



**POLITECHNIKA WARSZAWSKA**  
**WYDZIAŁ CHEMICZNY**  
**Zakład Mikrobioanalitki**



**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 2016-12-28

## **OCENA**

### **rozprawy doktorskiej mgr Edyty Mikuły**

pt: „*Elektrochemiczne bioczujniki do oznaczania potencjalnych markerów choroby Alzheimera*”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Edyty Mikuły pt.: „*Elektrochemiczne bioczujniki do oznaczania potencjalnych markerów choroby Alzheimera*” została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Hanny Radeckiej w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie.

Statystyki pokazują, że z roku na rok ludzie żyją coraz dłużej, co nie przekłada się jednak na jakość tego życia. Szczególnie wzrasta liczba pacjentów dotkniętych chorobami neurodegeneracyjnymi. Do tej grupy zaliczana jest choroba Alzheimera (AD) - rodzaj otępienia wywołanego neurodegeneracją oraz zmianami naczyniowymi w mózgu. Światowa Organizacja Zdrowia szacuje, że w 2016 r. cierpiało na nią ok. 26 mln osób. Dotychczas AD diagnozowana jest głównie na podstawie prowadzonych przez lekarzy obserwacji, wywiadu i testów neuropsychologicznych. Specjaliści korzystają także z wyników tomografii komputerowej. Ostateczna diagnoza należy zawsze do specjalistów (m.in. psychiatrów, neurologów), ale wczesne wykrycie ma jednak zasadnicze znaczenie dla leczenia, gdyż pozwala na skuteczniejsze zahamowanie tych procesów i odpowiednią rehabilitację chorego. Dlatego w wielu znaczących ośrodkach naukowych prowadzone są intensywne badania dotyczące opracowania szybkich metod przesiewowych pozwalających na wytypowanie osób zagrożonych rozwinięciem się choroby Alzheimera. Wśród proponowanych rozwiązań czołowe miejsce zajmują bioczujniki i szybkie testy wykorzystujące np. markery chorobowe, czy też zmianę parametrów fizycznych (np. sensory akustyczne). Można zatem stwierdzić, że recenzowana praca znakomicie wpisuje się w aktualne trendy badawcze, realizowana była w zespole posiadającym znaczne doświadczenie w tym zakresie.

W dalszej części recenzji przedstawię moje uwagi dotyczące zarówno strony redakcyjnej, jak i wartości merytorycznej omawianej pracy doktorskiej.

## **Strona redakcyjna**

Niniejsza praca doktorska składa się z jedenastu rozdziałów, z których rozdziały I-IV oraz IX stanowią zasadniczą część rozprawy. W pozostałych rozdziałach V-VIII Doktorantka zamieściła odpowiednio: *Streszczenia* (w języku polskim i angielskim), *Wykaz publikacji i konferencji naukowych*, *Spis ilustracji oraz Spis tabel*.

W rozdziale pierwszym zaprezentowany został przegląd literatury, w drugim doktorantka formułuje cel pracy, zaś III zawiera spis odczynników, aparatury oraz opis stosowanych procedur. Wyniki badań, ich dyskusja oraz wnioski przedstawione zostały w rozdziale IV. W ostatnim IX rozdziale znajduje się spis cytowanej literatury zawierający 246 pozycji – dominują publikacje z ostatnich 15 lat.

Całość została przedstawiona na 140 stronach tekstu ilustrowanego 40 rysunkami i 6 tabelami. Bardzo wygodnym dla czytającego uzupełnieniem pracy jest spis stosowanych przez Autorkę symboli i skrótów użytych w rozprawie, umieszczony na str. 8-10. Na podkreślenie zasługuje staranna szata graficzna pracy.

## **Wartość merytoryczna i użytkowa**

We wstępie w „Części literaturowej” (I.1) Doktorantka zarysowuje różnorodne zagadnienia związane z chorobą Alzheimera, by w ostatnim akapicie wskazać, że konieczny jest (cytuję) „rozwój metod analitycznych odpowiednich do jej wczesnej diagnozy” i zasygnalizować, że właśnie (cytuję) „realizacji tego zadania podjęła się w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej”, a następnie przechodzi do zaprezentowania przeglądu literaturowego. Autorska definiuje w nim podstawowe pojęcia związane z budową i działaniem czujników chemicznych (I.2-3). Tworzeniu samoorganizujących się monowarstw i ich zastosowaniu w bioczujnikach poświęcony został odrębny rozdział (I.4). W kolejnych rozdziałach Doktorantka omawia zagadnienia związane z istotą choroby Alzheimera oraz biomarkerami wykorzystywanymi do jej wykrywania (I.7-8). W ostatnich dwóch rozdziałach tej części dysertacji mgr Miłkuła skoncentrowała się na uzasadnieniu wyboru elementów warstwy receptorowej biosensorów będących obiektem badań w niniejszej pracy (I.9-10).

W „Części literaturowej” Autorka udostępniła czytającemu dobre merytorycznie omówienie zagadnień bezpośrednio związanych z planowanymi badaniami. W szczególności odnosi się to do części opisującej genezę choroby Alzheimera i mechanizmy jej rozwoju. Natomiast zabrakło mi informacji dotychczasowych osiągnięć w obszarze metod analitycznych stosowanych w diagnostyce choroby Alzheimera, a w szczególności przeglądu doniesień literaturowych dotyczących bioczujników.

Na stronie 73 Doktorantka jasno formułuje cel pracy. Jest nim opracowanie elektrochemicznego bioczujnika, w którym warstwę receptorową naniesioną na elektrodę złotą stanowić ma monowarstwa redoks aktywna w postaci kompleksu Cu(II)-DPTA zmodyfikowanego histagowanymi domenami receptora RAGE. Podaje także kolejne etapy jego realizacji, a wśród nich te związane z określeniem najlepszych parametrów pracy biosensora, testowania otrzymanego biosensora pod kątem jego przydatności bioanalitycznej, jak również zapowiada zaproponowanie mechanizmu generowania sygnału analitycznego.

W „Części eksperymentalnej” (III.1-11) znajdujemy spis aparatury, odczynników i materiałów stosowanych w badaniach, jak również staranny opis technik

analitycznych i metodyki pracy, w pełni potwierdzający poprawność prowadzenia doświadczeń przez Doktorantkę.

W kolejnej części Doktorantka przechodzi do najistotniejszej części pracy, jaką jest przedstawienie wyników własnych (IV.1-5) oraz sformułowanie wniosków z nich wynikających (IV.6). Układ tych rozdziałów jest logiczny, dobrze ilustruje kolejne etapy pracy. W pierwszym z nich (IV.1) Doktorantka opisuje kolejne etapy towarzyszące przygotowaniu warstwy receptorowej bioczuJNIKA, a w tym: nanoszenie warstwy mieszanej NAC/DPTA na powierzchnię elektrody złotej, tworzenie przez cząsteczki DPTA kompleksu z jonami Cu(II) i unieruchomienie wyodrębnionych domen receptora RAGE poprzez oddziaływanie ich histydynowych znaczników z jonami Cu(II). Kolejne trzy (krótkie, bo 6-7 stronicowe) rozdziały poświęcone są badaniu odpowiedzi voltamperometrycznych przygotowanych bioczuJNIKÓW w obecności wybranych trzech markerów choroby Alzheimera, odpowiednio: peptydów A $\beta$  (IV.2), białka S100B (IV.3) oraz glikowanej albuminy (IV.4) w celu określenia ich parametrów pracy. Znajdujemy tam suchy opis otrzymanych wyników i trendów ich zmian widzianych oczami Doktorantki. Często dane eksperymentalne są powielane i podawane jako wartości liczbowe w tekście i tabelach, jak i w postaci zależności na rysunkach. Forma prezentacji rezultatów przypomina raczej dziennik laboratoryjny niż fragment dysertacji. W rozdziale IV.5 Autorka przypomina jedynie zakładany i opisany w części literaturowej mechanizm zmian sygnału prądowego w obecności potencjalnych markerów AD. Rozdział IV kończy się podsumowaniem i wnioskami dotyczącymi przeprowadzonych badań. Tym razem Doktorantka w 11 starannie i precyzyjnie sformułowanych punktach scharakteryzowała efekty swoich prac, podkreślając najważniejsze ich aspekty i umiejętnie akcentując elementy nowości naukowej.

Jakość i sposób przedstawienia wyników sprawia, że choć nie mam istotnych merytorycznych uwag, niezbędne jest doprecyzowanie/uzupełnienie podanych w pracy informacji i/lub ustosunkowanie się do poniższych pytań i wątpliwości, które nasunęły się w trakcie czytania przedłożonej dysertacji:

- w rozdz. IV.2-3 odczuwalny jest brak oceny otrzymywanych wyników na tle opublikowanych w literaturze prac dotyczących wykrywania i oznaczania markerów AD badanych przez Doktorantkę. W odróżnieniu od rozdziałów IV.2 i IV.3, w rozdziale IV.4 pojawia się Tabela 6 zawierająca zestawienie kilku technik analitycznych stosowanych w metodach oznaczania glikowanej albuminy (G-Alb) wraz z podaniem zakresu stężeń jakie są możliwe do oznaczenia. Jednakże udział procentowego G-Alb w Alb nie da porównać się bezpośrednio (bez przeliczenia) ze stężeniem wyrażonym w pM, czy też  $\mu$ M G-Alb. Proszę Doktorantkę o przygotowanie i przedstawienie podczas publicznej obrony danych pozwalających porównać parametry pracy zaproponowanych przez nią i znanych w literaturze biosensorów przeznaczonych do wykrywania i/lub oznaczania badanych przez nią markerów AD.
- mimo iż w macierzystej jednostce Doktorantki badano i opisano inne tiolowane ligandy tworzące kompleksy z jonami Cu(II) służące do przygotowania warstw receptorowych biosensorów czułych na cząsteczki potencjalnych markerów AD, w przedłożonej pracy nie znalazłam komentarza na temat efektów zastąpienia np. IDA i NTA przez DPTA.

- str. 86; Doktorantka napisała (cytuję): „Składniki obecne w osoczu ludzkim nie miały wpływu na działanie bioczuJNIKA.”. Dlaczego więc obserwowano tak znaczne przesunięcie maksimum fali w kierunku mniej dodatnich potencjałów (roztwory: osocze vs. bufor; Tab.2) i większą czułość czujnika? W tym miejscu należy poprosić także o doprecyzowanie sposobu sporządzania krzywych kalibracyjnych (rys. 3.2). Jakie były wartości E [V], przy których dokonywano odczytu natężenia prądu  $I_n$  i  $I_0$ ?
- str. 87; uwaga j.w. – Jeżeli (cytuję): „Składniki osocza ludzkiego, jak również obecność  $A\beta_{1-40}$  nie wpływają na oznaczanie białka S100B.”, to dlaczego na Rys.33 A, B i C widoczne są istotne różnice w przebiegu krzywych woltamperometrycznych? Jakie były wartości E [V], przy których dokonywano odczytu natężenia prądu  $I_n$  i  $I_0$ ?
- str. 96; uwaga analogiczna jak do opisów ze str. 86 oraz 87 i w związku z tym pytanie: jaki błąd zostanie popełniony przy oznaczaniu w osoczu glikowanej albuminy o stężeniu 15 pM, jeżeli kalibracja była wykonana w buforowanym roztworze wodnym, który nie zawiera składników osocza?
- str. 94; proszę o wyjaśnienie znaczenia zestawienia zależności podanych na Rys. 37. Co Doktorantka miała na myśli pisząc: „To w istotny sposób poprawia niezawodność analizy próbek”,
- str. 70; z czego wynikają różnice w składzie buforów TRIS-HCl stosowanych do otrzymania warstw receptorowych na elektrodach złotych?

Autorka nie ustrzegła się też pewnych niedopowiedzeń oraz „literówek”:

- str. 7; ostatni rozdział w spisie treści, zatytułowany *Literatura*, powinien nosić numer IX, a nie XI.
- str. 95, akapit powyżej Rys. 38: Błędy w numeracji rysunków w tekście, na które powołuje się doktorantka. Dlaczego do oznaczania glikowanej albuminy zmienione zostały warunki pomiaru (bufor)?
- str. 79; brak odnośnika (Kurzątkowska i wsp., 2016) w spisie literatury,
- str. 84 (przedostatnia linia); czy warunki pomiarów pozwalają na podawanie DL z taką liczbą miejsc znaczących?
- str.85; błąd w komórkach Tabeli 2 definiujących procentową zmianę wartości prądu,
- str.98; błąd w komórkach Tabeli 5 definiujących procentową zmianę wartości prądu,
- str. 104; słowo „transduktor” proponuję zastąpić słowem „przetwornik”,
- W pracy występują bardzo często sformułowania typu „...oparty o..”, „...oparta na...” – typowe szablony językowe – myślę, że warto ich unikać.

Mgr Edyta Mikuła podjęła się trudnych i czasochłonnych zadań badawczych i wywiązała się z nich dobrze. Recenzowana rozprawa doktorska uzupełnia wiedzę na temat tworzenia warstw receptorowych biosensorów i zawiera elementy nowości naukowej. Planowanie i przeprowadzenie badań oraz końcowe efekty pracy oceniam bardzo pozytywnie. Za najważniejsze elementy rozprawy uważam:

- wykazanie, że postawiona hipoteza badawcza, mówiąca o możliwości wykorzystania tiolowej pochodnej kwasu pentetynowego, a dokładniej jego kompleksu z jonami Cu(II) do modyfikacji elektrody złotej w celu utworzenia monowarstwy elektroaktywnej i jednoczesnego efektywnego unieruchomienia odpowiednich histagowanych domen receptora RAGE była słuszna,
- umiejętność wykorzystania znajomości mechanizmów rozpoznawania molekularnego w warstwach receptorowych w celu zaprojektowania bioczuJNIKÓW czułych na wybrany analit,
- zaprojektowanie bioczuJNIKÓW do wykrywania i oznaczania biomarkerów AD (t.j. peptydy A $\beta$ , białko S100B oraz glikowana albumina) o dużym potencjale aplikacyjnym.

Wyniki badań będących przedmiotem dysertacji stały się podstawą 3 artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) - 2 artykuły ukazały się w czasopiśmie *Sensors* (IF<sub>2015</sub> 2,033) i 1 w *Current Alzheimer Research* (IF<sub>2015</sub> 3,145). Ponadto, wyniki dotyczące wykrywania białka S100B są przedmiotem patentu polskiego oraz zgłoszenia patentowego międzynarodowego. Potwierdza to aktualność i atrakcyjność tematyki badań. Dodać należy, że mgr Edyta Mikuła ma w swoim dorobku kolejną publikację, a także jest autorką lub współautorką 5 wystąpień konferencyjnych.

***Podsumowując:***

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Edyty Mikuły spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003 roku (wraz z późniejszymi poprawkami) podanymi w Ustawie "Prawo o szkolnictwie wyższym" i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii UMK o dopuszczenie Doktorantki do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Z poważaniem,