

Recenzja  
pracy doktorskiej mgr Edyty Mięka  
pt. „Elektrochemiczne bioczułniki do oznaczania potencjalnych markerów choroby  
Alzheimera”.

Praca doktorska pt. „Elektrochemiczne bioczułniki do oznaczania potencjalnych markerów choroby Alzheimera” została przygotowana przez panią mgr Edytę Mięka w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie pod kierunkiem pani prof. dr hab. Ireny Radeckiej i przedstawiona Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Praca licząca 140 stron maszynopisu jest tradycyjnie podzielona na części literaturową i doświadczalną, zawiera 40 rysunków, połowa z nich przedstawia wyniki przeprowadzonych badań. Spis literatury w pracy liczy aż 246 pozycji i są to w większości publikacje w czasopiśmie o zasięgu światowym z ostatnich lat. W pracy przedstawiono również wykaz publikacji, zgłoszeń patentowych oraz konferencji naukowych, w których zawarto wyniki opisane w rozprawie. Można łatwo zauważyć, że część doświadczalna pracy była opublikowana głównie w postaci dwóch artykułów, które ukazały się w czasopiśmie *Sensors* w roku 2013 i 2014. Wydaje się, że stanowi to pewne ułatwienie dla recenzenta rozprawy doktorskiej, można chyba założyć, że publikacje w czasopiśmie o wartości współczynnika *Impact Factor* 2,3 zostały szczegółowo ocenione przez recenzentów. Kłopot jednak sprawia fakt, że obie publikacje mają po 7-8 autorów, a tylko jednym z nich jest autorka rozprawy doktorskiej.

Przedmiotem pracy doktorskiej pani Edyty Mięka jest nowatorski sposób wykrywania i ilościowego oznaczania białek uznawanych za markery chorób neurodegeneracyjnych. Jako narzędzie analityczne wykorzystano czujnik, biosensor elektrochemiczny, w którym powierzchnię elektrody złotej aktywowano warstwą elektroaktywną zawierającą receptor RAGE zdolny do wykrywania markerów biologicznych, białek, których podwyższony poziom obserwuje się m.in. w chorobie Alzheimera. Taki biosensor mógłby być prawdopodobnie

zastosowany do wykrywania tych markerów w płynach biologicznych, tj. osoczu czy płynie mózgowo-rdzeniowym. Byłoby to niewątpliwie niezwykle przydatne narzędzie pomocne przy wczesnym wykrywaniu chorób neurodegeneracyjnych.

Cel pracy autorka prezentuje szczegółowo na str. 63, zgodnie z nim celem pracy było opracowanie elektroaktywnych warstw opartych o elektrody złote zawierających receptor RAGE zdolny do wykrywania i oznaczania białek uważanych za markery choroby Alzheimera. Ogólnie rzecz biorąc cel ten został zrealizowany, chociaż szczegółowy zakres badań sformułowany przez doktorantkę na str. 63 przewidywał m.in. wybór optymalnych warunków otrzymywania warstwy aktywnej na powierzchni elektrody złotej oraz optymalizację warunków osadzania receptora RAGE na elektrodzie. Moim zdaniem tych elementów w pracy nie ma, na każdym etapie konstrukcji biosensora prezentowane jest w pracy jedno rozwiązanie, nie wiadomo czy jest ono najlepsze, czy zostało wybrane spośród innych propozycji, które były przedmiotem badań, nie porównano go bowiem z innymi rozwiązaniami. Na przykład autorka zamierzała zmodyfikować elektrody złote w oparciu o utworzenie samoorganizującej się warstwy, której elementem była N-acetylocysteina, jak to przedstawiono np. na rys. 25 na str. 74, (choć w pracy wymienia się również N-acetylocysteaminę na str. 69), nie mamy jednak wiadomości, czy taka warstwa została utworzona, jeżeli tak, to jakie były jej zalety, jakie efekty zamierzano osiągnąć poprzez skonstruowanie samoorganizującej się warstwy, nie wiadomo czy zastosowane stężenie acetylocysteiny było optymalne itd.

W części literaturowej pracy autorka starała się omówić wszystkie zagadnienia wchodzące w zakres pracy, tj. z jednej strony czujniki i bioczujniki elektrochemiczne, samoorganizujące się warstwy, elektrochemiczne techniki pomiarowe, a z drugiej strony choroba Alzheimera i markery biologiczne, charakterystyka receptora RAGE, jego struktura, domeny itd. Całość niestety jest mało spójna, jest właściwie składanką kilku tematów, w której z kolei moim zdaniem nie omówiono niektórych zagadnień, które w tej pracy znaleźć się powinny. Dla przykładu wydaje mi się, że w części literaturowej tej pracy powinien się znaleźć wyczerpujący opis metod obecnie stosowanych do wykrywania badanych biomarkerów. Przecież to one, a dokładniej ich niedoskonałość była prawdopodobnie głównym motywem podjęcia omawianej pracy doktorskiej, a jednym z istotnych parametrów tych metod jest ich koszt. O kosztach autorka jedynie wspomina we wnioskach (wniosek 9), bardzo ogólnie i tajemniczo twierdząc, że opracowany bioczujnik „mógłby zostać włączony do urządzeń pomiarowych w kosztowo efektywnej teranostyce choroby Alzheimera”. Byłbym wdzięczny za szersze rozwinięcie tego wniosku, w tym także ważnej sprawy kosztów metody opisanej w pracy. Metody oznaczania jednego z biomarkerów, tj. glikowanej albuminy są wymienione



dopiero w ostatniej części pracy (tab. 6 na str. 100) bez ich szczegółowej charakterystyki. Na marginesie, w tab. 6 dla porównania z innymi metodami wymieniono metodę będącą przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej i nazwano ją „elektrochemiczna bezpośrednia”, co jest błędnym sformułowaniem, bowiem nie mamy tutaj do czynienia z bezpośrednim oznaczaniem glikowanej albuminy, a o jej obecności wnioskujemy na podstawie redukcji sygnału modyfikowanej elektrody.

Część eksperymentalna jest bardzo spójna, poszczególne jej etapy przedstawiono w logicznej kolejności. W części pierwszej, zgodnie z obowiązującymi zasadami autorka opisała stosowane w pracy metody i techniki (nie ma to jednak wspólnego tytułu), w tym także złożony proces modyfikacji elektrod złotych najpierw pochodną tiolową kwasu pentetynowego i N-acetylocysteina, następnie octanem miedzi i odpowiednimi domenami receptora RAGE. Opisy kilku metod kończą się zdaniem „...elektrody przechowywano do czasu rozpoczęcia pomiarów elektrochemicznych”, jednak przebieg samych pomiarów elektrochemicznych nie został szczegółowo opisany, podane jedynie parametry techniczne, tj. zakres potencjału itd.

W części „Wyniki badań i dyskusja” autorka przedstawiła wyniki oznaczania trzech białek – markerów biologicznych przy użyciu skonstruowanego biosensora elektrochemicznego. Mierzony sygnał pochodził od jonu miedzi unieruchomionego na elektrodzie. Obecność biomarkera w środowisku pomiarowym zawierającym domenę naturalną receptora RAGE powodowała redukcję sygnału proporcjonalną do stężenia biomarkera oraz przesunięcie potencjału w kierunku wartości ujemnych. Jak to przedstawiono w pracy redukcja sygnału była skorelowana z przesunięciem sygnału. Wyniki badań doktorantka przedstawiła w postaci starannie wykonanych woltamogramów i kilku tabel, nie wiem jednak dlaczego autorka nazywa przedstawione na rysunkach woltamogramy reprezentacyjnymi, mając chyba na myśli materiały reprezentatywne.

Elektroda złota w czujniku opracowanym przez doktorantkę była modyfikowana wieloetapowo i każdy etap był śledzony poprzez pomiar elektrochemiczny metodami cyklicznej woltamperometrii i woltamperometrii fali prostokątnej. Najpierw oceniono efekt utworzenia warstwy złożonej z kwasu pentetynowego i acetylocysteiny. Konstrukcja tej warstwy miała kluczowe znaczenie dla dalszych etapów modyfikacji elektrody, a przede wszystkim dla skuteczności selektywnego wykrywania oznaczanych biomarkerów. Ocenę tej warstwy przeprowadzono poprzez pomiar metodą cyklicznej woltamperometrii efektu blokowania sygnału żelazocyjanku potasu wywołanego przez utworzoną warstwę. Stwierdzono, że warstwa ta blokuje skutecznie sygnał, jednak trudno na podstawie przedstawionych wyników ocenić, czy jest to warstwa optymalna, jak to sformułowano we

wnioskach, czy utworzona została samoorganizująca się warstwa o odpowiedniej orientacji. Kolejne etapy modyfikacji elektrody złotej kontrolowano przy użyciu woltamperometrii fali prostokątnej, a dodatkowo elektrodę z unieruchomionym receptorem RAGE obserwowano przy użyciu mikroskopu AFM. Białka markerowe – A $\beta$  (A $\beta$ <sub>16-23</sub>, A $\beta$ <sub>1-40</sub>), S100B i glikowana albumina były oznaczane ilościowo woltamperometrycznie, przy czym jako próbę kontrolną stosowano bioczułnik z domeną RAGE zmutowaną, która nie wykazywała powinowactwa do badanych białek.

Ważną cechą bioczułników, jak w przypadku każdej metody analitycznej jest ich zdolność do selektywnego wykrywania oznaczanego analitu. W przypadku biosensora będącego przedmiotem niniejszej pracy jest to szczególnie istotne, gdyż jego zadaniem byłoby wykrywanie biomarkerów w płynach biologicznych, a więc matrycy bardzo złożonej. W pracy zamieszczono wyniki pomiarów badanych białek w buforze, ale także w specjalnie przygotowanym osoczu i jak stwierdzono, takie środowisko nie wpływało na wynik pomiaru, co wydaje się ważne, ale i zaskakujące. Ponadto wykonano pomiary w środowisku zawierającym 2 badane białka, tj. oznaczano białko S100B z dodatkiem białka A $\beta$  oraz glikowaną albuminę w obecności albuminy z surowicy ludzkiej oraz białek S100B i A $\beta$ . W każdym przypadku nie stwierdzono istotnego wpływu białek towarzyszących na wynik pomiaru, w jednym przypadku limit detekcji białka S100B uległ ponad dwukrotnemu podwyższeniu w obecności białka A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Brak wpływu biomarkera towarzyszącego jest o tyle zaskakujący, że domeny VC1 receptora RAGE wykazują powinowactwo zarówno do białka S100B jak i białka A $\beta$ , co udowodniono w niniejszej pracy. Wydaje się, że selektywność bioczułnika wymaga dalszych badań, w tym także badanie związków mogących wpływać na sygnał Cu(II) unieruchomiony na elektrodzie.

Inną ważną cechą bioczułników, niestety nieobecną w ocenianej pracy jest ich stabilność, a więc pytanie o to, czy kolejne wykonane modyfikowane elektrody wykazują takie same cechy, jaka jest trwałość aktywnej elektrody, jak długo można przechowywać przygotowaną do pomiaru elektrodę pokrytą badaną próbą. W pracy, w opisie stosowanych metod stwierdzono, że elektrodę przechowywano w buforze do czasu rozpoczęcia pomiarów, ale nie wiadomo jak długo i czy czas tego przechowywania był jednakowy.

Liczne pytania i wątpliwości, które się nasuwają w trakcie czytania ocenianej pracy doktorskiej świadczą m.in. o tym, że zawartość pracy jest bardzo bogata, liczne i złożone eksperymenty rodzą z pewnością wiele pytań, są okazją do dyskusji i z takim przypadkiem mamy do czynienia w niniejszej pracy, w której opisano wiele eksperymentów i



zaprezentowano ich wyniki. Niewątpliwie doktorantka udowodniła przy tym, że opanowała trudny warsztat pomiarów elektrochemicznych.

Niestety w pracy jest sporo błędów językowych, wskazujących na to, że doktorantka nie poświęciła zbyt dużo czasu na korektę maszynopisu pracy. Są to najczęściej tzw. literówki, których jest sporo w tekście, ale także w tabelach (np. tab. 3), w kilku miejscach na stronach 96 – 97 jest odwołanie do tabeli 6 zamiast do tabeli 5.

Reasumując – oceniana praca doktorska jest interesująca, nowatorska i bardzo potrzebna, o dużej wartości zarówno poznawczej jak i aplikacyjnej. Jest istotnym krokiem wzmacniającym nasze nadzieje na znalezienie prostych i tanich metod umożliwiających wczesne wykrywanie chorób neurodegeneracyjnych. Pokazuje nową drogę do selektywnego wykrywania związków występujących w złożonych matrycach. Praca zawiera solidny materiał doświadczalny, opracowany w oparciu o bardzo bogaty zestaw literatury i nie budzący żadnych wątpliwości, że autorka w pełni opanowała metody i techniki opisane w pracy i umiejętnie się nimi posługuje. Doktorantka podjęła się rozwiązania nowatorskiego problemu naukowego i cel ten osiągnęła.

Stwierdzam, że praca pani mgr Edyty Miłucha pt. „Elektrochemiczne biocujniki do oznaczania potencjalnych markerów choroby Alzheimera” całkowicie spełnia wymagania dla prac doktorskich zawarte w obowiązującej Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie pani mgr Edyty Miłuchy do publicznej dyskusji nad rozprawą.



prof. dr hab. Marian Filipiak

Poznań, dnia 27 grudnia 2016 r.