

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Anny Pachuty**  
**„Biosensor z układem mikrofluidycznym - badanie immobilizacji białek do podłoża**  
**polimerowych za pomocą metody spektroskopii impedancyjnej”**

Praca doktorska Pani mgr Anny Pachuty pt: „Biosensor z układem mikrofluidycznym - badanie immobilizacji białek do podłoża polimerowych za pomocą metody spektroskopii impedancyjnej” ma charakter interdyscyplinarny. Jej wykonanie wymagało biegłości w konstrukcji układów elektronicznych, a także w zakresie metodyki badawczej używanej w badaniach własności fizykochemicznych oraz znajomości fizyki materii miękkiej i materiałów biologicznych. Zdecydowanie uważam, że jest to praca na stopień doktora fizyki. Zadaniem Pani mgr Anny Pachuty podczas pracy doktorskiej było stworzenie urządzenia do wykrywania obecności białek w próbce oraz do rejestracji reakcji pomiędzy nimi. Białka, które są składnikami mięśni, skóry, kości, włosów, paznokci, etc, to złożone polimery organiczne bardzo ważne ze względu na wielorakie procesy, jakie zachodzą w komórkach organizmów żywych. Biorą udział w transmisji sygnałów, pełnią rolę katalizatorów, zapewniają odpowiedź immunologiczną i mobilność, kontrolują wzrost, a także transport i magazynowanie, np tlenu. Ważne, że podstawowe ich składniki - aminokwasy, mają budowę chiralną, a ich stan jonizacji zależy od pH rozpuszczalnika. Poprzez tworzenie złożonych układów, aktywne chemicznie białka odpowiadają za budowanie tkanki łącznej, replikację DNA i skomplikowane reakcje biochemiczne. Za działaniami tych makrocząsteczek stoi ich ogromna różnorodność, wynikająca z licznych grup funkcyjnych, takich jak alkoholowe, tiolowe, karboksamidowe, tioestrowe oraz kwasowe i zasadowe. Tematyka pracy doktorskiej mgr Anny Pachuty jest aktualna i wymagała dość wszechstronnego przygotowania doktorantki. Przedłożona do recenzji praca doktorska jest ciekawa. Powstała w Instytucie Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Zakładzie Inżynierii Nowych Materiałów, który dysponuje odpowiednimi narzędziami badawczymi. Promotorem pracy jest pan profesor Jakub Rysz, znany specjalista w dziedzinie wytwarzania i badania cienkich warstw organicznych stosowanych w elektronice.

Praca doktorska mgr Anny Pachuty składa się z ośmiu rozdziałów poprzedzonych Wstępem. Zwraca uwagę bardzo bogata „Bibliografia”, która zawiera 156 pozycji publikacyjnych i książkowych jakie pojawiły się w literaturze tematu od lat pięćdziesiątych ubiegłego stulecia. Pracę doktorską zamyka "Spis rysunków" obejmujący 78 szczegółowych podpisów pod rysunkami, które stanowią istotny element narracji w przedstawianiu przebiegu pracy i uzyskanych wyników. Dołączone jest również Streszczenie w języku polskim oraz angielskim. Udany jest podział pracy na rozdziały i pomysł, aby poszczególne rozdziały rozpoczynały się krótkim wprowadzeniem. Wstęp pokazuje, że celem pracy jest przygotowanie prototypu biosensora, który wykorzystując techniki pomiaru zmian impedancyjnych, byłby odpowiedni do szybkich badań nad adsorpcją białek i reakcjami pomiędzy nimi. Obszerny, bardzo ciekawy Rozdział pierwszy rozprawy doktorskiej jest poświęcony zagadnieniom dotyczącym budowy białek oraz struktury aminokwasów i ich wiązań. Przedstawiono szczegółowo własności podstawowego wiązania peptydowego. Zwrócono uwagę na fakt, że schemat budowy białek jest w organizmie zakodowany. Omówiona została rola jaką w

procesach zachodzących w komórkach organizmu pełnią białka proste i złożone, w których skład wchodzi substancje niebiałkowe. W ciekawy sposób zestawione zostały funkcje różnych rodzajów białek, które działają jako enzymy, hormony, immunoglobuliny oraz białka transportujące, receptorowe, motoryczne i budulcowe. Zwraca uwagę dobra znajomość chemii organicznej autorki.

Krótki Rozdział drugi przedstawia poglądowo opis i schemat rysunkowy tworzenia równomiernej nanometrycznej warstwy polimerowej metodą "spin coating" podczas obracanie zastosowanego podłoża z prędkością 10 obrotów na sekundę, co jest pierwszym etapem tworzenia układu badawczego.

Obszerny, 16-to stronicowy Rozdział 3 wart jest szerszego omówienia. Przedstawia on zagadnienia dotyczące złożonego zjawiska adsorpcji białek do podłoża, a także ich wiązania z innymi makromolekułami. Pokazano graficznie mechanizmy wiązania białka do podłoża poprzez: adsorpcję fizyczną (o różnej aktywności względem podłoża w zależności od orientacji białka), wiązania kowalencyjne oraz wiązania specyficzne typu van der Waalsa, wodorowe i jonowe pomiędzy białkami oraz między białkiem i ligandami. Każdemu typowi mechanizmu poświęcone jest szczegółowe wyjaśnienie. Podrozdział o adsorpcji fizycznej białek pokazuje dobrze jak bardzo złożony to proces, jak można modyfikować powierzchnie i ich hydrofobowość oraz hydrofilność, aby zwiększyć stabilność procesu adsorpcji oraz wydajność immobilizacji białek. Omawia też szczegółowo czynniki wpływające na adsorpcję białek, a także fizyczne podstawy jakie rządzą tym procesem oraz techniki wykorzystywane do charakterystyki powierzchni. Autorka rozważa wpływ na proces adsorpcji takich czynników jak wartość pH, siła jonowa, temperatura oraz rodzaj i stężenie użytego roztworu, a także wielkość oraz budowa białek i ich stabilność oraz hydrofobowość/hydrofilność i polarność. Zwraca uwagę na zmiany w procesie adsorpcji wywołane upływem czasu i konieczność uwzględniania takich procesów jak dyfuzja czy oddziaływania elektrostatyczne. Opisuje, też znaczenie dobrego wyboru własności powierzchni podłoża (np. chropowatych, po pasywowaniu czy silinizacji), aby podczas adsorpcji białka nie dochodziło do negatywnych procesów, które wykluczają materiał ze względów np. medycznych. Autorka ma świadomość jak wiele czynników należy uwzględnić, aby zapewnić przedsięwzięciu sukces. W podrozdziale o wiązaniu kowalencyjnym pokazano grupy funkcyjne białka, które wiążąc się z grupami funkcyjnymi podłoża tworzą dobrze pokrytą powierzchnię, zapewniają uporządkowane unieruchomienie białek i to, że można oczekiwać ich trwałej konformacji. W Tabeli 3 zestawiono przykłady par grup funkcyjnych białka (aminowej, tiolowej, karboksylowej) oraz najczęściej stosowanych grup funkcyjnych podłoża, których łączenie prowadzi do powstania trwałych kompleksów (za pracą z *Biomacromolecules* z roku 2007). Z kolei Rysunek 10 pokazuje przykład schematu reakcji łączenia reagentu maleimidowego z podłoża z grupą tiolową białka. Przedstawiono też korzyści jakie płyną dla procesu immobilizacji ze stosowania na podłożu nośników epoksydowych, a także z ich dodatkowej modyfikacji grupami, które promują wiązanie fizyczne. Szczególnie złożone są omawiane szczegółowo połączenia ligandów i białek między sobą. Autorka ma dobrą świadomość tego jakie są zalety oraz wady i ograniczenia poszczególnych mechanizmów immobilizacji. Do zalet zalicza trwałość unieruchomienia białek oraz możliwość kontrolowania orientacji i gęstości wiązań na powierzchni. Trzeba docenić studia literaturowe jakie dla zgromadzenia wiedzy przeprowadziła. Końcowy podrozdział dotyczy wykorzystania informacji o wiązaniach białek do podłoża dla skonstruowania bioczuJNIKA, którego schemat jest pokazany na Rysunku 17. Rozdział trzeci bardzo dobrze przygotowuje czytelnika do głównego zadania pracy.

Kolejny Rozdział 4 zawiera opis trzech metod badawczych, których użyto do analizy odpowiedzi tworzonych układów na zachodzące reakcje wiązania białka z podłożem.

W Rozdziale 5-tym przedstawiono informacje o pięciu białkach wykorzystywanych do badań. Ze względu na istotne funkcje w organizmie wybrano albuminę wołową (BSA), immunoglobulinę G (IgG), streptawidynę, biotynę (czyli witaminę H nazywaną też B7) oraz białko C-kreatywnie (CRP). Dla opracowania wydajnych i precyzyjnych biosensorów konieczna jest znajomość własności fizykochemicznych tych materiałów. Podane zostały podstawowe parametry fizyczne takie jak masa cząsteczkowa (dla 5-ciu wybranych białek to od 0.244 kDa do 156 kDa), wymiary makrocząsteczki, a także informacje o jej budowie i kształcie oraz nazwa firmy produkującej biomateriał. Wymieniono podstawowe własności i zastosowania poszczególnych białek. Wspomniano też, że np. biotynylacja (w pracy używano określenia bBSA) nie wpływa na konformację i własności białka. Jest to krótki, treściwy i ważny rozdział pracy.

Rozdział 6·nosi tytuł "Wstęp do bioczuJNIKÓW". Są to proste urządzenia elektryczne, mechaniczne czy optyczne wykorzystywane w różnych dziedzinach nauki oraz w przemyśle, i medycynie do wykrywania reakcji chemicznych oraz do identyfikacji np bakterii, a także jako markery zaburzeń zdrowotnych. Nowoczesne bioczuJNIKI charakteryzują się szybkością, ważna jest ich miniaturyzacja, wysoka czułość i selektywność w analizie odpowiedzi układu. We wstępie do rozdziału pokazano typowe elementy, z których zbudowany jest bioczuJNIK - warstwa biomolekuł wykrywająca cząsteczki badanej substancji oraz przetwornik, dający mierzalny sygnał wyjściowy do podłączonej aparatury. Wieloczęściowy podrozdział przedstawia różne rodzaje bioczuJNIKÓW. Zwrócono uwagę na korzyści płynące z używania bioczuJNIKÓW ze znacznikami fluorescencyjnymi w postaci kropek kwantowych czy mikrocząsteczek organicznych. Opisano, w oparciu o dane literaturowe, różne techniki rejestracji zjawiska fluorescencji. Szczegółowo przedstawiono możliwości innego znakowania np. izotopowego czy nanocząsteczkami, a także używania bioczuJNIKÓW nieznakowanych, np. optycznych. Są to informacje bardzo potrzebne do dalszych etapów pracy doktorskiej, które świadczą o dogłębnym zaznajomieniu się z tematem - tych zagadnień dotyczą referencje od [106] do [129]. Rozdział 6 zakończony jest krótkim omówieniem parametrów technicznych bioczuJNIKÓW opracowanych, aby m.in. umożliwić porównywania wydajności różnych rodzajów takich urządzeń.

"Część eksperymentalna" stanowi blisko połowę rozprawy doktorskiej. Rozpoczyna się od przedstawienia celu pracy oraz nakreślenia przebiegu siedmiu etapów badań zmierzających do jego realizacji. Jest to udane wprowadzenie do przedstawienia wyników przeprowadzonych badań - chyba niepotrzebnie jest zatytułowane "Cel pracy" i opatrzone numerem 7, który powinien dotyczyć całej części eksperymentalnej. Już dalej następują logicznie podrozdziały od 7.1 do 7.4, które dotyczą odpowiednio badań wstępnych, wyników pomiarów w układzie mikrofluidycznym typu II, badań adsorpcji białek metodą TOF-SIMS oraz wyników uzyskanych dla prototypu biosensora. Jest to bardzo wartościowa część pracy doktorskiej. Rozdział 8 przedstawia krótkie podsumowanie wyników pracy i końcowe wnioski.

Z obowiązku recenzenta podzielę się kilkoma uwagami oraz wątpliwościami jakie się pojawiły podczas lektury pracy doktorskiej:

1/ Bez wyjaśnienia podano przykład wiązania białko-białko "np. CRP-aCRP" (str. 19) oraz słowo "analit" i "bufor" (str. 21), brak w tekście gwiazdki, dla której jest objaśnienie (str. 27). Nie wyjaśniono co oznacza Fab, Fc na Rys. 8 ani kształt Y na Rys. 9 - powinno być podane, że informacje wyjaśniające są na str. 45, a szczegółowy schemat struktury na Rys. 25. Nie wyjaśniony jest skrót EIS na stronie 38.

2/ Pewne napisy na rysunkach są zbyt małe do swobodnego oglądu. Część skrótów na rysunkach nie jest objaśniona (np. CDR, SS, N na Rys. .25).

3/ Zamiast słowa "system" powinno być układ np. biotyny i streptawidyny (str. 47). Skrót na określenie punktu izoelektrycznego nie został ustalony; raz to pI innym razem PI. Rozmiary makrocząsteczek podawane są zarówno w Å jak i w nanometrach.

4/ Niestety są w pracy zdania ogólnikowe, mało zrozumiałe jak np. "...ważnym jest aby dobór podłoża i samych białek był kompatybilny" (str. 8). Niejasne jest zdanie nad rysunkiem 21. Zdanie (na str. 50) "Wykorzystanie reaktywnych znaczników fluorescencyjnych zapewnia zdolność wykrywania białek, które samoistnie jej nie posiadają (np. przeciwciała)." jest trudne w zrozumieniu podobnie jak fraza "Rysunek 34 obrazuje ...czujnik: sygnał wyjściowy (S), który jest generowany przy danych wejściu lub wielkości mierzone." (str. 59). Są też niezręczne sformułowania jak np. "Granica wykrywalności jest najmniejszym stężeniem wielkości badanej molekuly, która można wykryć." ( str. 59).

5/ Są też niepotrzebne powtórzenia (np. o sposobach immobilizacji białek). Na stronie 28 pojawiła się omyłkowa numeracja podrozdziałów. Skrótami myślowymi są frazy takie jak np. "ilość prądu" (str. 55). Zamiast słowa rezystor lepiej używać opornik. Na stronie 65 podano omyłkowo, że "powierzchnia elektrod wynosiła zaledwie 2-3 m<sup>2</sup>." Na stronie 85 (zdanie nad Rys.56) omyłkowo podano amplitudę pola mierzącego jako 10 mV zamiast 100 mV. W podpisie rysunków 62 i 63 brak informacji o białkach, które pokrywają elektrodę II, a na rysunku 64 są powtórzenia (brak informacji o elektrodzie II). Przetwornik oznaczony jest raz jako DAC a innym razem jako ADC (str. 97 i 98). W pomiarach z użyciem biosensora, elektroda z próbką badaną jest oznaczona numerem II a w testach wcześniejszych numerem I.

Jednak chcę podkreślić, że praca napisana jest jasno i starannie, poprawnym językiem potocznie naukowym.

Praca doktorska mgr Anny Pachuty spełnia postawiony cel zbudowania prototypu biosensora dla wykrywania reakcji białko-białko w oparciu o detekcję odpowiedzi impedancyjnej, poprzez pomiary najpierw w warunkach suchych a potem dla dwóch układów mikrofluidycznych. Istotne jest bardzo przejrzyste wyszczególnienie poszczególnych kroków przebiegu badań z podaniem wartości istotnych parametrów pomiarowych, a także właściwy wybór odpowiedniego podłoża (szklane z elektrodami ITO firmy Ossila S161) oraz polistyrenu jako polimeru, co zapewniało dobrą adsorpcję białka, a przede wszystkim stabilną i powtarzalną odpowiedź impedancyjną. Rejestracja ewolucji zmian maksimum tangensa kąta przesunięcia fazowego umożliwiła przede wszystkim stwierdzenie czy zachodzi adsorpcja białka i reakcja immunologiczna. Pozwalała także na podjęcie decyzji o eliminacji innych polimerów czy ustalenie jaka amplituda pola mierzącego jest odpowiednia dla prowadzonych badań. Po zdobyciu tej wiedzy, dalszym krokiem w kierunku zbudowania prototypu biosensora była konstrukcja układu mikrofluidycznego II z dwoma elektrodami podłączanymi do dwóch spektrometrów, gdzie różnica wyników dla elektrody testującej i referencyjnej stanowiła ewidencję reakcji specyficznej białko-białko. Potwierdzenie immunoreakcji uzyskiwano dzięki zastosowaniu spektroskopii fluorescencyjnej ze znacznikiem typu TRICT, zaś reakcji białko-białko metodą TOF-SIMS. Istotnym walorem pracy doktorskiej Pani mgr Anny Pachuty jest doprowadzenie badań do konstrukcji użytecznego biosensora do analizy procesów adsorpcji białka w oparciu o detekcję różnicy sygnałów od elektrody badanej i referencyjnej, bazującego na układzie scalonym AD8302 oraz układzie mikroprocesorowym STM32F2, z użyciem programu komputerowego. Zbudowane urządzenie, którego zdjęcie znajduje się na stronie 98 jest łatwe w użyciu, a zastosowane podłoża nadają się do ponownego wykorzystania. Ważne, że autorka ma świadomość tego jakie zjawiska mogą utrudniać detekcję procesów białko-białko. Na docenienie zasługują szeroko zakrojone studia literaturowe (referencje do blisko 160 pozycji literaturowych), obszerna jasno napisana praca doktorska (126-cio stronicowa) oraz wysoki poziom warsztatu badawczego. Pomiary prowadzone były w oparciu o przejrzysty protokół badawczy, z dobrze wybranymi parametrami dotyczącymi

stężenia używanych roztworów, amplitudy pola mierzącego i częstotliwości sygnału próbującego od 1 kHz do 50 kHz. Uzyskane wyniki były weryfikowane dwoma dodatkowymi metodami, a każdy etap badań podsumowywany wnioskami.

Chciałam dodać, że Pani mgr Anna Pachuta jest współautorką czterech publikacji, które powstały w latach 2017-2020 i zostały zamieszczone w Phase Transitions, Liquid Crystals, Applied Materials Today oraz Analytical and Bioanalytical Chemistry. Problematyki bliskiej tematowi doktoratu dotyczą dwie z tych prac zatytułowane "Extraordinary conduction increase in model conjugated/insulating polymer system induced by surface located electric dipoles" oraz "Using a lactadherin-immobilized silicon surface for capturing and monitoring plasma microvesicles as a foundation for diagnostic device development". Autorka miała udane prezentacje na konferencji Kryształy molekularne i na Seminarium Krakowsko-Katowickim. Publikacja, która stanowi podsumowanie doktoratu jest w końcowej fazie przygotowań.

Zgodnie z powyższym, wyrażam bardzo pozytywną opinię o poziomie naukowym mgr Anny Pachuty i jej pracy doktorskiej „Biosensor z układem mikrofluidycznym - badanie immobilizacji białek do podłoża polimerowych za pomocą metody spektroskopii impedancyjnej”, przesłanej mi do recenzji przez Radę Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w lipcu 2023 r. Spełnione są kryteria stawiane kandydatom na stopień doktora nauk fizycznych w odnośnej Ustawie (Dz. U. z 2016 r. poz 882). Wnoszę o dopuszczenie mgr Anny Pachuty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*M. Massalska - Arodz*

Prof. dr hab. Maria Massalska-Arodz