

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Pachuty

pt. „Biosensor z układem mikrofluidycznym – badanie immobilizacji białek do podłoża polimerowych za pomocą metody spektroskopii impedancyjnej”

Przedłożona Radzie Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie przez mgr Annę Pachutę rozprawa doktorska pt. „Biosensor z układem mikrofluidycznym – badanie immobilizacji białek do podłoża polimerowych za pomocą metody spektroskopii impedancyjnej” została przygotowana pod opieką naukową promotora prof. dr. hab. Jakuba Rysza. Mgr Anna Pachuta złożyła oświadczenie, że rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dz.U. 1994, nr 24, poz. 83 z późn. zm.). Zgodnie z umową na wykonanie recenzji recenzent powinien przedstawić szczegółowo uzasadnioną ocenę kandydatki oraz jednoznaczne stwierdzenie, czy spełnia ona kryteria stawiane kandydatom w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882). Zgodnie z art. 13 tej ustawy „rozprawa doktorska powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego lub oryginalne rozwiązanie problemu w oparciu o opracowanie projektowe, konstrukcyjne, technologiczne oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej...” „...lub artystycznej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej”. „Rozprawa doktorska może mieć formę maszynopisu książki, książki wydanej lub spójnego tematycznie zbioru rozdziałów w książkach wydanych, spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopiśmie naukowych, określonych przez ministra właściwego do spraw nauki na podstawie przepisów dotyczących finansowania nauki”, jeżeli odpowiada wymienionym warunkom.

Rozprawa doktorska mgr Anny Pachuty ma formę maszynopisu książki liczącej łącznie 126 stron tekstu. W rozprawie zamieszczono oświadczenie o oryginalności pracy i samodzielnym jej zredagowaniu przez mgr Pachutę zgodnie z wymienioną ustawą o prawie autorskim. Ponadto rozprawa zawiera streszczenie w języku polskim wraz z tłumaczeniem na język angielski, a także obszerną bibliografię stanowiącą wykaz 156 pozycji literatury naukowej związanej z tematyką rozprawy. Dodatkowo na ostatnich czterech stronach pracy zamieszczono spis rysunków, który, w subiektywnym odczuciu recenzenta, nie wnosi do niej dodatkowej wartości. W streszczeniu znajduje się ważne stwierdzenie dotyczące celu pracy doktorskiej, którym było „stworzenie taniego i prostego nieoznakowanego biosensora, który będzie działał w czasie rzeczywistym i będzie wykorzystywał pomiary impedancji do badania procesu adsorpcji białek i reakcji wiązania specyficznego między nimi”. Autorka rozprawy podkreśliła, że podczas pracy nad projektem biosensora opracowana została metoda wykrywania i identyfikacji różnych białek na podstawie ich właściwości impedancyjnych. Z recenzenckiego obowiązku muszę w tym miejscu zwrócić uwagę, że w streszczeniu, jak również w zasadniczej części rozprawy, nie zamieszczono informacji, w jakiej jednostce badawczej zostały zrealizowane prace związane z projektem i wykonaniem biosensorów, w tym ich części elektronicznej, a także eksperymenty z warstwami białkowymi, które miały na celu praktyczną weryfikację możliwości detekcyjnych opracowanych

urządzeń. Informacja o nazwie jednostki badawczej, w której została zrealizowana praca doktorska powinna znaleźć się w rozprawie. Drugą kwestią, z którą wiąże się poczucie pewnego niedosytu informacyjnego, jest brak jednoznacznego stwierdzenia w rozprawie, czy wyniki naukowe w niej przedstawione zostały opublikowane w czasopismach naukowych lub czy stanowią podstawę zgłoszonych albo zarejestrowanych rozwiązań patentowych. W związku z tym należy przyjąć, że wyniki badań zostały opublikowane wyłącznie w rozprawie doktorskiej. W przeciwnym przypadku w pracy koniecznie powinno znaleźć się odpowiednie wyjaśnienie z ewentualnym wskazaniem wykorzystania wyników uzyskanych przez doktorantkę w innych publikacjach.

Rozprawa doktorska została podzielona dwie zasadnicze części: część wstępną, w której omówiono podstawowe zagadnienia związane z tematem pracy oraz część eksperymentalną zawierającą wyniki przeprowadzonych eksperymentów wraz z ich podsumowaniem i wnioskami. Część wstępna liczy 54 strony, natomiast część eksperymentalna – 50 stron. Motywacją do realizacji pracy doktorskiej był rozwój technologii mikroczipów cieczowych wykorzystujących materiały polimerowe, umożliwiających rejestrację zespolonej impedancji roztworów w szerokim zakresie częstotliwości. Inspirujące znaczenie miały dla autorki rozprawy prace Kechadiego i współpracowników zrealizowane w połowie pierwszego dziesięciolecia aktualnego stulecia, w których została przedstawiona metoda badania impedancji roztworów, wykorzystująca tę technologię. W tym miejscu pozwolę sobie na uwagę dotyczącą Rysunku 1 zamieszczonego we wstępie. Rysunek ten został skopiowany bez zmian z cytowanego w rozprawie artykułu Kechadiego w *Electrochimica Acta* z 2013 roku (pozycja [1]), jednak w podpisie pod rysunkiem brakuje informacji, czy autorka uzyskała zgodę właściciela praw autorskich tej publikacji (Elsevier) na umieszczenie tego rysunku w swojej rozprawie doktorskiej. Brak takiej zgody może stanowić naruszenie praw autorskich.

Część wstępna stanowi w odczuciu recenzenta wartościowy element rozprawy, ponieważ zawiera zasadniczo kompletne omówienie podstawowych zagadnień z różnych dyscyplin naukowych, które wiążą się bezpośrednio z tematem pracy doktorskiej. Wystarczająco obszernie przedstawiono tu zagadnienia dotyczące biochemii białek, w szczególności strukturę białek i właściwości aminokwasów stanowiących ich podstawowy budulec, a także podział białek ze względu na ich złożoność i funkcje pełnione w organizmach żywych. Następnie omówiono powszechnie stosowaną do wytwarzania cienkich warstw polimerowych na powierzchniach stałych metodę nawirowywania. Tak wytworzone warstwy polimerowe stanowią podłoża w procesie adsorpcji białek. Następnie, konsekwentnie, omówiono różne sposoby immobilizacji białek na tych podłożach, w szczególności fizyczną adsorpcję, immobilizację przez wiązania kowalencyjne tworzone przez grupy aminową, tiolową, karboksylową, epoksydową, a także wiązania specyficzne: białko-biotyna (witamina H), białko-ligand, białko-białko. W dalszej części szczegółowo omówiono różne czynniki mające wpływ na adsorpcję białek, takie jak środowisko zewnętrzne, właściwości samych białek, właściwości powierzchni, na których osadzane są białka. Poruszono również termodynamiczne i elektrostatyczne aspekty związane z adsorpcją. W tym miejscu należy zwrócić uwagę na niepoprawną interpretację symbolu „ Δ_{ads} ” w legendzie do wzoru (1) na str. 27 (symbol ten ma sens jedynie w połączeniu z określonym parametrem termodynamicznym i nie może być traktowany osobno). Dalej wspomniano również o procesie desorpcji białek, który często występuje w trakcie osadzania kolejnych warstw białkowych na podłożach, a także przedstawiono ogólny schemat elektryczny bioczuJNIKA wykorzystującego podłoża szklane z elektrodami ITO (Ossila) z naniesioną warstwą polimerową i zaadsorbowanymi na niej białkami (przeciwciałami) i białkami w roztworze (antygenami). Biorąc pod uwagę, że napięcie zasilania jest napięciem zmiennym, w schemacie (Rys. 17) występuje niekonsekwencja polegająca na oznaczeniu elektrod symbolami „+” i „-”.

W następnym rozdziale części wstępnej omówiono wykorzystywane w pracy metody badawcze, a w szczególności metodę spektroskopii impedancyjnej, na której opiera się działanie bioczuwnika. Metoda ta została zasadniczo przedstawiona w sposób zrozumiały dla szerokiego grona odbiorców (nie tylko fizyków), jednak sam opis wymaga kilku sprostowań. Na stronie 35 autorka rozprawy napisała, że metoda spektroskopii impedancyjnej „polega na zmierzeniu impedancji elektrody w obecności badanego białka na jej powierzchni”. Należy zauważyć, że termin „elektroda” w ogólnym rozumieniu może być w tym przypadku stosowany do każdego z osobna układu ścieżek ITO na podłożu, przyłączonych do osobnych biegunów źródła napięcia. Z tego powodu należałoby precyzyjniej stwierdzić, że pomiar impedancji dotyczy całego układu, w skład którego wchodzi podłoże z elektrodami ITO oraz warstwa polimerowa z zaadsorbowanym na jej powierzchni białkiem i ewentualnie dodatkowa warstwa białka w roztworze. W takim układzie impedancja elektrod ITO ma drugorzędne znaczenie. W tym kontekście korekty wymaga zdanie „W odpowiedzi na ten sygnał elektrody generowane są prądy, które prowadzą do zmiany napięcia na elektrodzie.” (Czy w układzie mierzone są zmiany napięcia, czy zmiany prądu?). Ponadto, we wzorze (2) (str. 36) amplitudę sygnału napięciowego oznaczono jako E_0 , podczas gdy w legendzie do wzoru występuje U_0 , a wzór (4) jest błędny. Z kolei w pierwszym akapicie na str. 37 napisano „Jeśli zastosujemy zmiennoprądowy sygnał...” (w rzeczywistości do próbki jest przykładany sygnał zmiennonapięciowy). W tym akapicie napisano również o porównywaniu ze sobą wejściowego sygnału napięciowego i wyjściowego sygnału prądowego. Takie bezpośrednie porównywanie ze sobą dwóch różnych parametrów elektrycznych nie ma sensu. Ponadto na wykresie poglądowym (Rys. 18) oś rzędnych opisana jest błędnie jako oś napięcia, podczas gdy w podpisie pod rysunkiem wyraźnie napisano, że jest to wykres prąd/napięcie. W dalszej części opisu metody impedancyjnej przedstawiono jej wersję opierającą się na przedstawieniu parametrów elektrycznych w postaci zespolonej. Takie podejście zastosowano w eksperymentach do wyznaczania części rzeczywistej i zespolonej impedancji oraz przesunięcia fazowego między przyłożonym napięciem a impedancją dla wszystkich testowanych próbek. Tu należy zwrócić uwagę na błąd we wzorze (7) (nawias w niewłaściwym miejscu). W pracy korzystano również z metod spektrometrii mas jonów wtórnych i mikroskopii polaryzacyjnej, które stanowiły uzupełnienie dla metody spektroskopii impedancyjnej.

W kolejnym rozdziale części wstępnej scharakteryzowano, wykorzystane w pracy do testowania bioczuwników białka: albuminę surowicy bydlęcej (BSA), immunoglobulinę G, streptawidynę, biotynyłowane BSA, białko C-reaktywne (CRP). Istotny z punktu widzenia pracy doktorskiej jest rozdział, który dotyczy aktualnej wiedzy na temat bioczuwników. Typowy bioczuwnik (elektryczny, optyczny, mechaniczny) zawiera komponent biorozpoznawczy składający się np. z warstw biocząsteczek – enzymów, przeciwciał lub DNA oraz przetwornik (transduktor), którego parametry fizyczne, np. impedancja elektryczna, ulegają zmianie w kontakcie z biomolekułami. W rozprawie omówiono kilka typów bioczuwników: bioczuwnik oparty na zasadzie działania tranzystora polowego, bioczuwniki wykorzystujące powierzchniowy rezonans plazmonowy i bioczuwnik mechaniczny (beleczkowy). W tym miejscu należy zwrócić uwagę na błąd w schemacie połączeń elektrycznych bioczuwnika bio-FET na Rysunku 31. Bioczuwniki mogą być wykorzystywane do detekcji nie tylko biomolekuł w naturalnej postaci, ale również znakowanych fluorescencyjnie lub izotopowo. Można w nich także wykorzystywać nanocząstki, np. nanocząstki złota, które pozwalają wzmocnić sygnał rozpraszania ramanowskiego. Istnieje również możliwość zastosowania bioczuwników w standardowym teście ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Zakończeniem części wstępnej jest rozdział dotyczący parametrów służących do charakteryzacji bioczuwników, takich jak wartość sygnału, poziom szumów, stosunek sygnału do szumu (SNR), zakres liniowej odpowiedzi czujnika, czas i szybkość odpowiedzi, selektywność, granica wykrywalności (LOD). Szkoda, że dla skonstruowanych w ramach pracy doktorskiej bioczuwników te parametry nie były wyznaczane.

W części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej zostały przedstawione kolejne etapy badań, których celem było zaprojektowanie i wykonanie bioczuJNIKA pozwalającego na wykrywanie i identyfikację różnych białek w czasie rzeczywistym. W ramach tych badań zaplanowano sprawdzenie przydatności różnych podłoży stałych z elektrodami do budowy bioczuJNIKA, przeanalizowanie warstw z różnych polimerów, izolujących elektrody od warstw białkowych, analizę adsorpcji białek na warstwie polimerowej pokrywającej elektrody dla próbek suchych. Zaplanowano także skonstruowanie specjalnego układu mikrofluidycznego umożliwiającego badanie interakcji roztworu określonego białka z powierzchnią polimerową oraz układu mikrofluidycznego umożliwiającego równoczesną analizę porównawczą dwóch różnych roztworów białek lub roztworu i rozpuszczalnika. Zaplanowano również zbudowanie układu elektronicznego opartego na układzie AD8302 umożliwiającego wyznaczanie w czasie rzeczywistym różnicy faz sygnałów elektrycznych z dwóch różnych próbek.

Zbadano dwa typy komercyjnych podłoży stałych (Ossila) pod kątem ich przydatności do budowy bioczuJNIKA: podłoże krzemowe Si/SiO₂ z elektrodami złotymi i podłoże szklane z elektrodami ITO. Podłoża krzemowe pokrywano warstwą z polimetakrylanu metylu (PMMA) lub poli(N-izopropylomakrylamidu) (PNIPAm). W celu połączenia elektrod na podłożach ze spektrometrem impedancyjnym (Agilent4294A) skonstruowano odpowiedni adapter (autorka pracy nie wyjaśniła, czy wykonała adapter samodzielnie). W przypadku PMMA widma impedancyjne nie były powtarzalne, natomiast dla warstw PNIPAm konieczne było zastosowanie procedury sieciowania, co wydłużało czas testu. Z tego powodu w dalszych badaniach zrezygnowano z podłoży krzemowych ze złotymi elektrodami. Przykładowe wyniki dla tego przypadku przedstawiono na Rysunku 38. Z podpisu pod rysunkiem trudno się zorientować, jakich próbek dotyczą poszczególne wykresy. Ponadto opisy na osiach wykresów są nieczytelne, a na osiach rzędnych nie określono jednostki fizycznej (Ω ?). Niestety, uwaga ta dotyczy większości wykresów zamieszczonych w rozprawie. Ze względu na zadowalające wyniki dotyczące powtarzalności w pomiarach impedancji z naniesionym białkiem BSA, do dalszych testów wytypowano podłoża szklane z elektrodami ITO pokryte warstwą polistyrenu (PS). W celu zbadania adsorpcji białka BSA z roztworu w PBS na domieszkowanych bromem warstwach PS i poli(N-butylo-metakrylamidowej) (PnBMA) wykonano prototyp przystawki (układ mikrofluidyczny typu I) umożliwiającej pomiar impedancji w trakcie osadzania białka na podłożu z wprowadzonego do przystawki buforu PBS, a następnie roztworu BSA w PBS. W rozprawie przedstawiono jedynie zdjęcie poglądowe przystawki (Rys. 41), a z podanych informacji nie wynika, że została ona wykonana przez autorkę rozprawy. W przypadku czystego podłoża PS zaobserwowano wyraźny efekt zmiany charakterystyki czasowej przesunięcia fazowego sygnału po wymianie buforu na roztwór, natomiast w przypadku podłoży PS domieszkowanych bromem efekt ten był niejednoznaczny. Z tego powodu w dalszych badaniach zrezygnowano z podłoży PS domieszkowanych bromem. Podobnie, ze względu na brak powtarzalności wyników dla próbek z podłożami PnBMA, w dalszych testach nie stosowano tych podłoży.

Kolejny eksperyment dotyczył immunoreakcji białka aIgG (przeciwciała) rozpuszczonego w PBS z białkiem IgG (immunoglobuliną) zaadsorbowaną na podłożu PS. Otrzymane wyniki związane z immunoreakcją były powtarzalne, a charakterystyka czasowa przesunięcia fazowego mierzonego sygnału elektrycznego wykazywała wyraźną zmianę po przejściu od procesu osadzania białka IgG na podłożu PS do procesu wprowadzania do przystawki roztworu białka aIgG. Występowanie immunoreakcji zostało dodatkowo potwierdzone metodą mikroskopii fluorescencyjnej. W pracy zbadano również wpływ amplitudy napięcia przykładanego do elektrod na widmo impedancyjne i przesunięcie fazowe dla układów biotyna ze streptawidyną, biotynyłowane BSA (bBSA) ze streptawidyną oraz IgG z aIgG. Do elektrod przykładano napięcia o dwóch wybranych w oparciu o dane literaturowe amplitudach: 100 mV i 10 mV. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że dla wymienionych układów efekt zmiany

charakterystyk czasowych przy przechodzeniu od procesu osadzania białek na podłożu do immunoreakcji jest obserwowalny niezależnie od amplitudy przyłożonego napięcia.

Drugą serię badań przeprowadzono z wykorzystaniem zmodyfikowanej przystawki (układ mikrofluidyczny typu II), który umożliwiał pomiar impedancji przesunięcia fazowego metodą porównawczą, jednocześnie dla dwóch próbek. W tej serii pomiarowej zbadano immunoreakcję dla dwóch par białek: IgG z aIgG i CRP z aCRP. Odnośnikiem było białko blokujące BSA. W eksperymencie wykorzystano białko aIgG blokowane fluorescencyjnie (TRICT) w celu weryfikacji badań impedancyjnych za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. W obu przypadkach stwierdzono występowanie immunoreakcji, jednak tylko w przypadku pary CRP z aCRP reakcja ta została potwierdzona metodą impedancyjną. W tym miejscu należy zwrócić uwagę na błędy w opisach obrazów mikroskopowych na Rysunku 64.

W oparciu o wiedzę uzyskaną w trakcie badania impedancji próbek za pomocą przystawek typu I i II zaprojektowano i zbudowano prototyp biosensora umożliwiający analizę porównawczą zmiany fazy impedancji dla próbki i odnośnika w trakcie procesu adsorpcji biomolekuł. Bioczułnik wykorzystuje układ scalony AD8302 porównujący sygnały elektryczne z próbki i odnośnika oraz układ mikroprocesorowy STM32F odpowiedzialny za generację wejściowego sygnału napięciowego i rejestrację wyjściowego sygnału porównawczego. W rozprawie przedstawiono jedynie zdjęcie poglądowe i schemat blokowy tego prototypu, co może być dyskusyjne, jeśli projekt i wykonanie miałyby być uznane jako część pracy doktorskiej. Podobnie jak w przypadku układów typu I i II, brakuje tu szczegółowego opisu wykonania prototypu oraz, ewentualnie, szerszej informacji o udziale w budowie przystawki osób trzecich. Autorka wspomina jedynie, że program sterujący został stworzony w grupie (nie zostało określone w jakiej). Nową przystawkę, podobnie jak układ typu II, zastosowano do zbadania immunoreakcji IgG z aIgG CRP z aCRP, przy czym białka antygenowe były nieznakowane lub znakowane fluorescencyjnie (FITC, TRICT, ALEXA FLUOR 488). Odnośnikiem było białko BSA. Pomiar różnicy przesunięcia fazowego próbki i odnośnika wykonano dla czterech wybranych częstotliwości napięcia wejściowego (1 kHz, 5 kHz, 10 kHz, 50 kHz). Potwierdzenie zachodzenia immunoreakcji uzyskano metodą mikroskopii fluorescencyjnej. Metoda impedancyjna okazała się skuteczna w wykrywaniu immunoreakcji IgG z aIgG tylko w przypadku nieznakowanego fluorescencyjnie aIgG i tylko dla częstotliwości sygnału napięciowego równej 1 kHz, co nie daje powodu do optymizmu. Podobny wynik uzyskano dla CRP z aCRP, jednak tutaj efekt fazowy wynikający z immunoreakcji był obserwowany także dla aCRP znakowanego fluorescencyjnie zarówno w przypadku gdy warstwą adsorbowaną do podłoża PS było CRP, jak również aCRP. Z Rysunku 71 wynika, że efekt fazowy jest wyraźny, jednak autorka nie wyjaśniła, czy prezentowana przykładowa zależność różnicy fazy od czasu jest reprezentatywna dla serii pomiarów, czy jest to wynik, który najlepiej spełnia oczekiwania. Ostatni omawiany w rozprawie eksperyment został przeprowadzony z wykorzystaniem prototypowej przystawki. W tym przypadku na podłożu PS pierwszej z próbek zaadsorbowano bBSA a drugiej – BSA, a następnie wprowadzano kolejno bufor PBS, roztwór BSA w PBS i roztwór streptawidyny w PBS. Wyraźny efekt zmiany różnicy fazowej zaobserwowano dla częstotliwości równej 50 kHz. Zauważono przy tym, porównując ze sobą widma impedancyjne obu próbek przed wprowadzeniem streptawidyny i po jej wprowadzeniu, że oba te widma ulegają wyraźnej zmianie. Może to wskazywać na występowanie procesów desorpcyjnych na powierzchni próbki, co utrudnia interpretację wyników.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy, zgodnie z jej tytułem, badania immobilizacji białek do podłoża polimerowych za pomocą metody spektroskopii impedancyjnej. Autorka przedstawiła w niej wyniki testów wielu układów białek typu antygen-przeciwciało osadzonych na różnych podłożach polimerowych, w tym przede wszystkim na podłożu

polistyrenowym. Dla niektórych z tych układów metoda impedancyjna pozwala stwierdzić występowanie immunoreakcji. Jednak w wielu przypadkach przez pomiar impedancji próbek nie można wykryć tego procesu, mimo iż inne metody potwierdzają jego występowanie. Wyniki eksperymentów prezentują dużą wartość w kontekście prac nad skonstruowaniem w pełni funkcjonalnego bioczuownika wykorzystującego efekt zmiany impedancji próbki w wyniku zajścia immunoreakcji. Pewien niedosyt w kontekście przedstawionego przez autorkę celu pracy budzi bardzo skromna informacja dotycząca sposobu wykonania oraz szczegółów technicznych przystawek typu I i II oraz prototypowego biosensora. Pozytywnie należy ocenić część wstępną rozprawy, w którym trafnie przedstawiono wiele podstawowych zagadnień ściśle związanych z bioczuownikami, a także obszerną listę odnośników literaturowych. Zauważone w rozprawie błędy i niejasności zostały wymienione w poprzednich akapitach recenzji i mam nadzieję, że autorka będzie miała możliwość odnieść się do nich w przyszłości.

W konkluzji stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Anny Pachuty stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego immobilizacji białek na podłożach polimerowych i jednocześnie przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu detekcji immunoreakcji w oparciu o opracowanie projektowe, a tym samym spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

