

Warszawa 18 września 2023

**Recenzja Rozprawy Doktorskiej magistra inżyniera Kaspra Marchlewicza
pt: „Opracowanie przenośnego zminiaturyzowanego urządzenia diagnostycznego z
elektrochemicznym czujnikiem DNA”**

Rozprawa doktorska magistra inżyniera Kaspra Marchlewicza zatytułowana „Opracowanie przenośnego zminiaturyzowanego urządzenia diagnostycznego z elektrochemicznym czujnikiem DNA” wykonana została w Katedrze Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej w ramach Projektu Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich „Od chemii do bioinnowacji” TRI-BIO-CHEM Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Elżbiety Malinowskiej z Politechniki Warszawskiej i prof. dr hab. Renaty Bilewicz z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Podjęta w dysertacji tematyka wpisuje się w aktualny nurt badawczy konstruowania zminiaturyzowanych, szybkich i przenośnych systemów do szybkiej diagnostyki medycznej. Ich zapotrzebowanie wynika z braku lekarzy w krajach rozwijających się i dostępności do ośrodków medycznych. Przemieszczanie się dużych grup ludzi z obszarów o różnych wymogach odnośnie szczepień oraz rezygnacja ze szczepień obowiązkowych dzieci wpływa, że zachwiana jest odporność zbiorowa i powracają dawno zapomniane choroby zakaźne jak np. odra. Ekspansja człowieka w coraz to większe obszary środowiska naturalnego oraz zmiany klimatu wywołane naszą działalnością powodują, iż częściej niż dotychczas słyszymy o przenoszeniu chorób ze zwierząt na człowieka, czy też uwalnianiu do środowiska patogenów np. z topniejących lodowców. Stawia to przed nami wyzwania szybkiej identyfikacji tych czynników i licznych testów przesiewowych. Ostatnie lata pandemii Covid-19 są tego najlepszym przykładem. Choć początek prac nad miniaturyzacją urządzeń wyznaczono umownie na koniec lat 50. ubiegłego stulecia, kiedy to zaprojektowano i zbudowano pierwsze układy scalone, to mimo upływu czasu od tego osiągnięcia uzyskanie zminiaturyzowanych i zintegrowanych układów nadal stanowi wielkie wyzwanie, pomimo istnienia sprawnie działających poszczególnych podzespołów.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest monografią z typowym podziałem na wstęp i cele pracy, część literaturową, metodykę, część doświadczalną, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię. We wstępie Doktorant wymienił zalety stosowania systemów Point-of-Care (POC) i Lab-on-a-Chip (LOC) do wykrywania patogenów nad standardowymi metodami badań wykonywanymi w laboratoriach diagnostycznych. Wspomniał również o ograniczeniach w dotychczasowych rozwiązaniach i jasno sformułował cel swojej pracy polegający na skonstruowaniu zintegrowanego urządzenia do amplifikacji DNA i jego wykrywania za pomocą biosensora z detekcją elektrochemiczną.

Część literaturowa podzielona jest na trzy sekcje. W pierwszej Doktorant opisał bardzo dokładnie urządzenia typu Lab-on-a-Chip, w tym podstawy ich działania, sposoby wytwarzania poszczególnych elementów mikrosystemów oraz stosowane w tym celu materiały i rozwiązania inżynieryjno-techniczne. Następnie zaprezentował przegląd mikrosystemów wykorzystywanych do amplifikacji DNA, wady i zalety poszczególnych rozwiązań oraz ich zastosowanie w diagnostyce medycznej. Drugą część poświęcił szczegółowemu opisowi biosensorów, w tym ich budowę i zasadę działania. Szczególną uwagę zwrócił na biosensory, w których warstwa receptorowa oparta jest o cząsteczki RNA i DNA a rozpoznawanie analitu odbywa się przez wykrywanie komplementarnych fragmentów nici RNA/DNA poprzez hybrydyzację lub dzięki powinowactwu wykrywanej cząsteczki z receptorem. W ostatniej części doktorant zaprezentował obecnie stosowaną technikę w diagnostyce błonicy tzw. test Eleka oraz opisane w literaturze metody: umożliwiające wykrywanie np. toksyny błonicy poprzez jej oddziaływanie z przeciwciałami unieruchomionymi na nanocząstkach i śledzeniu zmiany położenia pasma LSPR lub przeciwciał przeciw toksynie błonicy za pomocą immunosensora z detekcją elektrochemiczną.

Podsumowując, część literaturowa została bardzo dobrze przemyślana. Przedstawiono w niej najistotniejsze zagadnienia dotyczące budowy i funkcjonowania mikrosystemów używanych do konstrukcji urządzeń typu POC i LOC, materiałów i technik stosowanych do ich wytworzenia. Przedstawia też aktualny stan wiedzy odnośnie wybranej grupy biosensorów i uwidacznia konieczność pracy nad nowymi rozwiązaniami w kierunku wykrywania błonicy.

Kolejna część pracy to metodyka, w której znalazły się szczegółowe informacje odnośnie stosowanych w pracy reagentów, materiałów i procedur.

Opis wyników własnych składa się z trzech części. Pierwsza poświęcona jest skonstruowaniu mikrosystemu do prowadzenia reakcji amplifikacji DNA. W tym celu Doktorant skupił swój wysiłek na opracowaniu poszczególnych jego elementów. Najpierw zaprojektował system podgrzewania trzech stref niezbędnych do prowadzenia reakcji PCR w mikrokanalach. Następnie przedstawionych jest kilka wariantów kształtów mikrokanalów, które zostały wykonane za pomocą różnych technik tj. fotolitografia czy frezowanie. Przebadał dwa materiały: poli(dimetylosiloksan) (PDMS) i poli(metakrylan metylu) (PMMA) pod kątem ich przydatności do wytwarzania kanałów, łączenia ich z podłożem oraz zapobiegania adsorpcji biomolekuł. Na wielu etapach w tych układach prowadzono reakcję amplifikacji DNA oraz próby kontrolne w tradycyjnych termocyklerach, aby sprawdzić czy reakcja ta zachodzi w badanym układzie lub, aby wyeliminować problemy związane z wydajnością uzyskiwanego DNA i opracować optymalne składy mieszanin reakcyjnych, czasu przebywania w danej strefie temperaturowej. W pracy uwzględniono również konieczność generowania i kontroli przepływu w oparciu o istniejące już rozwiązania opracowane wcześniej przez grupę badawczą, w której powstała niniejsza praca. Doświadczenie zdobyte podczas pracy w modułowym systemie do amplifikacji DNA Doktorant postanowił wykorzystać do opracowania i wytworzenia zintegrowanego mikrosystemu PCR. Z tego względu zdecydował się na zmianę materiału i techniki wytwarzania mikrokanalów. W tym celu wykorzystał folie poliestrowe o różnych właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych i ablację laserową do przygotowania mikrokanalów. To rozwiązanie umożliwiło wytworzenie mikrosystemu zapewniającego szczelność, odporność chemiczną, stabilność w wymaganym reakcją PCR zakresie temperatur i możliwość zintegrowania z pasywnymi zaworami, które można wykonać z tego samego materiału. Ponadto tego typu rozwiązanie jest możliwe do wdrożenia i produkcji mikrosystemów PCR na masową skalę.

Druga część opisu wyników własnych poświęcona jest konstrukcji biosensora do szybkiego i selektywnego wykrywania błonicy opartego na krótkich fragmentach DNA typu „hairpin” do rozpoznawania molekularnego z detekcją elektrochemiczną. W pierwszej kolejności Doktorant wyznaczył z pomocą dedykowanego oprogramowania sekwencje nukleotydów i ich struktury drugorzędowe, które wykorzystał do opracowania warstwy receptorowej. Następnie systematyczne badania umożliwiły mu wybranie jednej sondy molekularnej, zaproponowanie dwóch substancji blokujących powierzchnię elektrody wolną od receptora i opracowanie



optymalnych warunków do prowadzenia hybrydyzacji tj. temperatura reakcji, stężenie jonów magnezu i dodatek DMSO – substancji zapobiegającej występowaniu oddziaływań niespecyficznych z białkami. Otrzymany sensor cechował się selektywnością wobec zjadliwego szczepu maczugowca błonicy i zdolnością do pracy w próbkach zarówno wzorcowych, jaki i tych rzeczywistych w przypadku stosowania złotych elektrod dyskowych oraz tych wytworzonych metodą sitodruku, które mogą być stosowane w układach zminiaturyzowanych.

W części trzeciej Doktorant zaprezentował działanie opracowanego biosensora do wykrywania błonicy w zintegrowanym układzie składającym się z wielowarstwowego mikrosystemu PCR i trójelektrodowego przetwornika elektrochemicznego. Przedstawione wyniki jednoznacznie wskazują, że taki układ działa tzn. możliwa jest amplifikacja DNA w mikrosystemie kanałowym i detekcja zjadliwego szczepu maczugowca błonicy, a czas całkowitej analizy trwał poniżej jednej godziny.

Pracę kończy rozdział, w którym Doktorant w zgrabny sposób przedstawiał podsumowanie i jasno wyartykułował wnioski płynące z pracy.

Pod względem edytorskim praca jest bardzo dobrze przygotowana. Zachowanie systematyczności w badaniach, kodowanie licznych próbek pozwoliło w prosty sposób śledzić postępy w pracy nad ulepszaniem mikrosystemów PCR i biosensora. W przygotowaniu obszernego dokumentu nie trudno o niewielkie błędy edycyjne, np. brak przymków, brak lub nadmiar znaków interpunkcyjnych, czy niefortunne sformułowania jak „kształt piku SWV jest wygodny do analizy”, „odpowiadające otworom justującym” lub brak podpisu do rysunku 15. Ponadto rysunki 15, 34 czy te zawarte w tabeli 8 ze względu na rozmiar są nieczytelne.

W trakcie lektury niniejszej rozprawy doktorskiej znalazłam kilka kwestii do dyskusji:

W pracy nie znalazłam fragmentu poświęconego szczegółowemu opisowi reakcji łańcuchowej polimerazy oraz schematu, które wyjaśniłyby konieczność wykonywania pomiarów w roztworach wzorcowych przed tymi w próbkach rzeczywistych.

Brak informacji na temat powtarzalności modyfikacji dyskowej elektrody złotej warstwą receptorową (str. 117-118) w badaniach wstępnych służących znalezieniu optymalnych parametrów pracy biosensora do wykrywania zjadliwego szczepu maczugowca błonicy. Informacja ta została również pominięta przy opisie działania elektrod zintegrowanych (str. 132). Czy została określona optymalna ilość receptora na elektrodzie zapewniająca prawidłowe

warunki do rozpoznawania błonicy wykorzystującego mechanizm hybrydyzacji pojedynczych nici DNA?

Większość przedstawionych wyników posiada informację o ilości przeprowadzonych prób. Tej informacji zabrakło w przypadku pomiaru temperatury w mikrosystemach kanałowych oraz błędu jakim są one obarczone. Jaka jest wielkość czujnika Pt i w którym miejscu kanału dokonywano pomiaru temperatury?

Podsumowanie

Po zapoznaniu się z treścią przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej mogę jednoznacznie stwierdzić, że Doktorant ma merytoryczne przygotowanie do prowadzonych przez siebie badań. Świadczy o tym dobór cytowanej literatury, spośród której Doktorant zacytował najistotniejsze z prac z punktu widzenia swojej rozprawy doktorskiej z ogromnego zbioru, który wynika z popularności stosowanych przez niego materiałów do wytwarzania mikroukładów. Zaproponował nowe receptory i eksperymentalnie wykazał ich działanie zarówno na elektrodzie dyskowej, jak i w układzie zminiaturyzowanym. Opracował zintegrowany mikrosystem do szybkiej amplifikacji DNA i włączył do niego opracowany przez siebie biosensor do wykrywania zjadliwego szczepu maczugowca błonicy. Badania stanowiące większą część jego osiągnięć opisanych w tej rozprawie zostały opublikowane z znaczącym w dziedzinie chemii analitycznej czasopiśmie Talanta w 2021 roku. O ich wpływie na rozwój wiedzy o biosensorach kompatybilnych z mikrosystemami np. POC świadczą liczne cytowania przez niezależne zespoły badawcze. Ponadto Doktorant jest współautorem sześciu innych artykułów oraz rozdziałów w książkach. Zawarte w tej recenzji krytyczne uwagi nie wpływają na pozytywną ocenę niniejszej pracy. W związku z powyższym, uważam, że rozprawa doktorska mag inż. Kaspra Marchlewicza pt. „Opracowanie przenośnego zminiaturyzowanego urządzenia diagnostycznego z elektrochemicznym czujnikiem DNA” spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742). Na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie magistra inżyniera Kaspra Marchlewicza do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Mając na uwadze opisane w niniejszej pracy badania, które doprowadziły do opracowania i wytworzenia zintegrowanego mikrosystemu PCR połączonego z

zminiaturyzowanym sensorem oraz eksperymentalne wykazanie jego działania tzn. wykrywania obecności w próbce genu zjadliwego szczepu maczugowca błonicy w całkowitym czasie analizy z amplifikacją DNA poniżej 1 godziny skłoniły mnie do złożenia wniosku o wyróżnienie tej dysertacji.



Joanna Niedziółka-Jönsson