

Prof. dr hab. inż. Piotr Jasiński
Wydział Elektroniki, Telekomunikacji
i Informatyki
Politechnika Gdańska
ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Paziewskiej-Nowak
pt. „Label-free methods of lactoferrin determination using new selective DNA-based
bioreceptor”

Pismem SN/416/2.3./2023 Dyrektora Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN, prof. Piotra Ładyżyńskiego, z dnia 12.07.2024 roku otrzymałem do recenzji rozprawę doktorską mgr inż. Agnieszki Paziewskiej-Nowak pt. „Label-free methods of lactoferrin determination using new selective DNA-based bioreceptor”. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. inż. Dorota Pijanowska, zaś promotorem pomocniczym dr inż. Marcin Urbanowicz.

Rozprawa jest napisana po angielsku i składa się z jedenastu rozdziałów - w sumie 163 stron maszynopisu. Rozdziały są podzielone na 3 części. Pierwsza część nazwana „Przegląd stanu wiedzy” obejmuje rozdziały 1-4 (stron 60), część druga „Eksperyment” obejmuje rozdziały 5 i 6 (stron 24), zaś ostatnia „Wyniki” obejmuje rozdziały 7-11 (stron 47). W części pierwszej w kolejnych rozdziałach opisane są odpowiednio: informacje o laktoferynie, wiadomości dotyczące bioreceptorów i biocujników, metody detekcji laktoferyny oraz wnioski wynikające z tego przeglądu. Część druga zawiera dwa rozdziały: opis materiałów i metod badawczych oraz metodologię badań. Ostatnia część zawiera wyniki przeprowadzonych badań: w rozdziale 7 wyniki badań powinowactwa laktoferyny z DNA, w rozdziale 8 prace związane z czujnikiem impedancyjnym laktoferyny, w rozdziale 9 badania porównawcze oznaczania laktoferyny w ludzkiej ślinie, w rozdziale 10 inne badania związane z oznaczaniem laktoferyny, zaś w rozdziale 11 dyskusję otrzymanych wyników. Ponadto, w pracy można znaleźć nienumerowane rozdziały: spis treści, streszczenie po polsku i angielsku, abstrakt graficzny, lista skrótów i symboli, cel pracy i tezy, zakres pracy, referencje, lista rysunków i tabel oraz inne informacje o osiągnięciach Autorki. Podsumowując, całość tworzy ciąg przyczynowo - skutkowy i może stanowić wzorzec dla kandydatów do stopnia doktora.

Problem naukowy rozprawy

Na stronie 19 rozprawy doktorskiej Autorka wskazuje, iż celem rozprawy doktorskiej jest opracowanie bioreceptora DNA selektywnego na endogenne immunomodulatory laktoferyny i jego wykorzystanie w oznaczaniu tego białka w ludzkiej ślinie. **Uważam, że cel rozprawy jest jednoznacznie postawiony.** Autorka rozprawy postawiła trzy hipotezy rozprawy, które w tłumaczeniu na język polski brzmią:

1. Częsteczka DNA o zdefiniowanej sekwencji wykazuje wysokie powinowactwo do endogennego immunomodulatora laktoferyny i może służyć jako selektywny bioreceptor dla bezznacznikowych biosensorów.

2. Badanie powinowactwa z wykorzystaniem metody SPR umożliwi identyfikację zaprojektowanego oligonukleotydu DNA, który selektywnie oddziałuje z docelowym białkiem.

3. Impedancyjna detekcja laktoferyny za pomocą zidentyfikowanego bioreceptora umożliwi ocenę stężenia analitu w próbkach biologicznych w warunkach fizjologicznego pH. **Uważam, że hipotezy są nietrywialne i postawione prawidłowo.** Ponadto, należy w tym miejscu zaznaczyć, że tezy rozprawy zostały w pracy udowodnione.

Podejście Autora do osiągnięcia celów pracy

Autorka rozprawy podeszła do realizacji celów w sposób eksperymentalny. W celu zaprojektowania i wytworzenia warstw biosensorycznych Autorka zbadała natywne oligonukleotydy DNA pod kątem powinowactwa względem laktoferyny, a najlepsze z nich wykorzystwała w analizach kinetycznych i termodynamicznych do określenia wybranych parametrów interakcji z laktoferyną. Wykazała korzystne parametry bioreceptora o unikalnej sekwencji DNA (zhybrydyzowana sekwencja DNA o długości 72 par zasad azotowych) oraz jego przydatność w biosensorach bezznacznikowych wykorzystujących metody powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR) oraz elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej. W ramach badań Autorka przygotowała czujniki SPR, które posłużyły do weryfikacji za pomocą analizy FTIR kolejnych etapów modyfikacji i interakcji z analitem impedancyjnego biosensora do oznaczania laktoferyny. Autorka dla opracowanego impedancyjnego czujnika laktoferyny zaproponowała elektryczny schemat zastępczy oraz wskazała element schematu zastępczego, który dobrze korelował ze stężeniem laktoferyny. Autorka porównała wyniki badań impedancyjnych z metodami referencyjnymi ELISA i SPR. Ponadto, Autorka podjęła próbę biomimetycznego wykrywania laktoferyny poprzez

wykorzystanie dopaminy jako funkcjonalnego monomeru. **W ocenie recenzenta Autorka rozprawy podeszła do osiągnięcia celów pracy w sposób systematyczny oraz prawidłowy.**

Aktualność tematyki rozprawy

Rozprawa doktorska dotyczy opracowania nowego selektywnego wobec laktoferyny bioreceptora opartego na DNA. Jest to podejście nowatorskie, gdyż bioczuJNIKI laktoferyny do tej pory nie bazowały na bioreceptorze DNA. Opracowanie taniego i selektywnego bioczuJNIKA laktoferyny jest społecznie i naukowo ważne ze względu na istotną rolę jaką laktoferyna odgrywa w organizmie w układzie odpornościowym. Opracowanie bioczuJNIKA pozwala na szybkie, precyzyjne i potencjalnie nieinwazyjne badanie poziomu laktoferyny w różnych płynach ustrojowych. Dzięki temu, bioczuJNIK będzie mógł być używany w diagnostyce w miejscach opieki nad pacjentem (POCT), umożliwiając wczesne wykrycie zaburzeń immunologicznych, infekcji i stanów zapalnych. **Projektowanie, opracowywanie i badanie bioczuJNIKÓW wchodzi w zakres tematyczny dyscypliny inżynieria biomedyczna dziedziny nauk inżynieryjno-technicznych.**

Rozprawa na tle współczesnych doniesień literatury

W rozprawie Autorka cytuje ponad 260 pozycji literaturowych. Zdecydowana większość z nich (>70%) obejmuje najnowszą literaturę dyscypliny (pochodzi z ostatnich 10 lat). Uważam, że **cytowania są właściwie dobrane i świadczą o dobrej wiedzy Autorki i znajomości współczesnej literatury z dyscypliny naukowej dotyczącej rozprawy.**

Wady, słabe strony rozprawy oraz inne uwagi

Rozprawa napisana jest starannie i bez błędów językowych i interpunkcyjnych, zaś rysunki są czytelne. Jedyne drobne błędy to powtórzenie informacji na stronach 114-115 oraz błędna numeracja rysunków na stronie 105. Przy tak objętościowej pracy błędy takie zawsze mogą się zdarzyć. W pracy nie znalazłem również błędów merytorycznych. Praca jest przemyślana, zaś wyciągane wnioski wynikają z otrzymanych wyników i przeprowadzonej analizy. W trakcie czytania rozprawy nasunęły mi się następujące pytania:

- elektryczny model zastępczy czujnika impedancyjnego zawiera element Warburga, którego wartość maleje w wyniku modyfikacji bioreceptora. Autorka tłumaczy to zwiększeniem się grubości słabo przewodzącej warstwy organicznej. Jednak zaproponowany w tej postaci

element raczej pozwala na wnioskowanie o współczynnikach dyfuzji molekuł posiadających ładunek, a nie grubości warstwy, w której dyfundują. Prośba o komentarz.

- badania selektywności skrośnej bioreceptora zostały przeprowadzone jedynie metodą SPR. Prośba o komentarz, czy wyniki selektywności skrośnej otrzymane dla czujnika impedancyjnego mogłyby się różnić od tych otrzymanych metodą SPR? Z czego może wynikać zawyżanie względem metod referencyjnych wyników otrzymanych metodą impedancyjną dla laktoferyny w ślinie ludzkiej.

Wskazane pytania nie umniejszają jakości naukowej recenzowanej pracy.

Oryginalny dorobek Autora

Do oryginalnego dorobku Autorki zaliczam opracowanie bezznacznikowego impedancyjnego czujnika laktoferyny z wykorzystaniem bioreceptora na bazie DNA. W szczególności oryginalny dorobek obejmuje:

- zaproponowanie nowej metodologii badania powinowactwa z wykorzystaniem metody SPR w celu opracowania selektywnego bioreceptora laktoferyny,
- opis oddziaływania bioreceptora DNA z laktoferyną z wykorzystaniem metody SPR z uwzględnieniem kinetycznych i termodynamicznych aspektów tworzenia kompleksu,
- oszacowanie stałych szybkości i równowagi oraz stałych termodynamicznych poprzez dopasowanie modeli matematycznych do danych eksperymentalnych,
- określenie selektywności skrośnej bioreceptora z wykorzystaniem metody SPR,
- opracowanie metodologii przeniesienia procedury modyfikacji powierzchni z wykorzystaniem bioreceptora z metody SPR do techniki elektrochemicznej,
- opracowanie bezznacznikowego biosensora impedancyjnego wyposażonego w warstwę bioreceptorową opartą na DNA i wyznaczenie jego parametrów metrologicznych,
- zastosowanie opracowanego biosensora impedancyjnego do pomiarów laktoferyny w próbkach ludzkiej śliny i ich porównanie z metodami referencyjnymi.

Ponadto, należy nadmienić, że Autorka rozprawy posiada bogaty dorobek publikacyjny. Zgodnie z bazą Scopus Autorka rozprawy jest współautorką w 8 publikacjach JCR (w sumie 10 publikacji w bazie Scopus), z których dwie publikacje dotyczą bezpośrednio rozprawy doktorskiej. W obu publikacjach jest współautorem wiodącym.

- Agnieszka Paziewska-Nowak, Marcin Urbanowicz, Kamila Sadowska, Dorota G. Pijanowska. DNA-based molecular recognition system for lactoferrin biosensing. Inter

J Biol Macromol 2023, 253, 126747 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126747>, (IF=8.025; CS=14.5; MEiN points=100).

- Agnieszka Paziewska-Nowak, Marcin Urbanowicz, Dorota G. Pijanowska. Selective determination of lactoferrin in human saliva with label-free impedimetric DNA-based biosensor. Sens Actuators B Chem 2024, 405, 135377 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2024.135377> (IF=8.4; CS=14.6; MEiN points=200).

W rozprawie doktorskiej Autorka przedstawia swój wkład w powstanie publikacji, który należy uznać za dominujący. Wszystkie czasopisma należą do uznanych czasopism dyscypliny, zaś **dorobek publikacyjny Autorki z nadmiarem spełnia oczekiwania stawiane kandydatom do stopnia doktora.**

Podsumowanie

Uważam, że rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i wnoszę o jej dopuszczenie do publicznej obrony. Ponadto, biorąc pod uwagę dorobek publikacyjny związany z pracą doktorską, bardzo kompleksowy i bogaty zbiór danych eksperymentalnych, znaczący wkład wyników w rozwój dyscypliny i użyteczny charakter badań stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Gdańsk, 20.10.2024 r.

Piotr Jasiński