



**POLITECHNIKA WARSZAWSKA**  
**WYDZIAŁ CHEMICZNY**  
**Katedra Biotechnologii Medycznej**



**Prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska, prof. zw. PW**

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, tel.: 022-234-5657; fax: 022-234-5631, E-mail: ejmal@ch.pw.edu.pl

Warszawa 2018-08-10

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Sankiewicz**  
**pt. „Rozwój i zastosowanie analityczne bioczuJNIKÓW z detekcją**  
**Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imiging (SPRI)”**

*Recenzja została przygotowana zgodnie z wytycznymi dla recenzenta zawartymi w aktualnym Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Dz.U. poz. 261) z dnia 30 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. Odpowiedni zapis w rozdz. 1, § 6, pkt. 5 stanowi, że (cytuje): „W przypadku gdy rozprawę doktorską stanowi samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, recenzja zawiera ocenę indywidualnego wkładu kandydata w powstanie tej pracy.”*

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Sankiewicz zatytułowana „Rozwój i zastosowanie analityczne bioczuJNIKÓW z detekcją Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imiging (SPRI)” dotyczy opracowania nowoczesnych narzędzi analitycznych, jakimi są biosensory, do wykrywania bioanalitów istotnych w diagnostyce medycznej. Praca została wykonana w Instytucie Chemii na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku. Tematyka pracy wpisuje się w obszar najnowszych zainteresowań badawczych dr hab. Ewy Gorodkiewicz, pełniącej funkcję promotora przedłożonej do oceny dysertacji.

Zainteresowanie zastosowaniem biosensorów w medycynie oraz przemyśle wciąż rośnie. Biosensory są uznawane za korzystną alternatywę dla klasycznych metod biologicznych oznaczania ważnych metabolitów, głównie ze względu na niski jednostkowy koszt analizy, możliwości miniaturyzacji oraz znacznie krótszy czas analizy. Opracowanie biosensorów o pożądanym parametrach pracy nie jest łatwe i wymaga połączenia wiedzy i doświadczenia badaczy reprezentujących różne dyscypliny. Warto tu nadmienić iż w literaturze można znaleźć doniesienia dotyczące biosensorów na setki analitów. W rzeczywistości dostępne handlowo są bioczuJNIKI do

oznaczania zaledwie kilkunastu różnych substancji, a najbardziej rozpowszechnionym i stosowanym (nie tylko w analizatorach klinicznych, ale także w warunkach domowych) jest sensor do oznaczania glukozy. Badania nad biosensorami prowadzą renomowane uczelnie i instytucje badawcze na całym świecie i zainteresowanie nimi jako narzędziami diagnostycznymi wciąż dynamicznie rośnie, o czym świadczy też liczba publikacji na ten temat. Na przestrzeni ostatnich 20 lat liczba doniesień naukowych dotyczących biosensorów wzrosła niemalże 10-krotnie (zgodnie z danymi portalu pubmed.gov). Zgodnie z prognozą opracowaną przez Global Market Insights, Inc, przed 2024 r. rynek biosensorów ma być wart około 29,6 mld dolarów, podczas gdy jeszcze rok temu szacowano go na 14,8 mld dolarów. Powyższe argumenty są wystarczająco zachęcające aby podejmować prace badawcze i konstrukcyjne związane z opracowaniem nowych i optymalizacją znanych biosensorów. Zatem niniejsza praca wpisuje się znakomicie w bieżące światowe trendy badawcze.

### **Strona redakcyjna**

Rozprawę stanowi 11 rozdziałów napisanych w języku polskim. Została przedłożona jako zbiór 7 spójnych tematycznie oryginalnych artykułów (D1-D7). Dysertację otwierają streszczenia w języku polskim i angielskim (rozd. I), spis publikacji i zgłoszeń patentowych stanowiących podstawę niniejszej dysertacji (rozd. II) oraz stosowanych skrótów (rozd. III). Kolejne rozdziały IV-IX stanowią zasadniczą, merytoryczną część doktoratu, na którą składają się wstęp nakreślający zakres tematyczny pracy (rozd. IV), zdefiniowanie celu i poszczególnych etapów badań (rozd. V), przegląd literaturowy z zakresu realizowanych prac oraz 14-stronicowy opis prac badawczych (rozd. VII) nawiązujący do dołączonych publikacji. Dopelnieniem tej części jest krótki (niespełna 1-stronicowy), lakoniczny rozdział VIII zatytułowany „Podsumowanie i wnioski” oraz spis publikacji (rozd. IX), które cytuje Doktorantka w rozdz. VI-VIII. Dodatkowo w rozdziale X odnajdujemy całkowity dorobek naukowy doktorantki. Całość zamyka rozdział XI zatytułowany „Załączniki”, który zawiera kopie publikacjach stanowiących podstawę dysertacji wraz z oświadczeniami Doktorantki i innych współautorów dotyczące udziału w pracach D1-D7.

Część dysertacji stanowiąca przewodnik do załączonych publikacji została przygotowana dość niestarannie od strony edytorskiej (interpunkcja, niekonsekwentne spacje, skróty myślowe, zapis bibliografii). Robi to dość niekorzystne wrażenie na czytającym, tym bardziej że tekst jest krótki.

### **Wartość merytoryczna i użytkowa**

We wstępie Doktorantka zarysowuje powody, które przyczyniły się do podjęcia badań, uzasadnia wybór obiektów badań i przyjętej techniki pomiarowej. W kolejnym rozdz. V Autorka jasno formułuje cel pracy i przedstawia kolejne etapy jego realizacji. Przegląd literaturowy to zaledwie kilka definicji i informacji o wykorzystaniu zjawiska powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR), jednej z możliwych technik pomiarowych stosowanych przy konstrukcji biosensorów. W kolejnym rozdziale (VII)

mgr Sankiewicz udostępniła czytającemu syntetyczne omówienie zagadnień bezpośrednio związanych tematycznie z publikacjami D1-D7, w rozbiciu na zagadnienia dotyczące konstrukcji sensorów, tj. (i) zasada działania biosensorów SPRI [D1, D7], (ii) metodyka modyfikacji i regeneracji przetwornika [D2], (iii) strategie immobilizacji bioreceptorów [D2-D7], (iv) kontrola stabilności powierzchni czujników [D2-D7] oraz odnoszące się do możliwości wykorzystania zaprojektowanych biosensorów w praktyce analitycznej [D2-D7]. Generalnie komentarz do artykułów stanowiących podstawę dysertacji, włącznie z podsumowaniem i wnioskami, to zaledwie 20 stron tekstu wraz ilustracjami. Nic dziwnego, że informacje te są niezwykle skrótowe. W tej sytuacji spis publikacji przedstawiony w rozdz. III należało potraktować jako zaproszenie do ich przeczytania, co też uczyniłam.

Publikacje D1-D7 ukazały się w latach 2014-18. Pierwsza z prac została opublikowana w polskim czasopiśmie „*Chemik*”, zaś pozostałe 6 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, w większości o znacznym współczynniku oddziaływania: „*Cellular and Molecular Bioengineering*” ( $IF_{aktualny} = 2.535$ ), „*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*” ( $IF_{aktualny} = 3.255$ ), „*Analytical Biochemistry*” ( $IF_{aktualny} = 2,334$ ) oraz „*Analytical and Bioanalytical Chemistry*” ( $IF_{aktualny} = 3.431$ ). Łączny  $IF_{aktualny}$  tych prac to 14,238, a liczba cytowań ok. 20. Te dane bibliometryczne, w odniesieniu do innych recenzowanych przeze mnie doktoratów, należą do jednych z lepszych.

Po zapoznaniu się z treścią artykułów D1-D7 uważam, że prace te są wartościowe, wnoszące nowe informacje poszerzające wiedzę w odniesieniu do konstrukcji biosensorów SPRI. Można uznać, że opracowane czujniki są konkurencyjne w odniesieniu do obecnie istniejących metod (głównie ELISA), a w kilku przypadkach (tj. proteasomy) zaprezentowane biosensory SPRI są pionierskimi narzędziami do oznaczania tychże analitów. Ponadto, lektura artykułów wskazuje, że w kolejnych publikacjach rozwijana jest metodyka przygotowania biosensorów, dodawane są nowe sposoby ich testowania, itp. Zauważalna jest także poprawa samego sposobu opisu i przedstawienia wyników, co świadczy o dążeniu do ulepszania wyjściowych koncepcji i unikaniu powielania raz przyjętych schematów.

W omawianych artykułach duży nacisk położony jest na funkcjonalność biosensorów i większość badań realizowano przez pryzmat bezpośredniej oceny wpływu wybranych czynników na działanie (parametry pracy) danego biosensora. Przykładowo – procedura określana jako „optymalizacja stężenia receptora”, *de facto* nie polegała na próbie wyznaczenia gęstości powierzchniowej cząsteczek receptora, ale zbadaniu zależności wartości sygnału analitycznego od stężenia roztworu użytego do immobilizacji receptora. Tak naprawdę nie wiadomo, jak przekłada się to stężenie na gęstość powierzchniową, a gęstość na efektywność wiązania analitu. Widać, że nadrzędnym celem Doktorantki było wykazanie, że biosensor wykazuje zdolność do selektywnego wiązania wybranego biomarkera, a parametry analityczne opracowanych metod predestynują je do prowadzenia oznaczeń w próbkach rzeczywistych – co ponad wszelką wątpliwość się udało. Siłą rzeczy jednak, nieco mniejszy nacisk położony został na doświadczalne potwierdzenie natury zjawisk

stanowiących istotę mechanizmu działania opracowanych biosensorów. Nie jest to zarzut, a bardziej sugestia, że nieco szerzej zakrojone badania optymalizacyjne i szersze spojrzenie na wybrane aspekty konstrukcji biosensorów (które nie były dyskutowane w ramach przedłożonej do recenzji pracy) mogłyby przynieść wiele innych, ciekawych informacji mogących zaowocować dalszą poprawą parametrów opracowanych metod.

Najtrudniejszym elementem oceny, w przypadku dysertacji składającej się z cyklu wieloautorskich publikacji opatrzonych komentarzem doktoranta, jest wyodrębnienie jego indywidualnego wkładu w powstanie pracy. Komentarz napisany w stronie biernej nie ułatwiał pracy. Dopiero oświadczenia Doktorantki i współautorów załączone do publikacji D1-D7 w pełni rozjaśniły sprawę. Mgr Sankiewicz można przypisać znaczący udział w planowaniu i przeprowadzaniu doświadczeń, zestawianiu i interpretacji wyników, czy zbieraniu literatury. Potwierdza to również pozycja pierwszego autora w 7 i autora korespondencyjnego w 2 z omawianych artykułów. Mgr Sakiewicz w trakcie realizacji pracy doktorskiej podjęła się trudnych, czasochłonnych i wymagających współpracy interdyscyplinarnych zadań badawczych i wywiązała się z nich bardzo dobrze. O dojrzałości młodego naukowca, jakim jest Doktorantka świadczy również to, że brała udział w przygotowaniu manuskryptów.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki, jako członka zespołów realizujących projekty interdyscyplinarne, zaliczam:

- Zweryfikowanie postawionych hipotez i zrealizowanie wszystkich zaplanowanych etapów badań, co pozwoliło na opracowanie biosensorów bazujących na wykorzystaniu techniki SPRI i odpowiednio zaprojektowanych warstw receptorowych. Co ważne - biosensorów o zakładanych parametrach pracy.
- Opracowanie czułych i selektywnych biosensorów dla kilku wybranych, ważnych z diagnostycznego punktu widzenia bioanalitów (tj., lamininy-5, kolagenu IV, fibronektyny, proteasomów oraz C-terminalnej ubikwityny L1).
- Zaproponowanie wartościowego i dobrze uzasadnionego sposobu weryfikacji użyteczności analitycznej uzyskanych biosensorów, z uwzględnieniem szerokiej puli próbek rzeczywistych pochodzących od pacjentów. Stanowi to walor, gdyż w oczywisty sposób wskazuje potencjał aplikacyjny prac i dokumentuje możliwe obszary zastosowań opracowanych biosensorów.
- Zdobycie doświadczenia w zakresie projektowania metod bioanalitycznych z wykorzystaniem biosensorów SPRI.
- Zaproponowanie szeregu układów receptor/biomarker, których użyteczność została potwierdzona w toku niniejszej pracy doktorskiej, a które mogą z powodzeniem stanowić punkt wyjścia do projektowania innego typu sensorów (elektrochemicznych, optycznych czy nawet sensorów z pośrednią detekcją sygnału).

Niemniej jednak, po lekturze przewodnika i załączonych publikacji nasuwają się pewne pytania i wątpliwości, do których należałoby się ustosunkować. Kilka szczegółowych uwag/pytań zamieszczam poniżej:

#### *Przewodnik do publikacji*

- W całości przewodnika i publikacji D1 (mającej w założeniu charakter przeglądowy/wprowadzający) technika SPRi jest opisana ze ściśle określonego punktu widzenia. Może to tworzyć wrażenie iż Autorka uważa, że opisywany w pracy układ jest dominującym rozwiązaniem konstrukcyjnym – a moim zdaniem SPRi w fazie stacjonarnej jest raczej rzadziej spotykaną odmianą w porównaniu do wersji przepływowej, chociażby z uwagi na dostępność komercyjną aparatów przepływowych.
- Streszczenie, str. 4: „.....do zmodyfikowania powierzchni złota na chipie wykorzystano różne rodzaje tiolów (pisownia oryginalna).” To stwierdzenie sugeruje tylko alifatyczne/aromatyczne tiole. Czy w tym pojęciu mieści się również cysteamina?
- Streszczenie, str. 5: „- określenie optymalnego stężenia receptora na powierzchni biosensora”. W klasycznej definicji receptor jest integralną częścią biosensora, więc trudno mówić o receptorze „na powierzchni biosensora”, a raczej „na powierzchni modyfikowanego przetwornika”.
- Wykaz skrótów, str. 10: jest „charge- coupe device”, powinno być „coupled”,
- Wykaz skrótów, str. 10: angielskie nazwy chlorowodorków amin są błędnie tłumaczone na język polski jako wolne aminy.
- Przegląd, str. 20: „tiol z końcową grupą alkilową (oktadekanotiol – ODM)” - łańcuch alifatyczny trudno nazwać grupą końcową.
- Przegląd, str. 21: „W celu aktywacji do roztworów przeciwciała lub inhibitora peptydowego dodawano roztwór mieszaniny EDC i NHS (w stosunku objętościowym EDC : NHS = 1: 1) w buforze węglanowym o pH= 8,5. Następnie tak sporządzone roztwory nanoszono na miejsca aktywne na chipie. Całość inkubowano w temperaturze 37° C przez 1h.” Taka metodologia niesie za sobą pewne ryzyko kowalencyjnego sieciowania, związane z jednoczesną obecnością wolnych grup karboksylowych i aminowych w białkach (w tym przeciwciałach) i peptydach. Jak Autorka ocenia ryzyko z tym związane? Czy był sprawdzany/ rozważany układ odwrotny (immobilizacja kwasu ω-merkaptokarboksylowego i wiązanie przeciwciała poprzez grupy aminowe)?
- Tabela 1, str. 30: zabrakło krytycznego porównania/przeglądu literaturowego konkurencyjnych metod oznaczania wymienionych w pracy bioanalitów i oceny atrakcyjności uzyskanych rozwiązań na ich tle,
- Tabela 1, str. 30: Dlaczego dla biosensora do oznaczania proteasomu na bazie cysteaminy LOD i LOQ podane są jako zakresy a nie konkretne wartości?

## Artykuły D1-D7:

- We wszystkich artykułach, gdzie wykorzystywano warstwę z cysteaminy i przeciwciało (załączniki D4-7) schematyczne rysunki są niepoprawne - skoro jest dowiązanie przez EDC (wiązanie amidowe) to na połączeniu cysteaminy z przeciwciałem nie może być  $-NH_2$  (najwyżej  $-CONH-$  lub  $-NH-$ ).
- D2: W roli receptora wykorzystano peptyd - inhibitor PSI (Z-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H), który następnie przyłączano kowalencyjnie do cysteaminy. Mimo, iż bezpośrednio dowiązanie okazało się skuteczne i pozwoliło osiągnąć selektywność oddziaływania pomiędzy receptorem a analitem, czy rozważała Pani aspekty steryczne? Czy cała sekwencja czy tylko jej fragment odpowiada za wiązanie? Czy Pani zdaniem związanie receptora stosunkowo blisko powierzchni, bez żadnych segmentów neutralnych nie ogranicza jego dostępności dla stosunkowo dużego analitu?
- D2: Experimental: Składnikiem buforu w którym przygotowano roztwór proteasomu 20S był 1 mM DTT (skrót od ditiotreitolu). Czy rozważała Pani wpływ tego czynnika na stan monowarstwy? Jak bardzo była rozcieńczana podstawowa próbka białka?
- W artykule D2 sugerowany jest proces hydrolizy wiązań amidowych pod wpływem Mieszanki Triton X100 / 100 mM NaOH. Jeżeli następuje hydroliza wiązania amidowego, to czy np. cały peptyd się rozpada? Byłoby to warte dalszej analizy (np. badania w roztworze i HPLC, kontrolne próby negatywne bez EDC. Tego moim zdaniem zabrakło w artykule.
- D2: Jak potwierdzić, że za immobilizację było odpowiedzialne oddziaływanie kowalencyjne? Czy były wykonywane próby negatywne, tj. np. badania funkcjonalności biosensorów na bazie cysteaminy/MUAM bez EDC/NHS? A może jest tam np. znaczący udział adsorpcji – może regeneracja NaOH deprotonuje kationy amoniowe cysteaminy i dlatego konstrukcja się rozpada? Szkoda, że nie zostało to wyczerpująco wyjaśnione.
- D3: Jeżeli peptyd był syntezowany na zamówienie, czy z punktu widzenia prostoty wytwarzania sensora nie byłoby korzystniejsze wprowadzenie na C-końcu np. cysteiny zamiast dwuetapowego dowiązywania przez EDC/NHS?
- D4, Experimental. Z opisu wynika, że pomiar SPRi był wykonywany bezpośrednio w próbce osocza/odwirowanego płynu mózgowo-rdzeniowego, bez żadnego rozcieńczania albo buforowania (nie ma o tym informacji). Jak ma się to do doświadczenia „Influence of pH solution on interaction proces”, gdzie optymalizowano pH buforu na potrzeby krzywej kalibracji? Optymalne warunki: pH 7-8 (w zależności od receptora) zapewne są zbliżone do tego, czego możemy oczekiwać w próbkach, jednak podejście to budzi wątpliwości. Moim zdaniem różnica w składzie matrycy próbki rzeczywistej i próbek wykorzystanych do krzywej kalibracji może być znacząca. Co warte podkreślenia, już w artykule D5 (oznaczanie lamininy) próbka jest rozcieńczana 1000-krotnie buforem PBS zaś w artykule D6 (kolagenIV) - 10-krotnie, co rozwiązuje problem.

- D4, Results: Autorka testuje selektywność w roztworze 2 ng/mL analitu i 1000-krotnym nadmiarze albuminy (tj. 2 µg/mL). Stężenie albuminy w surowicy jest jednak wyższe, więc ekstrapolowanie selektywności biosensora na próbki rzeczywiste może być w tym przypadku dyskusyjne.
- D4: Jak Autorka skomentuje fakt, że sensor bazujący na bardzo prostym, małowcząsteczkowym receptorze (inhibitorze) okazał się konkurencyjny do tego z wykorzystaniem przeciwciała. Jak Doktorantka ocenia istotność wpływu odległości miejsca oddziaływania od powierzchni na parametry analityczne? Czy to może mieć
- D7: Uwagę zwracają istotne zmiany w metodyce przygotowania sensora w porównaniu, tj.: dodatkowe blokowanie powierzchni BSA, w ostatnim z cyklu sensorów dodany jest etap blokowania grup aminowych na powierzchni (EDC/NHS + octan). Co skłoniło Autorkę do wprowadzenia takich zmian?
- Na rysunku 1 w D7 jest nieścisłość – w opisie jest etap acylowania wolnych grup aminowych, na rysunku tego brakuje (pozostały niezmodyfikowane cysteaminy).

Należy podkreślić, że przedstawione powyżej uwagi mają głównie charakter polemiczny, ewentualnie mają na celu wyjaśnienie pewnych nieścisłości jakie pojawiły się w rozprawie. Co istotne, nie zmieniają one mojej jednoznacznie pozytywnej opinii na temat przedłożonej pracy doktorskiej.

Na zakończenie należy dodać, że całkowity dorobek mgr Anny Sankiewicz jest znacznie bogatszy i obejmuje współautorstwo aż 23 prac (w tym 22 w czasopismach z listy JCR), ale należy zauważyć, że prace te ukazywały się od roku 2003. Większość wspomnianych prac opublikowana została w znaczących czasopismach z zakresu bioanalitiky. Doktorantka była współautorem 12 prezentacji posterowych na konferencjach. Ponadto jest współautorką 3 zgłoszeń patentowych.

**Podsumowując** stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska zawiera szereg bardzo wartościowych wyników. Bez wątpienia, doktorantka wykazała się dobrym umiejętnościami i warsztatem badawczym na wysokim poziomie. Uzyskane wyniki przedstawione są w rzetelny sposób, a uzyskane na ich podstawie wnioski są w pełni uzasadnione.

Oceniając pozytywnie recenzowaną pracę stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Anny Sankiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,  
J. Malinowski