

Warszawa 24.05.2014

Prof. dr hab. Władysław Torbicz
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej
Im. Macieja Nałęcz PAN
02-109 Warszawa, ul. Ks. Trojdena 4



Recenzja
Rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Arkusz
p.t. Opracowanie elektrochemicznego biosensora do wykrywania
wybranych cytokin na podłożu Ti/TiO₂

Rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Arkusz zawiera dwa opracowania: (1) tekst główny Rozprawy o objętości 192 stron, przekazany mi do oceny przez AGH oraz (2) Dodatek o objętości 18 stron, opracowany przez Doktorantkę na moją prośbę. Celem Dodatku było: (1) bardziej precyzyjne przedstawienie tezy pracy doktorskiej, która po przerehabilitacji jednoznacznie określa zakres przeprowadzonych badań i wagę osiągniętych wyników; (2) uzupełnienie opisów stosowanej metodyki badań; (3) dokładniejszą interpretację uzyskanych wyników oraz (4) wprowadzenie poprawek natury edytorskiej. Ocena Rozprawy będzie oparta na obu tekstach pracy doktorskiej łącznie – tekstu głównego i Dodatku, traktowanych jako całość. Pragnę w tym miejscu zaznaczyć, że takie rozwiązanie jest mi znane i było już przez mnie stosowane.

Tekst główny Rozprawy zawiera: (1) informacje edytorskie (18 str.), (2) wprowadzenie poświęcone omówieniu zakresu prac i celowości ich podjęcia (4 str.), (3) przegląd literatury (4 rozdziały, 60 str.) dotyczący: biosensorów; nanorurek z ditlenku tytanu, stanowiących podłoże do unieruchamiania (immobilizacji) biologicznych receptorów wybranych cytokin, które wpływają na patogenezę wielu chorób; metod unieruchamiania tych receptorów i charakterystyk tych cytokin, a także wnioski z tego przeglądu, cel badań i tezę pracy, (4) część doświadczalną, przedstawiającą metodykę wykonywania badań oraz badania poszczególnych elementów składowych (warstw) biosensora immunologicznego, a także wnioski z przeprowadzonych badań (dwa obszernie rozdziały, 101 str.) i wykaz literatury (238 pozycji).

W części przeglądowej, w tym zawartej w Dodatku, omawiając prace poświęcone bioczuJNIkom wskazano, że istnieje duża różnorodność ich zasad działania oraz że są liczne ich zastosowania, przy czym większą uwagę zwrócono na bioczuJNIki elektrochemiczne, a w szczególności woltamperometryczne i impedancyjne, którym jest poświęcona Rozprawa. W rozdziale dotyczącym nanorurek TiO₂ podano podstawowe informacje o metodach ich wytwarzania, właściwościach i zastosowaniach. Przegląd różnych metod immobilizacji receptorów biologicznych zamieszczono w Rozdz. 3. W kolejnym rozdziale, po dokonaniu przeglądu cytokin, wytypowano trzy rodzaje cytokin, IL-6, IL-8 i TNF α jako czynników (markerów) wskazujących na występowanie w organizmie wielu rodzajów nowotworów. Po dokonaniu przeglądu literatury, Autorka przedstawiła tezę Rozprawy.

W części doświadczalnej, w rozdziale 5 i w Dodatku, omówiono program prac związanych z wykonaniem planowanych bioczuJNIków immunologicznych, obejmujący: (1) wykonanie podłoża bioczuJNIków w postaci matryc nanorurek z ditlenku tytanu o różnych parametrach – na foliach z tytanu (TNT) – metodą anodowania, modyfikację tych podłoża przez ich wyżarzanie, a także ich charakteryzację metodami rentgenowskimi – dyfrakcji (XRD) i spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS), pomiar kąta zwilżania powierzchni podłoża TNT, a także określenie właściwości metrologicznych tych podłoża metodami elektrochemicznymi – impedancyjną i woltamperometrii cyklicznej (CV);

(2) immobilizację na podłożach TNT przeciwciał wymienionych cytokin, będących antygenami tych przeciwciał, oraz immobilizację na TNT tych antygenów, co jest etapem końcowym wykonania bioczuJNIKÓW; (3) badania wykonanych bioczuJNIKÓW immunologicznych metodą impedancyjną i woltamperometrii cyklicznej. W rozdziale tym omówiono również stosowaną aparaturę technologiczną i pomiarową.

Wyniki prac eksperymentalnych wykonanych zgodnie z podanym wyżej programem przedstawiono w obszernym rozdziale 6, zawierającym 8 podrozdziałów odpowiadających poszczególnym zadaniom tego programu, oraz w Dodatku.

Ocena Rozprawy będzie przedstawiona w postaci odpowiedzi na zamieszczone niżej pytania.

1. Jakie zagadnienie naukowe jest rozpatrywane w pracy i czy zostało ono dostatecznie jasno sformułowane przez Doktorantkę?

Analizując literaturę poświęconą bioczuJNIKOM elektrochemicznym, głównie amperometrycznym (woltamperometrycznym) i impedancyjnym, Doktorantka zwróciła uwagę, że mimo licznych prac w tym zakresie (literatura jest bardzo obszerna), istnieją obszary, gdzie można uzyskać oryginalne wyniki. Takimi obszarami są: (1) wykorzystanie matryc nanorurek z ditlenku tytanu (TiO_2) jako podłoży do unieruchamiania różnych bioreceptorów w bioczuJNIKACH i (2) wybór ważnych z punktu widzenia diagnostyki medycznej substancji biochemicznych – markerów nowotworowych, które będzie można oznaczać za pomocą takich bioczuJNIKÓW. W bioczuJNIKACH opisanych w pracy doktorskiej Autorka wybrała 3 rodzaje markerów z grupy cytokin: interleukinę-6 (IL-6), interleukinę-8 (IL-8) i czynnik martwicy nowotworów (TNF α). Uzyskanie pozytywnej odpowiedzi na możliwość rozwiązania dwóch wyżej postawionych problemów naukowych wymagało rozwiązania następujących zagadnień szczegółowych: (1) opracowania podłoży z nanorurek TiO_2 (TNT) o właściwościach zapewniających unieruchamianie na nich bioreceptorów, (2) opracowania i optymalizację metod immobilizacji przeciwciał wymienionych cytokin (antiIL-6, antiIL-8, antiTNF α) na podłożach TNT, (3) opracowania i optymalizacji wykonania na TNT struktur trójwarstwowych, zawierających warstwę przeciwciał wymienionych cytokin, warstwę tych cytokin i warstwę tych przeciwciał znakowanych peroksydazą chrzanową (HRP), (4) opracowanie impedancyjnego układu pomiarowego i wykonanie pomiarów stężenia wymienionych cytokin metodą impedancyjną oraz (5) opracowanie woltamperometrycznego układu pomiarowego i wykonanie pomiarów stężenia wymienionych cytokin metodą wltamperometryczną. Zadanie podjęte w ramach doktoratu należy uznać za nowoczesne i ambitne. Wymienione cele badawcze zostały sformułowane jasno i kompetentnie w Rozprawie (tekst główny i Dodatek), a przyjęta metodyka badań była odpowiednia, aby pozytywnie rozwiązać wszystkie postawione wyżej problemy.

W tym miejscu pojawia się potrzeba skomentowania sprawy tezy postawionej przez Doktorantkę. Porównując sformułowanie pierwotne:

tlenki tytanu w formie nanotubularnej po modyfikacji termicznej zapewniają efektywną i szybką metodę elektrochemicznej detekcji markerów nowotworowych bez konieczności zabiegów funkcjonalizacji

i sformułowanie zawarte w Dodatku

tlenki tytanu w formie nanotubularnej po modyfikacji termicznej zapewniają efektywną i szybką metodę elektrochemicznej detekcji wybranych cytokin bez konieczności funkcjonalizacji obszarów powierzchniowych tych tlenków

należy stwierdzić, że sformułowanie pierwsze jest zbyt ogólne, gdyż w pracy rozważano tylko wybrane cytokiny, a nie wszystkie markery nowotworowe. Ponadto stwierdzenie „bez konieczności zabiegów funkcjonalizacji” nie jest prawdziwe, gdyż procedura immobilizacji przeciwciał na podłożach w postaci warstwy nanorurek z tlenku tytanu jest zabiegiem

funkcjonalizacji. Dlatego należało uściślić tezę, że w procesie wykonania podłoży ich obszary powierzchniowe nie muszą być funkcjonalizowane, np. metodami elektrochemicznymi czy plazmowymi w celu wprowadzenia do tlenku tytanu grup funkcyjnych.

2. Jaki charakter ma rozprawa (teoretyczny, doświadczalny, konstrukcyjny)?

Jak wspomniałem poprzednio, Doktorantka podjęła się realizacji ambitnego interdyscyplinarnego zadania o charakterze eksperymentalnym. Wykonanie pracy doktorskiej wymagało znajomości metod właściwych wielu dyscyplinom naukowym, głównie inżynierii materiałowej, elektrochemii, biochemii czy inżynierii biomedycznej. Jest oczywiste, że nie wszystkie te umiejętności są konieczne w równym stopniu. Ze względu na niemożliwość wykonania identyfikacji struktury krystalograficznej i chemicznej podłoży z nanorurek TiO_2 we własnym zakresie (brak we własnej uczelni drogiej aparatury badawczej), prace te zostały zlecone do Laboratorium Rentgenowskich Badań Strukturalnych na Wydziale Inżynierii Metali i Informatyki Przemysłowej AGH.

W celu optymalizacji podłoży do bioczujników, Doktorantka, wykonała różne warianty struktur nanorurek TiO_2 , stosując anodowanie elektrochemiczne folii tytanowych przy różnych stężeniach glikolu etylowego, napięciach i czasach, a następnie je wyżarzała. Wykorzystywano przy tym empiryczny wzór, opracowany w zespole z udziałem Doktorantki, podający zależność wymiarów nanorurek od parametrów procesu anodowania. Struktury optymalne posłużyły do wykonania, metodami chemicznymi, wymienionych wyżej bioczujników. Charakterystyki kalibracyjne opracowanych bioczujników (zależność sygnału wyjściowego od stężenia oznaczanych cytokin) były mierzone typowymi metodami właściwymi dla elektrochemicznych metod impedancyjnych i woltamperometrycznych. Analizując treść pracy doktorskiej (tekst główny i Dodatek), mogę stwierdzić, że Doktorantka dobrze opanowała wymagane techniki eksperymentalne i pomiarowe, konieczne do realizacji celów postawionych w doktoracie.

3. Czy w rozprawie przeprowadzono w sposób właściwy analizę źródeł, świadczący o dostatecznej wiedzy autora? Czy wnioski z przeglądu źródeł sformułowano w sposób jasny i przekonujący?

Istnieje obszerna literatura poświęcona wszystkim wymienionym obszarom wiedzy, koniecznym do realizacji celów postawionych w doktoracie. Najszerze rozeznanie literaturowe Doktorantka przeprowadziła w zakresie bioczujników. Po dokonaniu przeglądu różnego rodzaju bioczujników, większą uwagę Autorka zwróciła na immunologiczne bioczujniki woltamperometryczne i impedancyjne. Liczba cytowanych publikacji z tego obszaru nie w pełni wyczerpuje dostępne źródła. Z natury rzeczy Doktorantka musiała pominąć znaczną liczbę publikacji, lecz rozkładając trochę inaczej akcenty, głównie w odniesieniu do układu tekstu w dokonanym przeglądzie wymienionych bioczujników, można byłoby szerzej przedstawić stan wiedzy tym zakresie. Pewne uzupełnienie tego zagadnienia jest zawarte w Dodatku. Mimo wymienionych uwag, stwierdzam, że decyzja Doktorantki o celowości wykonania prac dot. bioczujników wymienionych wyżej cytokin, podjęta na podstawie przeanalizowanej literatury była słuszna, co potwierdziła przeprowadzona przez Doktorantkę bardziej szczegółowa, poparta cytowaniami analiza przedmiotu w odniesieniu do oczekiwań lekarzy onkologów, właściwości wymienionych markerów nowotworów i istniejących metod pomiarów tych markerów.

Literaturowy przegląd stanu wiedzy poświęconej metodom wytwarzania matryc nanorurek TiO_2 i badania ich właściwości, mimo stosunkowo licznych cytowań, był omówiony przez Doktorantkę mniej szczegółowo niż sprawy bioczujników. Moim zdaniem było to wynikiem przyjęcia przez Doktorantkę jednej ze znanych z literatury metod wykonywania nanorurek TiO_2 – anodowe utlenianie tytanu – oraz zlecenia zewnętrznemu wykonawcy badań dot. właściwości strukturalnych podłoży z nanorurkami TiO_2 . Może dlatego Doktorantka nie zauważyła podanych niżej publikacji dotyczących tej metody, m.in.

doboru określonych parametrów geometrycznych nanorurek TiO_2 , w tym opisu ilościowego tego procesu:

- L. Yin et al., Understanding the growth behavior of titania nanotubes, *Electrochemistry Communications*, 13 (2011) 454–457.
- G. Butail et al., Kinetics of titania nanotube formation by anodization of titanium films, *Thin Solid Films* 519 (2011) 1821–1824.
- H. Omidvar et al., Influence of anodization parameters on the morphology of TiO_2 nanotube arrays, *Superlattices and Microstructures* 50 (2011) 26–39.
- Dongliang Yu et al., Morphological evolution of TiO_2 nanotube arrays with lotus-root-shaped nanostructure, *Applied Surface Science* 276 (2013) 711–716.

Opisując w sposób skrótowy stan wiedzy dot. procedur wyżarzania nanorurek TiO_2 , w celu poprawy ich parametrów, Doktorantka cytuje tylko 3 publikacje. Nie jest to dużo.

4. Czy Doktorantka rozwiązała postawione zagadnienia, czy użyła właściwej do tego metody i czy przyjęte założenia są uzasadnione? Na czym polega oryginalność rozprawy?

Powtórzę jeszcze raz, że Doktorantka podjęła się realizacji ambitnego, trudnego i pracochłonnego zadania dotyczącego opracowania rodziny nowych elektrochemicznych bioczuJNIKÓW immunologicznych w dwóch wersjach: jako układów impedancyjnych i woltamperometrycznych, które mają być przeznaczone do detekcji trzech rodzajów markerów chorób nowotworowych, jakimi są cytokiny IL-6, IL-8 i $\text{TNF}\alpha$. Planując realizację tego zadania przyjęła prawidłową koncepcję zakładającą wykonanie w pierwszej kolejności podłoża tych bioczuJNIKÓW jako nanorurek TiO_2 , poddanych w fazie końcowej wyżarzaniu, które będą wykorzystane, w zasadzie, w jednakowej postaci we wszystkich wymienionych bioczuJNIKACH. Następnie została opracowana metoda unieruchamiania przeciwciał wymienionych cytokin jako antygenów. W ten sposób została opracowana platforma technologiczna służąca do wykonania wszystkich bioczuJNIKÓW (IL-6, IL-8 i $\text{TNF}\alpha$) będących przedmiotem Rozprawy doktorskiej. Pomiary charakterystyk opracowanych bioczuJNIKÓW Doktorantka wykonała w sposób prawidłowy.

Przechodząc do oceny oryginalności najważniejszych wyników opisanych w tekście głównym Rozprawy i w Dodatku uważam, że najważniejszymi oryginalnymi osiągnięciami Doktorantki było: (1) wybór markerów chorób nowotworowych, które są określane za pomocą opracowanych bioczuJNIKÓW oraz (2) opracowanie procesów związanych z wykonaniem wymienionej wyżej platformy, a także modeli bioczuJNIKÓW. Ze względu na liczne publikacje opisujące optymalizację wykonania matryc nanorurek TiO_2 i brak odniesienia własnych wyników do wyników przedstawionych w tych publikacjach nie jest jasny stopień oryginalności wykonania matryc nanorurek TiO_2 . Chcę jednak zaznaczyć, że były to prace wymagające wiele wysiłku.

5. Czy Doktorantka wykazała umiejętność poprawnego i przekonującego przedstawiania uzyskanych przez siebie wyników (zwięzłość, jasność, poprawność redakcyjna rozprawy)?

Mam pewne uwagi do kompozycji Rozprawy. Analiza głównego (pierwotnego) tekstu Rozprawy wskazuje, że akcenty w części dot. przeglądu stanu wiedzy w rozpatrywanym zakresie nie zostały zbyt dobrze rozłożone. W bardzo wielu przypadkach są tam zamieszczone informacje łatwo dostępne nawet w publikacjach książkowych wydanych w Polsce. Są w niej również podane nieprecyzyjne definicje i klasyfikacje. Odnosi się wrażenie, że ta część jest napisana dla niespecjalistów. Znacznie lepszą strukturę mają rozdziały, w których opisano wyniki własnych prac. Rozpatrując całościowo tekst główny Rozprawy i Dodatek, pozytywnie odpowiadam na to pytanie.

6. Jakie są słabe strony rozprawy?


Znaczna większość spraw wymagających wyjaśnienia, uzupełnienia czy poprawienia Doktorantka przedstawiła w Dodatku. Uwagi szczegółowe w odniesieniu do niektórych

sformułowań stylistycznych i terminologicznych zazaczyłem w tekście, który przekazuję Doktorantce z nadzieją ich uwzględnienia w dalszych pracach redakcyjnych.

7. Wniosek końcowy

Ambitna i rozległa praca wykonana przez Doktorantkę oraz uzyskanie oryginalnych wyników potwierdzających tezę Rozprawy przedstawioną w Dodatku pozwalają mi stwierdzić, że w świetle ustawy o tytule i stopniach naukowych może ona być podstawą uzyskania przez mgr inż. Katarzynę Arkusz stopnia doktora nauk technicznych w dyscyplinie biocybernetyka i inżynieria biomedyczna. Stawiam wniosek o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę oryginalność uzyskanych wyników proponuję wyróżnienie Rozprawy, mimo nieprzekazania mi regulaminu wyróżnień prac doktorskich przyjętego przez Radę Naukową Wydziału.



/W. Torbicz/

