



**dr hab. inż. Łukasz Górski, prof. uczelni**

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, tel.: 022-234-7921; fax: 022-234-5631, e-mail: lukasz.gorski@pw.edu.pl

Warszawa, 2024-09-06

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Paziewskiej-Nowak**

pt: *„Label-free methods of lactoferrin determination using new selective DNA-based bioreceptor”*

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Paziewskiej-Nowak pt. *„Label-free methods of lactoferrin determination using new selective DNA-based bioreceptor”* wykonana została w Instytucie Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. inż. Doroty Pijanowskiej oraz opieką promotora pomocniczego, dr inż. Marcina Urbanowicza.

Obserwowany w ostatnich latach intensywny wzrost liczby publikacji dotyczących sensorów chemicznych jest z jednej strony odpowiedzią na zapotrzebowanie na niewielkie urządzenia analityczne, przekształcające informację chemiczną na sygnał analityczny. Z drugiej strony rozwój sensorów jest możliwy dzięki dostępności nowoczesnych materiałów i receptorów, które zastosowane w umiejętny sposób prowadzą do poprawy parametrów pracy konstruowanych urządzeń. Bardzo efektywną metodą poprawy parametrów pracy sensorów chemicznych, a w głównej mierze ich selektywności, jest zastosowanie w warstwie receptorowej składników pochodzenia biologicznego. Szczególnie ciekawą grupą biosensorów są sensory DNA, służące najczęściej do określania sekwencji nukleotydowej badanej nici DNA, co jest szczególnie istotne w diagnostyce chorób nowotworowych i genetycznych, określaniu rodzaju patogenu wywołującego chorobę, a także w śledzeniu żywności modyfikowanej genetycznie. Bardziej niekonwencjonalnym zastosowaniem biosensorów DNA jest oznaczanie innych analitów, takich jak np. białka. Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy opracowania sensorów zawierających w warstwie receptorowej odpowiednio dobrane fragmenty DNA, przeznaczone do oznaczania ważnego klinicznie białka – laktoferyny. Badania te znakomicie wpisują się w aktualne trendy badawcze dotyczące analityki klinicznej, a szczególnie sensorów do nieinwazyjnego wykrywania chorób.



W dalszej części recenzji przedstawię moją opinię dotyczącą zarówno strony redakcyjnej, jak i wartości merytorycznej pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Paziewskiej-Nowak.

### ***Ocena układu, języka oraz opracowania redakcyjnego rozprawy***

Praca doktorska ma układ zbliżony do klasycznego, rozpoczyna się bowiem streszczeniem w dwu językach, abstraktem graficznym (co jest raczej rzadkie w pracach doktorskich), listą skrótów i symboli oraz krótkimi rozdziałami zawierającymi wstęp, cel pracy i jej główne tezy oraz zakres prowadzonych badań. Te trzy rozdziały bardzo dobrze wprowadzają czytelnika w tematykę rozprawy. W dalszej kolejności następuje wstęp literaturowy, opisujący budowę i rolę fizjologiczną laktoferyny oraz sposoby jej oznaczania, a także tematykę rozpoznania molekularnego w biosensorach. Informacje zawarte w części literaturowej pracy w bardzo dobry sposób przedstawiają tematykę pracy. Doktorantka przedstawiła jedynie zagadnienia istotne dla rozprawy, co pozwoliło ograniczyć tę część pracy do rozsądnych 35 stron. Następnie znajduje się część eksperymentalna, podzielona na dwa rozdziały, dotyczące materiałów i aparatury oraz metodologii badań. Rozdział zatytułowany „Methodology” jest dość długi, zawiera bowiem, oprócz faktycznej metodologii prowadzenia badań, liczne odniesienia do literatury, noszące cechy kontynuacji wstępu literaturowego. Nie jest to chyba najlepszy układ, ponieważ czytelnik może mieć problem ze znalezieniem sposobu prowadzenia interesującego go w danej chwili eksperymentu. Być może korzystniejsze byłoby umieszczenie całej dyskusji literatury we wstępie literaturowym a metodyki pomiarów bezpośrednio przed wynikami, co pozwoliłoby na wyeliminowanie rozdziału „Methodology”. Niewątpliwie taki układ byłby bardziej intuicyjny dla czytelnika. Kolejne rozdziały zawierają wyniki poszczególnych projektów badawczych, realizowanych przez Doktorantkę. W oddzielnym rozdziale umieszczono dyskusję wyników, co jest moim zdaniem rozwiązaniem nienajlepszym, ale w recenzowanej pracy sprawdza się dobrze dzięki jej monotematyczności. Pracę zamykają: wnioski wraz z perspektywą dalszych badań, listy rysunków i tabel, obszerny (zawierający 261 pozycji) spis cytowanej literatury oraz wykaz dorobku naukowego Doktorantki.

Praca napisana jest poprawnym językiem a ilość literówek, skrótów myślowych oraz błędów językowych jest bardzo niewielka. Należy podkreślić, że rozprawa została przygotowana w języku angielskim. Chyba jedynym większym błędem edytorskim, który dostrzegłem, jest powtórzenie fragmentu tekstu na str. 114-115.

### ***Ocena merytoryczna rozprawy***

Badania opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej obejmują cztery projekty. Należy podkreślić, że wszystkie one są ze sobą ściśle powiązane, przez co tematykę realizowanych prac należy uznać za bardzo spójną. Wszystkie opisane prace zmierzają do opracowania sensora przeznaczonego do oznaczania laktoferyny, możliwego do zastosowania w analizie próbek klinicznych.

Pierwszy projekt opisany w recenzowanej pracy dotyczy wyboru sekwencji DNA wykazującej podwyższoną selektywność oddziaływania z laktoferyną i charakteryzacji tego oddziaływania. Główną techniką badawczą stosowaną w tej części pracy były pomiary powierzchniowego rezonansu plazmonowego. Szczegółowo zbadano wpływ warunków pomiarowych na immobilizację DNA oraz na oddziaływanie DNA-laktoferyna. Analizowano zarówno kinetykę, jak i termodynamikę tworzenia się kompleksów DNA z badanym białkiem na powierzchni przetwornika SPR. W końcowej



fazie projektu zbadano selektywność wiązania różnych białek przez wybraną sekwencję DNA, przy czym stosowane interferenty zostały wybrane w sposób przemyślany. Na podstawie wyników pomiarów SPR wzorców o różnych stężeniach laktoferyny przygotowano krzywe kalibracji, wykazując wyższość sekwencji dsDNA o długości 72 bp nad sekwencją o długości 23 bp jako receptora. Należy stwierdzić, że w ramach pierwszego z opisanych projektów zrealizowano bardzo szerokie badania, których wyniki pozwoliły na wybór receptora w postaci sekwencji DNA o wysokiej selektywności wobec badanego analitu oraz na zoptymalizowanie sposobu przygotowywania warstwy receptorowej docelowego sensora. Na uwagę zasługuje dogłębna analiza fizykochemiczna oddziaływania DNA z laktoferyną.

Wyniki powyższych badań zostały wykorzystane w kolejnym projekcie, dotyczącym opracowania elektrochemicznego sensora do oznaczania laktoferyny. W początkowej fazie badań Doktorantka nadal wykorzystywała jednak technikę SPR do zoptymalizowania warstwy receptorowej z receptorem w postaci dsDNA. Dodatkowo przeprowadzono badania FTIR oraz pomiary kąta zwilżania. Po tej wstępnej części, przystąpiono do pomiarów elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej. Na podstawie szczegółowej analizy parametrów uzyskanych w pomiarach elektrochemicznych przygotowano krzywe kalibracji dla laktoferyny, przy czym ponownie sensor zmodyfikowany sekwencją DNA o długości 72 bp dał lepsze parametry analityczne w porównaniu do sekwencji o długości 23 bp. Przeprowadzona została również ocena stabilności sensorów podczas ich długoterminowego przechowywania.

W kolejnym rozdziale opisane zostały wyniki analiz laktoferyny w próbkach śliny ludzkiej z wykorzystaniem opracowanych wcześniej sensorów elektrochemicznych. Badaniami objęto próbki pobrane od trzech osób, w tym jednej chorej na chorobę Leśniewskiego-Crohna, której markerem jest podwyższone stężenie laktoferyny w ślinie. Istotnie, próbki te charakteryzują się znacznie wyższym stężeniem laktoferyny w porównaniu do próbek pobranych od osób zdrowych. Jako techniki porównawcze zastosowano sensor SPR oraz komercyjny zestaw ELISA, przy czym wyniki otrzymane przy zastosowaniu wszystkich metod wykazywały akceptowalną zbieżność. Co istotne, zakres prostoliniowy krzywej kalibracji opracowanego sensora elektrochemicznego pokrywa się ze stężeniami fizjologicznymi tego związku w ślinie człowieka, istnieje więc możliwość zastosowania opracowanych urządzeń w analizie klinicznej.

Ostatni projekt opisany w rozprawie doktorskiej jest nieco odmienny tematycznie, dotyczy bowiem prób opracowania sensorów do oznaczania laktoferyny opartych na innych niż DNA receptorach. Badaniami objęto warstwy receptorowe wytworzone z przeciwciał oraz polimerów wdrukowywanych molekularnie. W przypadku sensorów wykorzystujących przeciwciała osiągnięto pozytywne wyniki, udało się nawet otrzymać krzywą kalibracji, choć o dość wąskim zakresie odpowiedzi liniowej. Badania nad sensorami z polimerami wdrukowywanymi molekularnie nie przyniosły pozytywnych wyników, należy uznać je więc za bardzo wstępne, co zresztą podkreśla w rozprawie Doktorantka.

Podsumowując, należy stwierdzić, że recenzowana rozprawa doktorska ma zarówno istotny aspekt poznawczy, jak i bardzo dużą wartość praktyczną. Wskazano nowy receptor selektywny wobec laktoferyny, scharakteryzowano szczegółowo wzajemne oddziaływanie tych cząsteczek, przeprowadzono również badania nad optymalizacją składu warstw receptorowych DNA, które mogą być istotne dla innych badaczy, opracowujących podobne sensory. Jeśli chodzi o aspekt praktyczny, to zoptymalizowany sensor elektrochemiczny może być w przyszłości zastosowany do oznaczania laktoferyny w próbkach klinicznych, co może ułatwić wykrywanie



niektórych chorób. Parametry analityczne sensorów zostały prawidłowo scharakteryzowane, a ich prawidłowe działanie potwierdzono przez porównanie wyników otrzymanych z ich wykorzystaniem z innymi technikami analitycznymi, przy czym analizowano zarówno próbki sztuczne, jak i rzeczywiste.

Jakość wykonanych przez mgr inż. Agnieszkę Paziewską-Nowak badań oraz sposób ich opisu oceniam bardzo wysoko. Jednakże, na recenzencie ciąży także obowiązek wytknięcia Autorce niedociągnięć pracy. Dlatego też poniżej wymieniam swoje uwagi do niniejszej rozprawy prosząc, aby Doktorantka w czasie obrony rozprawy ustosunkowała się do następujących kwestii:

- str. 34: "Aptamers (...) are designed and produced through a process called SELEX...". Takie stwierdzenie może wywołać w czytelniku przeświadczenie, że wytworzenie sekwencji aptamerowej wymaga za każdym razem użycia metody SELEX. Jest to oczywiście nieprawda, metoda ta służy jedynie do znalezienia fragmentu kwasu nukleinowego selektywnego wobec danej substancji, a po opublikowaniu jego sekwencji każdy badacz może zlecić syntezę aptameru w jednej z firm oferujących takie usługi i wykorzystać ją w swoich pracach. Nie jest to ani szczególnie kosztowne ani czasochłonne, co sugeruje fragment na stronie 41: "... SELEX protocol needs to be employed to synthesize aptamers, which still results in a multistep process of aptamer fabrication".
- str. 40: W opisie procesu SELEX pojawia się informacja, że celem molekularnym aptamerów może być sekwencja komplementarna. Czy istotnie są publikacje pokazujące takie zastosowanie SELEXu? Wydaje się, że w celu wykrycia kwasu nukleinowego o danej sekwencji wystarczy wiedza o komplementarności par zasad azotowych.
- str. 41: w rozprawie doktorskiej warstwy receptorowe z polimerów w drukowanych molekularnie są określane jako biomimetyczne. Chciałbym prosić o uzasadnienie takiego stwierdzenia.
- str. 46: na rys. 11 do detekcji laktoferyny wyróżniono metody: instrumentalne, optyczne i elektrochemiczne. Zazwyczaj metody optyczne i elektrochemiczne są również określane metodami instrumentalnymi, prosiłbym więc o uzasadnienie takiego podziału. Zwracam uwagę, że wśród metod „instrumentalnych” wymienione są techniki rozdzielania (z różnymi formami detekcji), może więc taka nazwa byłaby lepsza.
- str. 66. przy omawianiu stabilności DNA pada stwierdzenie, że jest on odporny na temperaturę „up to 40”. Brak tu jednostki, domyślam się, że chodzi o stopnie Celsjusza. DNA jest jednak stabilne i w wyższych temperaturach, typowo temperatura topnienia DNA jest w zakresie 70-90 °C. Prosiłbym Doktorantkę, aby wyjaśniła co miała na myśli pisząc o stabilności temperaturowej DNA.
- str. 92: określenia: „...reaserchers used...” oraz „Their goal was to...” przy opisie wyników własnych Doktorantki są raczej nienaturalne, chciałbym się więc upewnić, że na rys. 21 są wyniki prac Doktorantki.
- str. 100: selektywność oddziaływania receptora DNA z laktoferyną jest przedstawiona na rys. 24 oraz w Tabeli 10, jednakże wartości na rysunku i w tabeli nie są zgodne. Trudno jest ustalić, jakich pomiarów dotyczy tabela, a jakich rysunek, prosiłbym więc o wyjaśnienie rozbieżności i szczegółowe omówienie procedury wyznaczania selektywności receptora techniką SPR.



- str. 115: stabilność opracowanych sensorów została tu określona jako „good”, podczas gdy w dyskusji wyników, na str. 131, jako „relatively poor”. Które z tych stwierdzeń jest w ocenie Doktorantki bardziej prawdziwe?
- str. 115: W pracy brak jest dokładnej procedury pomiarów próbek rzeczywistych wykonywanych z wykorzystaniem sensorów elektrochemicznych z warstwą receptorową DNA. W szczególności interesuje mnie, czy potrzebna była regeneracja sensora po każdym punkcie kalibracji oraz po pomiarze w próbce. Czy cała kalibracja oraz pomiar dla próbki śliny były wykonane na tym samym egzemplarzu sensora? Te same pytania są istotne dla wyników badań nad stabilnością sensorów, przedstawionych na rys. 32 na str. 114. Czy wyniki obejmują 3 sensory przechowywane przez 21 dni, czy też więcej sensorów, badanych po określonym czasie i usuwanych z puli po pomiarach?
- Str. 120: czemu nie podjęto próby oznaczenia laktroferyny w próbkach śliny z wykorzystaniem immunosensorów, których krzywa kalibracji jest przedstawiona na rys. 36 B?

Doktorantka jest współautorem 11 artykułów, przy czym 8 z nich zostało opublikowane w czasopismach posiadających Impact Factor, a sumaryczna wartość tego wskaźnika dla wszystkich artykułów wynosi 40,8. W dorobku mgr inż. Agnieszki Paziewskiej-Nowak znajdujemy również 12 prezentacji na konferencjach naukowych, 3 prezentacje na seminariach IBIB PAN oraz 3 prezentacje w ramach szkoły letniej programu POWER OCh!DOK. Na uwagę zasługuje także staż naukowy odbyty przez Doktorantkę na Uniwersytecie Florenckim, dotyczący badań z zastosowaniem SPR, a więc ściśle związanych z tematyką doktoratu.

W rozprawie doktorskiej mgr inż. Agnieszka Paziewska-Nowak zawarła wyniki opublikowane w jedynie dwu artykułach. W mojej opinii, decyzję tą należy ocenić pozytywnie, ponieważ dzięki temu doktorat jest bardzo spójny tematycznie. Podkreślić należy wysoką rangę czasopism, w których opublikowane zostały te artykuły: International Journal of Biological Macromolecules oraz Sensors and Actuators, B: Chemical.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Paziewskiej-Nowak spełnia wszystkie wymagania merytoryczne i formalne określone w art. 187 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. z późniejszymi zmianami i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęczka PAN o dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Paziewskiej-Nowak do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z poważaniem,

