była zbyt liczna. Zdjęcie próbek płynu stawowego (Rysunek 33) wskazuje na dużą rozbieżność barw, co mogło być związane z powtarzalnością techniki jego pobierania, poziomu zaawansowania infekcji oraz destrukcji erytrocytów. Chciałbym zadać pytanie na ile pozostałe zanieczyszczenia mogły mieć wpływ na detekcję alfa-defensyn?

Analiza bibliometryczna wskazuje, że Doktorant jest współautorem dziewięciu prac naukowych, z czego trzy (będące na liście MNiSW) bezpośrednio łączą się z tematyką jego pracy doktorskiej. Wybrane artykuły wyraźnie wskazują na rzeczywisty udział Doktoranta w badaniach zaprezentowanych w pracach. Doktorant jest pierwszym autorem w dwóch publikacjach.

Wnioski końcowe:

Podsumowując, rozprawę doktorską Pana mgra Grzegorza Wołąkiewicza oceniam bardzo dobrze. Rozprawa posiada elementy nowości naukowej i stanowi oryginalny wkład do nauki wskazując na potrzebę dalszego rozwoju badań nad rozwojem skutecznych metod spektroskopowych diagnostyki medycznej. Prezentowane przez Doktoranta badania realizowane w ramach pracy i projektu „doktoratu wdrożeniowego" mają ściśle praktyczne zastosowanie i w mojej opinii osoby posiadającej doświadczenie w dokonanej komercjalizacji badań naukowych (technologie chemiczne oraz konstrukcja urządzenia analitycznego) są niemal gotowe do komercjalizacji. Wychodzą naprzeciw realnym problemom i potrzebom współczesnej medycyny. Wykorzystywane w badaniach nowoczesne narzędzia analityczne, jakimi są czułe biosensory oraz metody fluorescencyjnej detekcji alfa-defensyn są bez wątpienia nowatorskim podejściem.

Biorąc pod uwagę rozprawę doktorską i zaprezentowane w niej wyniki wraz z interpretacją oraz udokumentowany dorobek naukowy zawarty w wysoko punktowanych publikacjach z listy JCR chciałbym rekomendować Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o wyróżnienie Pana mgr Grzegorza Wołąkiewicza stosowną nagrodą.

Wobec powyższego stwierdzam, że praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2024.1571 ze zm.) i wnoszę o dopuszczenie Pana mgra Grzegorza Wołąkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Gagoś

prof. dr hab. Mariusz Gagoś