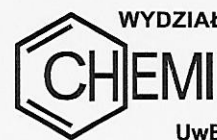




UNIwersytet w Białymstoku

Wydział Chemii



15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎/ fax (+48-85) 738-8052; e-mail: chemia@uwb.edu.pl

Prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz

Białystok, dn. 26.05.2025

Pracownia Bioanalizy,

Wydział Chemii,

Uniwersytet w Białymstoku.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Sylwii Pniewskiej pt.: ”Opracowanie modyfikowalnych platform biosensorowych do wieloparametrowej immunodetekcji wybranych biomarkerów związanych z infekcjami wirusowymi”.

Recenzowana rozprawa mieści się w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie biotechnologia i została wykonana w Katedrze Biotechnologii Medycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej w ramach Szkoły Doktorskiej Politechniki Warszawskiej. Promotorem rozprawy jest pani prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska a promotorem pomocniczym pan dr inż. Marcin Drozd. Dysertacja została zatem wykonana w uznanej szkole naukowej Pani Profesor Malinowskiej.

Wybór tematu rozprawy oceniam jako niezwykle trafny. Wykrywanie infekcji wirusowych przez oznaczanie ich biomarkerów jest aktualnym wyzwaniem bioanalizy.

Na rozprawę składają się 4 współautorskie publikacje:

Recent Advancement in Receptor Layer Engineering for Applications in SPR-Based Immunodiagnosctics, opublikowana w czasopiśmie Sensors (IF=3,847) w roku 2021,

A Careful Insight into DDI-Type Receptors Layers on the Way to Improvement of Click-Biology-Based Immunosensors, opublikowana w czasopiśmie Biosensors (IF=4,9) w roku 2024,

A versatile approach to quality control of protein-based receptor layers by reversible, nonspecific staining for multiplex SPRi immunosensing, opublikowana w czasopiśmie Sensors and Actuators, B: Chemical (IF=8,0) w roku 2024,

PET Foils Functionalized with Reactive Copolymers as Adaptable Microvolume ELISA Spot Array Platforms for Multiplex Serological Analysis of SARS-CoV-2 Infections, opublikowana w czasopiśmie Sensors (IF=3,4) w roku 2024.

Pierwsza z tych publikacji jest obszernym przeglądem literatury a trzy pozostałe są pracami eksperymentalnymi. W tych trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Zbiór publikacji stanowiących rozprawę jest opatrzony 36-stronicowym komentarzem. Ponadto rozprawa zawiera niepublikowany 31 stronicowy rozdział: "Wprowadzenie w problematykę podjętych badań". W tym rozdziale Doktorantka wskazuje na wiodące tendencje w rozwoju biosensorów to jest na szybką diagnostykę w miejscu opieki nad pacjentem oraz detekcję wieloparametrową. Ważną częścią tego wprowadzającego rozdziału jest diagnostyka infekcji wirusowych oparta o oznaczanie biomarkerów zakażeń wirusowych takich jak wirusowe DNA lub RNA, białka strukturalne wirusów, prozapalne cytokiny, białka ostrej fazy, prokalcytonina, ferrytyna oraz charakterystyczne przeciwciała. Innym ważnym podjętym tematem jest diagnostyka wieloparametrowa oraz mikromacierze białkowe. W dalszej części Doktorantka omawia strategie immobilizacji receptorów ogniskując uwagę na immobilizacji za pomocą kotwic DNA oraz nowe strategie immobilizacji receptorów, w tym poprzez zastosowanie reaktywnych kopolimerów. Rozdział kończy temat kontroli jakości białkowych warstw receptorowych. Włączenie tego wprowadzającego rozdziału do dysertacji uważam za zasadne, zwłaszcza, że dysertacja jest wielowątkowa, z kilkoma wątkami bocznymi.

Przegląd literatury będący pierwszą publikacją wchodzącą w skład recenzowanej dysertacji koncentruje się na tworzeniu warstw receptorowych w immunosensorach współpracujących z techniką SPR. Omawia on 159 publikacji z tego zakresu. Na wstępie zostały omówione najważniejsze kierunki rozwoju biosensorów SPR w tym tworzenia prostych warstw receptorowych wysokiej selektywności i czułości, strategii wzmocnienia sygnałów analitycznych w celu oznaczania niskich stężeń analitów oraz oznaczania analitów o niskich masach cząsteczkowych, możliwości równoczesnego oznaczania wielu analitów, miniaturyzacji umożliwiającej diagnostykę w miejscu opieki nad pacjentem. Zwrócono uwagę na główne ograniczenie w zastosowaniach biosensorów SPR jakim jest adsorpcja różnych składników matryc biologicznych. Szczegółowo zostały omówione różne strategie immobilizacji receptorów. Wymienić tu można immobilizacje przeciwciał oparte o oddziaływanie niekowalencyjne np. hydrofobowe, kowalencyjne oparte o bifunkcyjne tiole

zawierające grupy karboksylowe lub aminowe i tworzenie wiązań amidowych poprzez protokół NHS/EDS, a także o warstwę polimeru. Szczególną uwagę poświęcono immobilizacji receptorów za pośrednictwem warstwy karboksymetylodekstranu. Ponadto omówiono immobilizację z wykorzystaniem wiązania biotyna-awidyna, bakteriofagów oraz za pomocą kotwic DNA oraz wzmocnienia sygnału analitycznego przez zastosowanie nonanocząstek. W moim przekonaniu ten przegląd literatury stanowił dobre wprowadzenie do badań nad projektowaniem warstw receptorowych.

Druga publikacja jest wielowątkowa. Głównym wątkiem są badania porównawcze różnych oligonukleotydowych sond DNA: klasycznego DNA i jego dwóch analogów PNA (peptide nucleic acid) i ZNA (zip nucleic acid). Wszystkie trzy sondy mają grupę tiolową oraz taką samą sekwencję zasad purynowych, jednak w PNA szkielet cukrowo-fosforanowy został zastąpiony szkieletem peptydowym a w ZNA – uzupełniony kationowym fragmentem sperminowym, równoważącym anionowy fragment fosforanowy. W warunkach przepływowego pomiaru SPR obserwowano wiązanie trzech sond DNA ze złotym podłożem chipa oraz wiązanie komplementarnych oligonukleotydów z skonjugowanymi wcześniej sondami DNA (kotwicami DNA). W przypadku PNA zaobserwowano brak wiązania komplementarnego DNA, natomiast w przypadku ZNA wiązanie komplementarnego DNA jest znacznie silniejsze niż w przypadku “normalnego” DNA. Obserwowane różnice w odpowiedziach PNA, DNA i ZNA poparto badaniami ζ -potencjału powierzchni. Wpływ ładunku znajduje swoje odzwierciedlenie w zależności sygnałów SPR od siły jonowej, silniejszej w przypadku kotwic ZNA niż DNA. Innym ważnym optymalizowanym czynnikiem był dobór czynnika wypełniającego zapobiegającego niespecyficzej adsorpcji składników matrycy w procesie pomiarowym. Badaniami objęto 6-merkaptohexanol, często stosowany w tym celu, oraz dwa tiolowane poli(glikole etylenowe) o masach cząsteczkowych 800 i 3000 Da. Jako modelowy analit stosowano koniugat DNA i przeciwciała przeciw ludzkiemu CRP a jako modelowy interferent – królicze przeciwciała IgG. Wykazano, że najlepiej funkcję czynnika wypełniającego pełni tiolowany poli(glikol etylenowy) o masie cząsteczkowej 800 Da. Istotnym ułatwieniem pomiarów seryjnych jest wykazana możliwość regeneracji zimmobilizowanego DNA, po dokonaniu cyklu pomiarowego, roztworem NaOH o stężeniu 50 mM w warunkach przepływowych.

Innym wątkiem drugiej publikacji w cyklu stanowiącym rozprawę było badanie wpływu czystości koniugatów białko-DNA na wydajność ich immobilizacji na

jednoniciowych DNA. Badaniom poddano dwa białka: przeciwciało przeciwko hCRP oraz nukleopsyd wirusa SARS-CoV-2. Dokonano koniugacji tych białek z kotwicami DNA. Uzyskane mieszaniny zawierające koniugaty oraz nieprzereagowane związki poddano oczyszczeniu stosując preparatywną chromatografię jonową. Spośród zebranych frakcji wyłono dwie zawierające czysty koniugat. Następnie, w warunkach przepływowego SPRi badano wiązanie zimmobilizowanego DNA z koniugatem oraz dla porównania z wolnym DNA. Wykazano silniejsze wiązanie koniugatu z oczyszczonej frakcji niż nieoczyszczonej mieszaniny pokoniugacyjnej. Ponadto, na podstawie pomiarów kinetycznych, wykazano, że koniugat wiąże się słabiej z DNA niż wolny DNA. Badania te jednak objęły tylko koniugat przeciwciała przeciwko hCRP z DNA.

Trzecia publikacja w cyklu stanowiącym rozprawę dotyczy kontroli jakości białkowych warstw receptorowych przez odwracalne ich znakowanie barwnikami. Badania przeprowadzono na przykładzie dwóch białek: króliczego przeciwciała klasy IgG oraz transferryny zimmobilizowanych na złotej powierzchni chipa za pośrednictwem linkera HS-(CH₂CH₂O)_nCH₂COOH i protokołu NHS/EDS. Po wstępnych próbach do szczegółowych badań wyselekcjonowano trzy anionowe barwniki: Ponceau S (PS), czerń amidowa 10B (AB) oraz błękit brylantowy G-250 (CBB-G). Adsorpcje barwników kontrolowano techniką SPRi. Na przykładzie zimmobilizowanego króliczego przeciwciała klasy IgG badano wpływ pH i siły jonowej. Dobre wyniki uzyskano w kwaśnym zakresie pH. Wpływ siły jonowej był zróżnicowany dla poszczególnych barwników. Wykazano możliwość odwracalnej adsorpcji dokonując regeneracji zimmobilizowanego przeciwciała kwaśnym roztworem glicyny (pH 2). W mojej ocenie publikacja ta daje badaczom wartościowe narzędzie kontroli jakości zimmobilizowanych przeciwciał.

Czwarta publikacja w cyklu stanowiącym rozprawę dotyczy wykorzystania reaktywnych kopolimerów do budowania platform umożliwiających wykrywanie i oznaczanie klas i podklas przeciwciał powstających w surowicy w wyniku przebycia Covid-CoV-2. Jeden z dwóch badanych kopolimerów (MCP-2) posiada grupę wiążącą kowalencyjnie białko poprzez grupę aminową. Drugi kopolimer (Copoly Azide) umożliwia reakcję z DNA posiadającym grupę dibenzocyklooktanową a następnie stosując chemię kliknięć – połączenie z koniugatem białko – komplementarne DNA. Reaktywne kopolimery są umieszczone na elastycznej folii PET tworząc system studzienek, podobnie jak w przypadku techniki ELISA. Każdy z kopolimerów został wykorzystany do tworzenia

platform do oznaczania przeciwciał powstających w wyniku zainfekowania Covid-CoV-2. Jako receptor zastosowano nukleoproteinę wirusa Covid-CoV-2 zimmobilizowaną na dwa różne sposoby, w zależności od zastosowanego kopolimeru. Przetworzenie ilości przeciwciał wychwyconych z surowicy krwi na sygnał było dokonywane analogicznie jak w przypadku testów ELISA, to jest za pośrednictwem drugiego przeciwciała skoniugowanego z alkaliczną fosfatazą oraz fosforanem p-nitrofenolu. Zademonstrowano pełną użyteczność opracowanych testów do wykrywania przeciwciał IgA, IgG a także IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4 w surowicy krwi. Jako technikę pomocniczą w badaniach stosowano SPRi.

Obszerna wielowątkowa dysertacja zawiera kilka fragmentów zachęcających do podjęcia dyskusji:

- i. Czym kierowała się Doktorantka prowadząc badania kinetyczne z przeciwciałem przeciwko hCRP a pomijając nukleopsyd wirusa SARS-CoV-2? W tytule dysertacji są biomarkery chorób wirusowych?
- ii. Czy oczyszczone frakcje nukleopsyda wirusa SARS-CoV-2 skoniugowanego z DNA były lub będą wykorzystane w badaniach?
- iii. Czy biosensor zawierający nukleoproteinę wirusa Covid-CoV-2 zimmobilizowaną techniką chemii kliknięć może znaleźć zastosowanie do oznaczania przeciwciał przeciw SARS-CoV-2 techniką SPRi?
- iv. Czy rozważała Pani obserwację kontrolę powierzchni podczas kolejnych etapów budowania biosensorów technikami AFM czy SEM czy mikrowagą kwarcową?
- v. Czy przygotowanie złotej powierzchni chipa roztworem alkalicznej „pirani” jest optymalne?

Podsumowując ocenianą dysertację trzeba docenić jej wyjątkowo innowacyjny charakter oraz można wyróżnić kilka znaczących osiągnięć w badaniach biosensorów takich jak wprowadzenie reaktywnych kopolimerów do tworzenia platform do oznaczania przeciwciał wirusów w surowicy krwi, opracowanie metody kontroli jakości białkowych warstw receptorowych, badania immobilizacji receptorów białkowych za pomocą kotwic DNA czy optymalizacja czynnika wypełniającego.

W konkluzji stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Sylwii Pniewskiej pt: "Opracowanie modyfikowalnych platform biosensorowych do wieloparametrowej

immunodetekcji wybranych biomarkerów związanych z infekcjami wirusowymi” spełnia wszystkie warunki i wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571).

Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Sylwii Pniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gowolkiewicz Ewa