

Kraków, dn. 11.09.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Kaspra Marchlewicza pt.  
„Opracowanie przenośnego zminiaturyzowanego urządzenia diagnostycznego  
z elektrochemicznym czujnikiem DNA”**

Recenzowana praca doktorska została wykonana w Katedrze Biotechnologii Medycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem dwóch opiekunów, prof. dr hab. inż. Elżbiety Malinowskiej z PW i prof. dr hab. Renaty Bilewicz z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Jako główne źródło finansowania badań Doktorant wskazał projekt: Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Od chemii do bioinnowacji” TRI-BIO-CHEM w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego. Promotor i Kopromotor to wybitne osobowości polskiej oraz światowej chemii analitycznej i uznane autorytety w dziedzinie bioczujników. Również pozostali członkowie zespołu, w którym rozwijał się i dojrzewał Doktorant należą do ścisłej czołówki badaczy zajmujących się budową i aplikacją bioczujników w diagnostyce i ochronie środowiska. Rzetelne, merytoryczne wsparcie zespołu jakie niewątpliwie uzyskał na każdym etapie swojej pracy przekłada się na przełomową jakość osiągniętych rezultatów i szerokie uznanie międzynarodowego środowiska naukowego, czego dowodem są artykuły opublikowane w prestiżowych czasopismach z bazy JCR. Moją uwagę przykuła długa lista podziękowań i dedykacja, które świadczą o skromności i wysokiej kulturze osobistej Doktoranta. Jako cel rozprawy mgr inż. Kasper Marchlewicz zgłasza opracowanie i wykonanie oryginalnego, prototypowego mikrosystemu przepływowego z modułem, w którym przeprowadzana będzie łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) oraz elektrochemicznego bioczujnika DNA, wykazującego wysoką selektywność i czułość względem patogenu maczugowca błonicy, amplifikowanego wcześniej w module PCR. Oryginalność tego podejścia wynika z użycia różnych materiałów konstrukcyjnych, technologii wykonania poszczególnych elementów, sposobu zasilania, grzania i kontroli przepływu roztworu. W badaniach nad bioczujnikiem kluczową rolę odegrały testy związane z wytworzeniem warstwy receptora i komponowania składu roztworu przeznaczonego do analizy. Ważnym kierunkiem rozwoju prostych, ale niezawodnych systemów diagnostycznych jest ich miniaturyzacja, wynikająca z potrzeby analizy próbek o małej objętości, ograniczanie zużycia odczynników i energii, wytwarzanych odpadów oraz minimalizowanie kosztów ich produkcji, utylizacji i dokonywanych analiz. Nieszablonowe podejście Doktoranta do rozwiązywania niektórych z napotkanych trudności potwierdza innowacyjność Jego działań.



Praca ma duży potencjał aplikacyjny dlatego doceniam fakt, że wszystkie proponowane rozwiązania zostały rzetelnie udokumentowane i skomentowane. Uważam, że podjęta tematyka badawcza doskonale nawiązuje do aktualnych i przyszłościowych kierunków rozwoju współczesnej diagnostyki medycznej i analizy instrumentalnej.

Dysertacja mgr inż. Kaspra Marchlewicza została przedstawiona w formie monografii na **156** stronach, przy czym część literaturowa obejmuje **61** stron, a część eksperymentalna **85** stron, wraz z podsumowaniem, cytowaną literaturą, streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim oraz wykazem skrótów. Tytuł rozprawy został poprawnie zdefiniowany i dobrze nawiązuje do wyników badań przedstawionych w części eksperymentalnej. Materiał zebrany w części literaturowej, jest ściśle związany z tematyką prowadzonych badań i stanowi swoiste kompendium wiedzy dla czytelnika, co dowodzi zarówno spełnienia wymagań Ustawy w zakresie rozeznania literatury jak i opanowania odpowiedniego zakresu wiedzy w reprezentowanej dyscyplinie. Przedmiotem opisu są m.in. zagadnienia dotyczące problematyki budowy i działania urządzeń mikrofluidycznych, systemów Lab-on-a-Chip (LOC),  $\mu$ TAS (micro Total Analysis System) i Point-of-Care Devices (POC), stosowanych materiałów i metod ich obróbki, a także różnych reaktorów łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Sporo uwagi poświęcono także charakterystyce bioczuJNIKÓW DNA. Tą część pracy zamyka krótki opis problemów epidemiologicznych wywołanych przez nowe i nawracające choroby zakaźne, w tym błonicę. W rozdziale zatytułowanym *Metodyka* opisano stosowane reagenty, aparaturę oraz procedury badawcze. Pragnę docenić zwięzłe i rzeczowe sformułowanie celu, zakresu i celowość podjętych badań.

Uzyskane rezultaty Doktorant opisał w *Części doświadczalnej*, na którą składają się opisy wykonanych mikrosystemów PCR, zminiaturyzowanych modułów wymuszających i kontrolujących przepływ roztworu oraz elektrochemicznych bioczuJNIKÓW, które Doktorant zastosował z sukcesem do selektywnego wykrywania i oznaczania modelowego patogenu maczugowca błonicy. Tą część pracy zamykają rozdziały, w których przedstawiono projekt koncepcyjny kompletnego urządzenia diagnostycznego oraz *Podsumowanie i Wnioski*. Praca zawiera **47** rysunków i **11** tabel, które uznaję za kluczowe dla uzasadnienia formułowanych hipotez, wygłaszanych opinii, a także wyciąganych wniosków. Co godne uwagi, na ich podstawie Doktorant roztacza interesujące perspektywy dalszych badań. Cytowana literatura obejmuje **119** pozycji z uwzględnieniem zarówno najnowszych doniesień jak i prac nieco starszych. Korzystanie z bibliografii ułatwia pełny opis poszczególnych pozycji z podaniem tytułu artykułu. Z satysfakcją stwierdzam, że Doktorant dokonał trafnego wyboru, a dyskusja podjęta w części literaturowej dysertacji potwierdza wysokie umiejętności krytycznej analizy ogólnie dostępnej wiedzy. Żałuję natomiast, że w pracy zabrakło choćby krótkiego opisu sylwetki Doktoranta, z wyszczególnieniem np. wystąpień konferencyjnych, prowadzonych zajęć dydaktycznych czy podejmowanych inicjatyw organizacyjnych.

Rozprawę doktorską mgr inż. Kaspra Marchlewicza oceniam bardzo wysoko, gdyż świadczy ona o wyjątkowej pracowitości, determinacji i wnikliwości badawczej Doktoranta oraz nabytej przez niego umiejętności samodzielnego rozwiązywania problemów dotyczących projektowania, budowy i aplikacji zaawansowanych systemów typu Lab-on-a-Chip oraz Point-of-Care. Z sukcesem zrealizował bardzo ambitny projekt badawczy, który zwieńczył udanymi konstrukcjami różnych innowacyjnych systemów oraz dobrze cytującymi się artykułami naukowymi.

### *Znaczenie podjętej tematyki*

Realne zagrożenia związane z coraz częściej napotykanym globalnym rozprzestrzenianiem się chorób zakaźnych, jak na przykład ostatnia pandemia COVID-19 wywołana przez wirus SARS-CoV-2, potwierdzają jak istotne znaczenie dla ratowania życia ludzkiego i przeciwdziałania nowym zakażeniom odgrywa szybka spersonalizowana diagnostyka medyczna. W tym kontekście, tematykę badawczą realizowaną przez Doktoranta uznaję za priorytetową, inspirującą i godną naśladowania. Przedłożone projekty koncepcyjne, wykonane urządzenia prototypowe charakteryzujące się dużym stopniem uniwersalności, podobnie jak zebrane wnioski mają fundamentalne znaczenie dla dalszego rozwoju urządzeń typu Point-of-Care, stanowiących atrakcyjną alternatywę dla typowych badań diagnostycznych. Te ostatnie są przeprowadzane w specjalistycznych, zwykle centralnych laboratoriach, przez wysoko wykwalifikowany personel, przy wysokich kosztach i długim czasie pojedynczej analizy. Dlatego największą liczbę zakażeń i najwyższą śmiertelność obserwuje się w krajach Trzeciego Świata i w rejonach odległych od placówek medycznych.

### *Osiągnięcia pracy*

Oceniając osiągnięcia naukowe mgr inż. Kaspra Marchlewicza uznaję, iż przedłożona rozprawa oraz dołączony do niej wykaz **8** opublikowanych artykułów, **4** rozdziałów w monografiach i zgłoszenie patentu są rezultatem konsekwentnej realizacji dobrze zaplanowanego zadania badawczego. Jako osiągnięcia o charakterze nowatorskim i mające szczególne znaczenie dla rozwoju podjętej tematyki badawczej należy uznać:

- 1) Zaprojektowanie i wykonanie oryginalnego urządzenia diagnostycznego typu Point-of-Care, które umożliwi selektywne wykrywanie i wysokoczułe oznaczanie patogenu maczugowca błonicy, w oparciu o mikroprzepływowy system PCR, służący do szybkiej i efektywnej amplifikacji DNA, zintegrowany z celką pomiarową i trójelektrodowym czujnikiem, wyposażonym w elektrody: referencyjną, pomocniczą i pracującą o cechach specyficznego bioczuJNIKA DNA.
- 2) Zaprojektowanie i wykonanie mikroprzepływowego systemu PCR z wykorzystaniem folii poliestrowych, połączonych wzajemnie warstwą kleju, które ukształtowano za pomocą plotera laserowego, i w których osadzono pasywne zawory zwrotne oraz tłoczki miniaturowych pomp. Innowacyjne podejście do sposobu wykonania architektury systemu PCR umożliwiło Doktorantowi nadrukowanie elektrod oraz uformowanie w nim miniaturowej celki pomiarowej.
- 3) Zaprojektowanie, wykonanie i wyznaczenie podstawowych parametrów użytkowych oraz metrologicznych elektrochemicznego bioczuJNIKA DNA z rozpoznaniem molekularnym typu „hairpin”, w sekwencji nukleotydów TOX3 komplementarnej do fragmentu patogenu błonicy.
- 4) Opracowanie skutecznej procedury jakościowego oznaczania cDNA, tj. fragmentu genu szczepu błonicy w mieszaninie poreakcyjnej PCR. Efekty interferencji ze strony białek towarzyszących cDNA oraz poprawę efektywności hybrydyzacji cDNA-sonda osiągnięto optymalizując stężenie jonów magnezu(II) i rozcieńczając mieszaninę za pomocą dimetylosulfotlenku (DMSO).
- 5) Dowiedzenie, że dietyloditiokarbaniin (DEDTC) użyty jako wypełniacz warstwy receptora, istotnie zwiększa efektywność hybrydyzacji w porównaniu do merkaptoheksanolu (MCH).

Ciekawe i inspirujące są perspektywiczne kierunki badawcze wskazane przez Doktoranta:

- 1) Rozbudowanie systemu PCR o zbiorniki i zawory aktywne, które umożliwią automatyczną modyfikację składu i stężenia roztworu przed jego wprowadzeniem do celki pomiarowej.
- 2) Przystosowanie systemu do analiz poza laboratorium z wykorzystaniem zminiaturyzowanych urządzeń peryferyjnych i zasilania z baterii.

#### *Ocena końcowa*

Analizując cel i zadania szczegółowe wskazane przez Promotorów, konsekwentnie realizowane przez Doktoranta nie mam żadnych wątpliwości, że tematyka pracy jest ważna, ciekawa, wielowątkowa i stanowi oryginalne podejście zarówno koncepcyjne jak i konstrukcyjne oraz analityczne, a zatem spełnia wymagania tzw. „nowości naukowej”. Jej efektem są prototypowe, mikroprzepływowe systemy diagnostyczne przeznaczone do selektywnego rozpoznawania i oznaczania szczepu maczugowca błonicy oraz gotowe procedury analityczne. Doktorant rozwiązał szereg problemów związanych z projektowaniem i budową mikroukładów umożliwiających efektywną amplifikację DNA poprzez łańcuchową reakcję polimerazy (PCR), sięgając po różne materiały konstrukcyjne i technologie wytwarzania poszczególnych elementów. Na uwagę zasługuje oryginalny projekt bioczuJNIKA DNA różniący się od znanych i stosowanych w diagnostyce błonicy bioczuJNIków toksyny błonicy i jej przeciwciał. Na uwagę zasługuje wyjątkowo bogaty warsztat badawczy jakim dysponował Doktorant, lub do którego miał dostęp, wykazując się szczególnymi umiejętnościami manualnymi. Słowa uznania kieruję do Promotorów i Doktoranta za wyjątkowo trafne sformułowanie tematu i celu rozprawy, jak również konsekwentną jej realizację.

#### *Uwagi i komentarze do pracy*

Dysertacja doktorska została napisana w języku polskim. Solidnym wsparciem w jej ocenie są rysunki i zdjęcia namacalnie dokumentujące przygotowane projekty, wykonane układy, osiągnięte rezultaty i efekty interpretacji danych pomiarowych. Z szacunkiem i uznaniem odnoszę się do wszystkich komentarzy, zwłaszcza tych krytycznych wskazujących na napotykanne niepowodzenia. Obecny trend komentowania wyników badań raczej wyklucza porażki i koncentruje się na sukcesach, dlatego tak trudno, lub wcale nie można ich odtworzyć. Jak w każdej pracy, i w tej, pojawiły się drobne błędy edytorskie, głównie literówki, których można było uniknąć włączając automatyczne sprawdzanie pisowni. Nie znajduję jednak uzasadnienia aby je wyszczególniać.

Z racji nałożonego na mnie obowiązku recenzenta, zgłaszam pod rozważę kilka uwag i proszę Doktoranta aby w sposób merytoryczny ustosunkował się do nich w trakcie publicznej obrony:

- 1) W Streszczeniu i w Rozdziale 7.5 *Miniaturyzacja biosensora* pojawiają się określenia typu „przetwornik trójelektrodowy” i „przetwornik elektrochemiczny”. Przetwornik to urządzenie przekształcające daną wielkość (zwykle fizyczną) na inną wielkość wg określonej zależności i z określoną dokładnością. Może należało użyć określenia *trójelektrodowy czujnik*?
- 2) W Rozdziale 1.3 *Materiały i technologie* (str. 24) pojawia się informacja, że „*Poli(dimetylosiloksan) (PDMS) ... umożliwia jej (wody) odparowanie z wnętrza mikrokanalów i mikrostruktur przez co może doprowadzić do ... ogólnej zmiany stężenia analitów ...*”. Projektowane mikrosystemy PCR są szczególnie narażone na takie zjawisko (wysoka temperatura i ciśnienie), a jednak Doktorant sięga po ten materiał bardzo chętnie i często. Dlaczego?

- 3) W Rozdziale 7 *Procedura przygotowania warstwy receptorowej biosensora* (str. 64) odnajduję informację „*Tak przygotowaną elektrodę skanowano za pomocą CV w buforze hybrydizacyjnym, stosując zakres potencjału wykorzystywany w dalszych doświadczeniach.*” Proszę o wyjaśnienie w jakim celu?
- 4) Strona 72, brak opisu pod rysunkiem.
- 5) Elementy widoczne na Rysunkach 16, 26 i 32 zwymiarowano z dopuszczalną odchyłką 0,01 mm, to kardynalny błąd, gdy wymiar odnosi się na przykład do obrysu zewnętrznego. Tej wiedzy mogę oczekiwać od absolwenta o wykształceniu politechnicznym (inżyniera).
- 6) Mocno wątpliwe jest podawanie wartości odchyłek, wyrażonych w procentach, w stosunków do wymiarów projektowanych i uzyskanych dla konkretnych matryc i odlanych w nich struktur, jeżeli obliczone dla nich wartości odchylenia standardowe są nawet kilkukrotnie większe (Tabele 3 i 6).
- 7) W Rozdziale 3.2 *Mikrosystemy cykliczne PDMS/szkło* (str. 87) w założeniach projektowych podano: „*6. Długość mikrokanalu została obliczona na podstawie całkowitej objętości mikrosystemu oraz planowanego przekroju.*” Bardzo proszę o doprecyzowanie tej informacji: Czy długość kanału oblicza się na podstawie całkowitej objętości mikrosystemu, czy może na odwrót?
- 8) Rysunek 27, wartości wymiarów ubytków folii wydają się być podane w odwrotnej kolejności?
- 9) Rozdział 5 *Mikrozawór. Wpływ grubości zatyczki na ciśnienie otwarcia zaworu*. Jak wynika z mojego doświadczenia średnica zatyczki 2,5 mm jest zdecydowanie za duża w stosunku do średnicy sprężyny plenarnej dlatego nie odnotowano istotnych zmian w działaniu zaworu (Rysunek 28).
- 10) Parametr czułości jest wyrażany w jednostce ( $\mu\text{M}^{-1}$ ) (str. 9, 121, 134), nie znajduję uzasadnienia dla takiego zapisu.
- 11) Porównując wartości prądów pików dla receptora TOX3/MCH ( $\sim 10 \mu\text{A}$ ) i TOX3/DEDTC ( $\sim 20 \mu\text{A}$ ) (Rys. 44), zastanawiające jest dlaczego czułość tego drugiego jest ponad 3-krotnie niższa.
- 12) Testy stężenia buforu (Rysunek 45) przeprowadzono dla stężenia  $0,2 \mu\text{M}$  cDNA czyli zdecydowanie powyżej zakresu liniowości (40,2 – 80,5 nM). Czy można je uznać za wiarygodne?
- 13) Niektóre, obliczone wartości (str. 138) wymagają korekty liczb znaczących ( $51,29 \pm 9,78$  czy  $78,64 \pm 13,17$ ).

Reasumując, stwierdzam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska prezentuje bardzo rzetelny, szczegółowy opis przeprowadzonych prac badawczych o wysokim poziomie naukowym i szerokich perspektywach aplikacji. Badania wykonano z wyjątkowym rozmachem i starannością. Stawione hipotezy, tak jak i podjęta dyskusja wyników, przeprowadzona w oparciu o aktualne źródła literaturowe jednoznacznie dowodzą dojrzałości naukowej Doktoranta i nabytych przez niego szerokich umiejętności organizacji i prowadzenia badań. Sygnalizowane drobne błędy i uwagi w żaden sposób nie rzutują na moją bardzo wysoką ocenę pracy. Podjęta tematyka dotyczy złożonych procesów bio-fizyko-chemicznych, ich rozwiązanie wymagało od Doktoranta cierpliwości i zapewne pokory, czyli cech których bez osobistej pasji trudno by się doszukiwać. Uważam, że badania zainicjowane przez Doktoranta znajdują wielu kontynuatorów w kraju i za granicą.

**Wniosek końcowy**

W mojej ocenie przedłożona rozprawa doktorska zawiera znaczące elementy nowości naukowej, potwierdza także szeroką interdyscyplinarną wiedzę Doktoranta w reprezentowanej dyscyplinie, a stawiane wnioski końcowe jednoznacznie dowodzą, że wszystkie zakładane cele zostały zrealizowane perfekcyjnie. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że **rozprawa mgr inż. Kaspra Marchlewicza** pt. „*Opracowanie przenośnego zminiaturyzowanego urządzenia diagnostycznego z elektrochemicznym czujnikiem DNA*” **spełnia wszystkie wymagania odpowiednich przepisów prawnych i zwyczajowych stawianych pracom doktorskim i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Politechniki Warszawskiej o przyjęcie i dopuszczenie mgr inż. Kaspra Marchlewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej**

Z uwagi na wysokie walory naukowe i technologiczne rozprawy, jej kompleksowy a zarazem praktyczny charakter, bardzo dobrze przemyślaną i prawidłowo zastosowaną metodykę badań, a także dogłębną dyskusję uzyskanych wyników, **wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Politechniki Warszawskiej o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr inż. Kaspra Marchlewicza.** Wniosek uzasadniam bardzo wysokim poziomem merytorycznym prowadzonych badań naukowych, ich interdyscyplinarnym charakterem, obejmującym zaawansowane zagadnienia chemii analitycznej, inżynierii materiałowej, biochemii, diagnostyki medycznej i analizy sygnałów oraz wyjątkowo bogatym, wnikliwie zinterpretowanym materiałem doświadczalnym, a także wybitnym dorobkiem publikacyjnym (współautor 8 publikacji i 4 rozdziałów w monografiach) i wdrożeniowym (zgłoszenie patentowe). Nowatorski charakter tych badań, istotnie poszerzający stan wiedzy oraz sposób rozwiązania przedstawionych problemów badawczych świadczy jednoznacznie o bardzo wysokim poziomie naukowym reprezentowanym przez mgr inż. Kaspra Marchlewicza i Jego ponadprzeciętnych umiejętnościach eksperymentatorskich. Pragnę także zwrócić uwagę na wyjątkowo wysoki potencjał aplikacyjny prezentowanych w rozprawie badań i rozwiązań konstrukcyjny, doskonale wpisujących się w najnowsze trendy rozwoju zaawansowanych układów typu Lab-on-a-Chip oraz kompletnych urządzeń typu Point-of-Care Devices przeznaczonych do szybkiej diagnostyki medycznej.

Kraków, dn. 11.09.2023 r.