



Warszawa, 15.09.2023

Dr hab. Sławomir Jakiela, prof. uczelni
e-mail: slawomir_jakiela@sggw.edu.pl
tel.: +48 22 59 38626

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Kaspra Marchlewicza pt. **”Opracowanie przenośnego zminiaturyzowanego urządzenia diagnostycznego z elektrochemicznym czujnikiem DNA,**” wykonanej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej

Promotorzy:

Prof. Dr hab. inż. Elżbieta Malinowska (Politechnika Warszawska)
Prof. Dr hab. Renata Bilewicz (Uniwersytet Warszawski)

Szkoła Główna Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Biologii
Katedra Fizyki i Biofizyki

ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa
+48 22 59 38611
kfb@sggw.edu.pl
www.sggw.pl
www.kf.sggw.pl

Przedstawiona do recenzji praca doktorska składa się z 3 części podzielonych na rozdziały i podrozdziały, spisu treści, streszczenia, wstępu, celu pracy, podsumowania, i wniosków, oraz bibliografii a także wykazu skrótów - liczy 156 stron. Napisana została w języku polskim i ubogacona wykresami, schematami i ilustracjami, a także tabelami. Styl pracy jest bardzo dobry, nieliczne są literówki, czy błędy gramatyczne. Edytorsko praca wygląda bardzo profesjonalnie.

Tematyka rozdziałów przedstawionych w pracy doktorskiej podzielona została na trzy części: i) część literaturową, ii) metodykę, oraz iii) część doświadczalną. Rozprawa doktorska ma charakter monotematyczny i dotyczy opisu szeregu działań inżynieryjno-chemiczno-biologicznych, które były przez autora sprawdzane i modyfikowane, by osiągnąć zamierzony cel pracy – opracowanie systemu umożliwiającego szybkie i jednoznaczne wykrywanie fragmentu genu szczepu maczugowca błonicy.

Oдноśnie części pierwszej – część literaturowa

Pierwsza część stanowi wprowadzenie do tematyki badań jaką zajmuje się Doktorant. Opisane w tej części zostały układy typu lab-on-a-chip, czyli małe laboratoria biochemiczne umieszczane najczęściej w przezroczystych polimerach wielkości karty kredytowej. Pan Kasper Marchlewicz opisał pokrótce podstawy mikroprzepływów oraz wytwarzania urządzeń typu lab on a chip. W tej części pracy Autor dokładnie opisuje materiały wykorzystywane przy wytwarzaniu mikrosystemów przepływowych, a także omawia techniki ich wytwarzania. Następnie Doktorant charakteryzuje biosensory, których elementem bioczułym jest DNA i RNA. Dokładniej zreferowane zostały biosensory DNA typu „szpilka do włosów”, z uwzględnieniem ich immobilizacji do złotej powierzchni elektrod. Kolejnym poruszonym tematem w tej części są sposoby wykrywania zakażenia błonicą, wywołwaną przez toksyczny szczep maczugowca błonicy.

Błędy w tej części, które przytrafiły się Autorowi:

- Na str. 18 Pan Kasper Marchlewicz napisał, że przepływ laminarny w mikrokanalach jest spowodowany przez dominację sił powierzchniowych nad objętościowymi. Nie jest to poprawne stwierdzenie i wymaga wyjaśnienia.
- Na str. 22 Autor niezbyt precyzyjnie pisze, że czas dyfuzji w mikroskali jest znacząco krótszy niż w makroskali. Rozumiem co Doktorant chciał przekazać, jednak trzeba pamiętać, że za szybkość dyfuzji odpowiada głównie współczynnik dyfuzji.
- Doktorant stwierdza, że dyfuzja w warunkach przepływu laminarnego jest procesem wolniejszym w porównaniu do intensywnej wymiany masy itd. – dlaczego tylko w przepływie laminarnym?
- Tabela przedstawiająca zestawienie właściwości materiałów konstrukcyjnych do wytwarzania mikrosystemów zawiera błędne określone przepuszczalności gazów. Wynika z niej, że sztywne polimery są w tej materii lepsze niż PDMS – poproszę Doktoranta o porównanie współczynników dyfuzji np. dla tlenu w tych materiałach.

Oдноśnie części drugiej – Metodyka

W tej krótkiej części opisano reagenty, materiały i aparaturę badawczą, które Doktorant wykorzystał w swoich badaniach. Scharakteryzowano również procedury badawcze użyte w pracy laboratoryjnej jak: amplifikacja fragmentu genu zjadliwego szczepu błonicy za pomocą standardowej i asymetrycznej reakcji PCR, elektroforezę żelową oraz przygotowanie warstwy receptorowej biosensora.

Oдноśnie części trzeciej – część doświadczalna

Ta część rozprawy doktorskiej jest najbardziej obszerna i opisuje dokładnie wszystkie wyniki i problemy, jakie Doktorant napotkał w trakcie przygotowywania poszczególnych elementów systemu do wykrywania fragmentu genu szczepu maczugowca błonicy.

Pan mgr inż. Kasper Marchlewicz przeprowadził szereg eksperymentów mających na celu optymalizację układu mikroprzepływowego serpentynowego i cyklicznego dostosowanego do zmian temperatury potrzebnych w reakcji amplifikacji DNA. Opisane zostały systemy hybrydowe oparte o łączenie PDMSu ze szkłem, a także systemy wykonane z twardego polimeru jakim było PMMA. Wszystkie zaprezentowane w pracy układy były testowane z uwzględnieniem: i) zgodności wymiarów uzyskanych struktur z założeniami projektowymi, ii) pęcznieniem PDMSu, iii) adsorpcji polimerazy na powierzchni układu i iv) uzyskanej temperatury w układzie w poszczególnych strefach, która miała istotny wpływ na wynik reakcji PCR. Dodatkowo Autor zaprojektował, przetestował i zoptymalizował pasywny mikrozwrot, który był rozwiązaniem zintegrowanym z docelowym wielowarstwowym układem przepływowym wykonanym z foli poliestrowych. Ponadto cały system został wyposażony w autorskie układy zasilania płynami i grzania próbki niezbędne do przeprowadzenia amplifikacji DNA maczugowca błonicy.

Do badań biologicznych Doktorant wykorzystał mechanizm rozpoznawania molekularnego typu „szpilka do włosów”, z ang. „hairpin”. W rozwiązaniu tym sprawdzano specyficzność dopasowania jednoniciowego fragmentu łańcucha DNA zmodyfikowanego z jednego końca grupą tiolową, a z drugiego znacznikiem redoks, z obecnym w badanej próbce DNA maczugowca błonicy. Zaprojektowana sonda była przymocowywana grupami tiolowymi do złotej elektrody i wyposażona dodatkowo w kowalencyjny znacznik elektrochemiczny. Obecność komplementarnego DNA do zaprojektowanego sensora powodowała zmniejszenie przepływającego prądu przez elektrodę. Doktorant przetestował 4 sondy z różnymi sekwencjami nukleotydów analizując ich energię swobodną Gibbsa, jako marker stabilności struktury drugorzędowej, jak i sygnały elektrochemiczne uzyskiwane w rzeczywistych eksperymentach z DNA błonicy maczugowca. Pan mgr inż. Kasper Marchlewicz dopasował eksperymentalnie: i) odpowiednie stężenie jonu Mg^{2+} w roztworze hybrydującym w celu stabilizacji podwójnej nici DNA, ii) czas potrzebny na efektywny przebieg hybrydyzacji, a także iii) temperaturę najefektywniejszej pracy zaproponowanej sondy. Badania i optymalizacje przeprowadzone przez Doktoranta na wypełniaczu MCH zostały ponownie przeprowadzone dla wypełniacza DEDTC, który powodował zwiększenie stabilności i przewodności warstwy receptorowej wybranego sensora opartego na strukturze sekwencji TOX3.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Kaspra Marchlewicza stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora określone w Ustawie. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobre opanowanie i wykorzystanie przez Doktoranta szerokiego zakresu nowoczesnych metod badawczych z wykorzystaniem dostępnych baz danych, a także świetne opanowanie umiejętności dedukcji,



opracowania i prezentacji wyników. Obszar zainteresowań naukowych Pana mgr. inż. Kaspra Marchlewicza jest bardzo szeroki i wchodzi w zakres wielu dziedzin, takich jak inżynieria, mechanika płynów, chemia, biochemia, czy medycyna.

W związku z przedstawioną wyżej bardzo pozytywną oceną całej pracy doktorskiej wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej **o dopuszczenie Pana mgr. inż. Kaspra Marchlewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Ze względu na oryginalność tematyki badawczej, ilość wykonanej pracy, nowatorskie podejście w realizacji określonego celu badawczego, a także interdyscyplinarne ujęcie badanego problemu, oraz możliwość rzeczywistej aplikacji wytworzonego urządzenia do testów medycznych **rekomenduje Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej rozważenie możliwości wyróżnienia niniejszej rozprawy doktorskiej.** Wskazane przez recenzenta błędy, czy uchybienia, należy uznać za nieistotne przy całościowej ocenie rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Kaspra Marchlewicza.

Recenzent,

.....
Dr hab. Sławomir Jakieta, prof. uczelni