



Recenzja rozprawy doktorskiej
Label free methods of lactoferrin determination using new selective
DNA-based bioreceptor
Mgr inż. Agnieszka Paziewska-Nowak

Praca została wykonana w Instytucie Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęczu Polskiej Akademii Nauk w Warszawie pod opieką promotora Pani prof. dr hab. Doroty G. Pijanowskiej i promotora pomocniczego Pana dr inż. Marcina Urbanowicza.

Tematyka pracy dotyczy konstrukcji i zastosowania bioczuJNIKÓW z użyciem nowatorskiego bioreceptora opartego na oligonukleotydach, bioreceptora opartego na przeciwciałach, bioreceptora opartego na polimerach ze sferą odpowiadającą analitowi (ang. imprinted polymers) do oznaczania laktoferyny. Jako metody detekcji Autorka wybrała kilka współczesnych technik fizykochemicznych m.in. technikę rezonansu plazmonów powierzchniowych (SPR), elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną (EIS) oraz technikę spektrofotometryczną. Laktoferyna skupia na sobie uwagę analityków z różnych dziedzin, m.in. lekarzy, klinicyстів i specjalistów badania żywności. Jest białkiem o szerokim znaczeniu ze względu na swoje właściwości immunomodulacyjne, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe. Laktoferyna odgrywa również rolę ochronną i naprawczą w ludzkim genomie. Autorka zastosowała najlepszy z opracowanych układów pomiarowych do oznaczania laktoferyny w naturalnych próbkach biologicznych – ludzkiej ślinie. Miniaturyzacja i prostota układu pomiarowego oraz obniżenie kosztów analizy, jakie są efektem zastosowania bioczuJNIKÓW, są bardzo atrakcyjne we współczesnej chemii analitycznej. Cele pracy zostały jasno przedstawione. Rozprawa ma charakter doświadczalny. Autorka wykorzystwała możliwości stosowanych nowoczesnych technik fizykochemicznych do wyznaczenia parametrów fizykochemicznych opracowanych układów, wyznaczyła m.in. stałe szybkości reakcji asocjacji i dysocjacji, stałe równowagi, standardową entalpię (ΔH°), entropię (ΔS°) i potencjał Gibbsa (ΔG°). Tematyka pracy dobrze wpisuje się we współczesną chemię analityczną, wnosi duży wkład do wiedzy dotyczącej współczesnej analizy

chemicznej, a wyniki pracy mają duże znaczenie aplikacyjne. Z dużym zainteresowaniem i ciekawością przeczytałam pracę.

Ocena strony technicznej i edytorskiej pracy.

Praca jest napisana w języku angielskim, oprócz streszczenia w języku angielskim zawarte jest streszczenie w języku polskim. Praca zawiera również streszczenie w postaci graficznej, co w łatwy sposób pozwala na zorientowanie się w tematyce pracy. Zawiera alfabetyczny spis używanych skrótów wraz z ich objaśnieniami i spis symboli. Usprawnia to czytanie pracy.

Praca została przedstawiona na 164 stronach. Jest podzielona na 11 rozdziałów.

We wprowadzeniu Autorka opisuje laktoferynę i jej właściwości oraz znacznie, krótko wymienia dostępne metody oznaczania w oparciu o dane literaturowe. Dalej jasno przedstawia cele pracy i jej tezy oraz przegląd tematyki poszczególnych rozdziałów. Tematyka pracy jest podzielona na kilka części. Pierwsza z nich dotyczy przeglądu literatury i jest podzielona na cztery rozdziały. Pierwszy z nich dotyczy opisu wybranego analitu i jego znaczenia w klinicyście. Drugi – charakteryzuje różne metody rozpoznawania molekularnego w czujnikach chemicznych i wskazuje nowe trendy w tej dziedzinie. W rozdziale trzecim Autorka opisała krytycznie aktualne metody oznaczania laktoferyny, w czwartym – podsumowała przegląd metod i przedstawiła powody konieczności poszukiwań nowych warstw receptorowych i nowych czujników. Dalsza część to część doświadczalna, w której Autorka opisuje swoje osiągnięcia. W kolejnych rozdziałach omówiła stosowane odczynniki i materiały, aparaturę i szeroko opisała metodykę pracy. Dalej znajduje się chronologiczny opis badań, w tym badania dotyczące wyboru najlepszej konfiguracji oligonukleotydów, przygotowanie czujników z detekcją rezonansu plazmonów powierzchniowych, oddziaływania i analiza dynamiczna bioczujników w obecności potencjalnych interferentów, oznaczenia laktoferyny za pomocą czujników zawierających warstwę hydrożelu, konstrukcja nowych czujników z liniowo połączonym bioreceptorem, przeznaczonych do pomiarów impedymetrycznych i testów odniesieniowych (referencyjnych). Znajduje się tu opis stosowanych próbek naturalnych i procedura ich przygotowania oraz metodologia alternatywnych metod rozpoznawania molekularnego, opartych na reakcjach immunologicznych i na układach biomimetycznych, stosowanych w pracy. Znajdują się wyniki oznaczeń ilościowych i oszacowanie czasu poprawnego działania czujników. Wyniki

badan są krytycznie przedyskutowane i dobrze udokumentowane oraz porównane z aktualnie dostępnymi doniesieniami w literaturze naukowej. Ta część pracy jest zakończona podsumowaniem, wnioskami i perspektywą dalszych badań.

Następnie Autorka zamieściła spis rysunków i spis tabel oraz listę stosowanych odnośników literaturowych. Autorka zacytowała poprawnie i wyczerpująco 261 pozycji literaturowych, wśród których znalazły znaczące prace zarówno z lat dawniejszych jak i duża grupa prac najnowszych. Odnośniki literaturowe są starannie dobrane. Następnie znalazł się wykaz dwóch publikacji zawierających część wyników uzyskanych w pracy doktorskiej oraz ocena własnego wkładu do tych publikacji i prezentacja dorobku naukowego Autorki niezwiązanego z pracą doktorską, w tym spis publikacji (9), spis wystąpień konferencyjnych (12), wygłoszonych seminariów (3), pokazanych plakatów (3), wykaz stypendiów naukowych (1, 3 miesiące, Wydział Chemii, University of Florence).

Objętość części literaturowej i części doświadczalnej pracy jest dobrze wyważona. Praca jest ilustrowana licznymi rysunkami (42) oraz tabelami (13), które bardzo dobrze systematyzują i wyjaśniają omawiane zagadnienia.

Praca jest bardzo starannie przygotowana pod względem edytorskim. Stronę techniczną i edytorską pracy oceniam bardzo wysoko.

Ocena merytoryczna pracy.

Najcenniejszym aspektem pracy jest opracowanie nowatorskiego czujnika z detekcją elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej, w oparciu o znalezione w literaturze powinowactwo laktoferyny do DNA. Opracowany czujnik wykazuje znacząco lepsze właściwości od czujników innego rodzaju, opisanych w literaturze. Do celu prowadziła długa droga. Autorka zbadała systematycznie i wyczerpująco m.in. powinowactwo analitu do różnych sekwencji i długości oligonukleotydów, przygotowanie czujników z detekcją rezonansu plazmonów powierzchniowych, oddziaływania w obecności potencjalnych interferentów i przeprowadziła analizę dynamiczną bioczujników, oznaczenia laktoferyny za pomocą czujników zawierających warstwę hydrożelu, wykonała konstrukcję nowych czujników z liniowo połączonym bioreceptorem, przeznaczonych do pomiarów impedymetrycznych i testy odniesieniowe (referencyjne). Wyniki badań są poprawnie przedstawione i zinterpretowane, zwięźle i jasno wraz z oceną statystyczną. Opracowany czujnik Autorka wykorzystała do ilościowego oznaczania laktoferyny w próbkach naturalnych – ślinie ludzkiej, wykazując jego zastosowanie do oznaczeń klinicznych. Na

uwagę zasługuje krytyczne spojrzenie na doniesienia literaturowe, systematyczne badania parametrów stosowanych metod, dobrze przedyskutowane wyniki badań i dobrze udokumentowane wnioski. Cel pracy został osiągnięty.

Nie widzę słabych stron i wad rozprawy.

Podczas czytania pracy nasunęło mi się kilka pytań i uwag do Doktorantki:

1. Doktorantka nie uniknęła kilku błędów redakcyjnych:

Str. 119, jaka była metoda detekcji, wyjaśnienie znajduje się na str. 120,

Str. 105, linia 6 od dołu, powinno być Fig. 28. a nie Fig. 16A-B.

W ostatniej linii tej samej strony powinno być Fig. 29. zamiast Fig. 28.

Str. 115, linia 3 i dalsze – powtórzenie fragmentu tekstu.

2. Str. 36 – Autorka pisze, że nie ma metod analitycznych Ag-Ab bez znakowania. Są takie metody, jak np. test aglutynacji czy wytrącania (S. R. Mikkelsen, E. Corton, *Bioanalytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2004), chociaż są one nieliczne w porównaniu liczbą metod ze znakowaniem.

3. Autorka scharakteryzowała różne metody rozpoznawania molekularnego w czujnikach chemicznych i wskazała nowe trendy w tej dziedzinie. Szkoda, że Autorka wspomniała tylko jednym zdaniem o interferometrii biowarstw, (BLI, ang. Biolayer Interferometry), nie wspomniała o spektroskopii sił dynamicznych, (DFS, ang. Dynamic Force Spectroscopy) z użyciem mikroskopii sił atomowych (AFM) [Andreas Ebner, Reinat Nevo, Christian Rankl, Johannes Preiner, Hermann Gruber, Ruti Kapon, Ziv Reich, Peter Hinterdorfer, Probing the Energy Landscape of Protein-Binding Reactions by Dynamic Force Spectroscopy, rozdz.15 w P. Hinterdorfer, A. van Oijen (eds.), *Handbook of Single-Molecule Biophysics*, DOI 10.1007/978-0-387-76497-9_15, © Springer Science+Business Media, LLC 2009] i nie wspomniała o zastosowaniu dichroizmu kołowego (CD, ang. Circular Dichroism) do badania oddziaływań DNA i związków chemicznych [Jaroslav Kypr, Iva Kejnovska, Daniel Renciuik, Michaela Vorlickova, Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA, *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 6 1713–1725, doi:10.1093/nar/gkp026.].

4. Czy Autorka widzi możliwość regeneracji opracowanego czujnika i powtórnego użycia?

Moje uwagi mają charakter dyskusyjny i w żadnym stopniu nie umniejszają bardzo wysokiej oceny pracy. Wyniki badań Doktorantki mają duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne. Cel pracy został osiągnięty. Wyniki pracy zostały częściowo opublikowane. W dwóch publikacjach będących podstawą pracy doktorskiej Doktorantka jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym, co świadczy o jej wiodącym udziale w powstawaniu publikacji. Publikacje te są w renomowanych czasopismach o zasięgu ogóln światowym:

1. Agnieszka Paziewska-Nowak *, Marcin Urbanowicz , Kamila Sadowska , Dorota Genowefa Pijanowska, DNA-based molecular recognition system for lactoferrin biosensing, *International Journal of Biological Macromolecules* 253 (2023) 126747; IF = 8,025; CS = 14,5; punkty MEiN 100 pkt, liczba obcych cytowań **4** (Scopus)
2. Agnieszka Paziewska-Nowak *, Marcin Urbanowicz , Dorota G. Pijanowska, Label-free impedimetric biosensor based on a novel DNA-type receptor for selective determination of lactoferrin in human saliva, *Sensors & Actuators: B. Chemical* 405 (2024) 135377; IF = 8,4; CS = 14,6; punkty MEiN 200 pkt, liczba obcych cytowań **1** (Scopus)

Sumaryczny IF publikacji będących podstawą pracy doktorskiej wynosi 16,425. Suma punktów ministerialnych wynosi 300 pkt, oba czasopisma mają przypisaną dyscyplinę nauk chemicznych i bioinżynierii czy inżynierii biomedycznej. Obie publikacje doczekały się obcych cytowań, pomimo krótkiego terminu od ukazania się. W sumie Doktorantka opublikowała jedenaście prac o charakterze naukowym oraz brała czynny udział w dwunastu konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym, wygłaszając ustne komunikaty i prezentując plakaty. Jest to znaczącym osiągnięciem.

Doktorantka odbyła 3 miesięczny staż naukowy na Wydziale Chemii, University of Florence, który wpłynął pozytywnie na rozprawę doktorską.

Doktorantka była uczestniczką trzech projektów, które finansowały badania opisane w pracy. Aktualnie jest uczestniczką międzynarodowego projektu badawczego.

Podsumowując stwierdzam, że praca jest wykonana bardzo starannie, w dobrze przemyślany i systematyczny sposób.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Paziewskiej-Nowak jest wybitna, zasługująca na wyróżnienie w obliczu wymagań zwyczajowych i formalnych stawianych pracom doktorskim, określonych ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki,

art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 r. wraz z późniejszymi uzupełnieniami, i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę o wyróżnienie rozprawy ze względu na istotny wkład do wiedzy dotyczącej współczesnej analizy chemicznej, konstrukcję nowatorskiego bioczuJNIKA o wyśmienitych parametrach użytkowych oraz istotne znaczenie aplikacyjne pracy i istotny dorobek publikacyjny (całkowita punktacja dwóch publikacji będących podstawą pracy doktorskiej: MEiN 300 pkt, sumaryczny IF = 16,425; całkowita punktacja wszystkich publikacji: MEiN 715 pkt, sumaryczny IF = 40,814).



Warszawa, 20.10.2024 r.

prof. dr hab. Magdalena Maj-Żurawska