



**Prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska, prof. zw. PW**

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, tel.: 022-234-5657; e-mail: elzbieta.malinowska@pw.edu.pl

Warszawa 2022-07-21

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Kamili Spychalskiej**  
**pt. „Konstruowanie układów biosensorowych modyfikowanych strukturami**  
**półprzewodnikowymi”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Kamili Spychalskiej pt. „*Konstruowanie układów biosensorowych modyfikowanych strukturami półprzewodnikowymi*” została wykonana w Katedrze Inżynierii i Modelowania Materiałów Zaawansowanych na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Promotorem pracy jest dr hab. inż. Joanna Cabaj, zatrudniona na stanowisku profesora Uczelni.

### ***Strona redakcyjna***

Rozprawa napisana jest w języku polskim i obejmuje łącznie 149 stron. Praca ma charakter klasycznej pracy doktorskiej z podziałem na dwie części: teoretyczną (rozdziały 1-6) i badawczą (rozdziały 7-9). Poprzedzają je użyteczny dla czytającego wykaz najważniejszych skrótów stosowanych w dysertacji, spis treści oraz wprowadzenie nakreślające zakres tematyczny pracy, zdefiniowanie celu, a następnie poszczególnych etapów pracy.

W rozdziale 1.1 części teoretycznej doktorantka definiuje podstawowe pojęcia funkcjonujące w obszarze sensorów chemicznych i ich parametry pracy ważne z analitycznego punktu widzenia, a następnie przedstawia przykłady zastosowania biosensorów w diagnostyce klinicznej, przemyśle spożywczym oraz ochronie środowiska i rolnictwie. Następnie pobieżnie opisuje elementy biologiczne stosowane w warstwach receptorowych biosensorów (rozd. 1.2), metody immobilizacji enzymów na podłożach stałych (rozd. 3), techniki elektrochemiczne (rozd. 4). Kolejne dwa rozdziały, nawiązujące bezpośrednio do zakresu badawczego przedłożonej do oceny pracy, dotyczą polimerów przewodzących i ich zastosowania w biosensorach elektrochemicznych (rozd. 5) oraz głównego obiektu badań -  $17\beta$ -estradiolu należącego do grupy związków endokrynnie czynnych (rozd. 6).

W części badawczej przedstawiona została stosowana aparatura i odczynniki oraz opisana metodyka przeprowadzonych prac doświadczalnych (rozd. 7), zaś rozdział 8 zawiera wyniki badań, z podziałem na: określenie warunków pracy immobilizowanych enzymów, charakterystykę elektrochemiczną  $17\beta$ -estradiolu, elektrod platynowych zmodyfikowanych warstwami opracowanych filmów polimerowych oraz badania właściwości otrzymywanych na ich bazie biosensorów czułych na  $17\beta$ -estradiol. Tę część zamyka ważny dla pracy rozdział 9 zawierający sformułowane przez doktorantkę wnioski.

Dopełnieniem rozprawy są: podsumowanie, spis publikacji cytowanych w dysertacji, a także dorobek naukowy doktorantki. Całość zamykają wykazy schematów (rysunków) i tabel zawartych w pracy.

Na podkreślenie zasługuje staranna szata graficzna pracy.

### ***Wartość merytoryczna i użytkowa***

Praca doktorska mgr inż. Kamili Spychalskiej wpisuje się w obszar najnowszych trendów badawczych ukierunkowanych na projektowanie biosensorów o udoskonalonych parametrach pracy. Takich, które umożliwiłyby opracowanie szybkich, dokładnych i precyzyjnych metod analitycznych bez wstępnego, czasochłonnego etapu przygotowania próbki analitycznej. Przedmiotem przedłożonej do oceny dysertacji są zagadnienia związane z odpowiednią modyfikacją przetworników elektrochemicznych (elektrod platynowych) warstwami przewodzącymi do uzyskania biosensorów elektrochemicznych z bezpośrednim przeniesieniem elektronów (DET).

We wprowadzeniu doktorantka zarysowuje powody, które przyczyniły się do podjęcia badań, formułuje hipotezy wskazujące na istotne znaczenie otrzymanych wyników z punktu widzenia analiz środowiskowych, a następnie przedstawia kolejne etapy pracy, które miałyby doprowadzić do opracowania analitycznie użytecznego biosensora do wykrywania  $17\beta$ -estradiolu. Ten zgrabnie napisany tekst zapowiada ciekawą i dobrze zaplanowaną pracę.

Część teoretyczna, wsparta 182 odnośnikami literaturowymi zawiera zagadnienia ogólne, które można znaleźć w ogólnodostępnych podręcznikach akademickich (rozd. 1-4; 37 stron), jak i te związane bezpośrednio z planowanymi badaniami (rozd. 5,6; zaledwie 14 stron zilustrowanych kilkoma wybranymi przykładami biosensorów). Tu oczekiwać by można szerszego, krytycznego przeglądu prac dotyczących biosensorów III generacji, jak również różnego typu sensorów do wykrywania/oznaczania związków z grupy EDC. Takie omówienie stanowiłoby bazę do dyskusji uzyskanych przez doktorantkę.

Metodyka pracy, rozpoczynająca część badawczą, została opisana w staranny sposób, umożliwiającą odtworzenie eksperymentów. Nie zauważyłam tu istotnych uchybień. Same badania zostały starannie zaplanowane, poczynając od wyboru odpowiednich monomerów i opracowania warunków umożliwiających osadzenie w kontrolowany sposób cienkich filmów polimerowych na elektrodzie platynowej, po modyfikację cząsteczkami receptorów (enzymów i przeciwciał) i ostatecznie przeprowadzenie badań określających parametry pracy otrzymanych biosensorów.

W celu uzyskania podłoży polimerowych o najlepszych właściwościach przewodzących, a jednocześnie umożliwiających efektywną immobilizację składników

biologicznych (receptorów), doktorantka opracowała procedury polimeryzacji wyjściowych heterocyklicznych układów sprzężonych. Do badań doktorantka zastosowała monomery (pochodne ditienosilolu, benzotiadiazolu oraz pirydyny) zsyntezowane w macierzystej jednostce. Czy na podstawie wykonanych badań można porównać efektywność działania (przenoszenia elektronów) otrzymywanych filmów polimerowych, a także wskazać i uzasadnić najlepszy w tej grupie?

Jako modelowy analit doktorantka wybrała  $17\beta$ -estradiol (skrót stosowany w pracy E2). Aby udowodnić przydatność tak zmodyfikowanych elektrod w konstrukcji biosensorów do wykrywania E2, mgr K. Spsychalska funkcjonalizowała je odpowiednio poprzez immobilizację wytypowanych enzymów (tyrozynazy, lakazy oraz peroksydazy chrzanowej). Sprawdziła też możliwość zastosowania w warstwie receptorowej przeciwciał monoklonalnych Anty-E2-Ab. Jak wynika z Tabeli 6 na str. 69, doktorantka przebadła 10 wariantów modyfikacji elektrody pracującej, natomiast w dysertacji bardziej szczegółowo opisała te 4 (rozdział 8.4; str. 94-118), których parametry uznała za najlepsze. Ponieważ każda z tych modyfikowanych elektrod zawierała warstwę przewodzącą otrzymaną z innego monomeru i była funkcjonalizowana innym bioreceptorem, nasuwa się pytanie: czym podyktowany był dobór takiej pary? Mechanizmem działania/rozpoznawania molekularnego? Procesami wymiany elektronów? A może był przypadkowy?

Dla każdego z wariantów została zbadana zależność natężenia prądu od stężenia E2 i na tej podstawie wyznaczone podstawowe parametry pracy sensora, takie jak czułość, LOD, LOQ, zakres odpowiedzi prostoliniowej. Dodatkowo określona została selektywność tych układów w odniesieniu do potencjalnych interferentów. W jednym przypadku doktorantka podjęła też próbę oceny trwałości w czasie. Co z pozostałymi parametrami użytkowymi wymienionymi na str. 7/8 w części teoretycznej? Rozdział 8.4, w którym zaprezentowane zostały te wyniki badań przypomina raczej niestarannie prowadzony dziennik laboratoryjny, a w nim błędy i treści budzące pytania/wątpliwości, które sformułowałam poniżej w sekcji uwagi szczegółowe.

Wartościową częścią dysertacji jest rozdział 9 „Wnioski”, w którym doktorantka podjęła dyskusję i ocenę (nieco zbyt optymistyczną) uzyskanych wyników, zestawiając je w tabeli 16 na str. 129.

Po przeanalizowaniu całości dysertacji nie mam fundamentalnych zastrzeżeń do strony merytorycznej dysertacji, ale różnego typu uchybienia rzutują ostatecznie na jej jakość. Odniosłam wrażenie, że zabrakło czasu i/lub determinacji by dokonać przeczytania całej pracy, dokonania starannej korekty i usunięcia licznych powtórzeń, a także ważnego z punktu widzenia analityka elementu badań związanych z oznaczaniem wybranego analitu (E2) w próbkach naturalnych wody, a nie tylko roztworach syntetycznych przygotowanych w laboratorium.

### ***Uwagi i pytania szczegółowe:***

#### *Tabele z wynikami i rysunki w całej pracy*

Generalnie we wszystkich tabelach podających dane liczbowe charakteryzujące pracę sensorów, przy ocenie statystycznej brakuje informacji o liczbie wykonanych powtórzeń. Z jaką dokładnością odczytywane były wartości mierzonego prądu? Ile miejsc znaczących jest dopuszczalnych w podawaniu wyliczanych wartości liczbowych?

Str.3: Już w pierwszym akapicie na 3 str. pojawia się konkluzja: „Zastosowanie do modyfikacji przetwornika związków heterocyklicznych nie tylko zwiększyło selektywność konstruowanego czujnika, ale również wpłynęło na obniżenie granicy wykrywalności. .... W efekcie uzyskiwane są krótsze czasy reakcji oraz lepsza czułość układu.” Jeżeli to cytata z literatury, to brakuje odnośnika. Jeżeli to wnioski z badań własnych - należałoby podać miejsce w części doświadczalnej, gdzie należy szukać wyników potwierdzających.

Str.7: brak definicji pojęcia „**odwracalność**”;

Tabela 1, str. 15:

Puste miejsca w kolumnie „Ograniczenia”. Czyżby całe komórki, fagi, aptamery i mimetyki przeciwciał były pozbawione ograniczeń. Proszę o ustosunkowanie się do mojego pytania podczas obrony.

Ostatnie zdanie na str. 25:

Proszę o doprecyzowanie o analizie jakich „zmian fizykochemicznych powstałych podczas tworzenia się kompleksu” Ag-Ab jest tutaj mowa?

Tabela 6 str. 69:

Dla biosensora w pozycji 4 stężenie E2 odpowiadające LOD jest o rząd wielkości większe niż najniższe stężenie podane dla zakresu liniowej odpowiedzi. Jak należy to rozumieć?

Str. 70-72

Jest ogólnie wiadomo, że każdy enzym wykazuje maksimum aktywności w pewnym optymalnym zakresie danego parametru (np. pH, temperatura). Doktorantka sprawdziła wprawdzie wpływ powyższych parametrów na aktywność badanych enzymów, ale w dwóch przypadkach na krzywych nie pojawia się maksimum. Rodzi się pytanie o przebieg zależności poniżej pH = 6,8 (Schemat 22A) oraz powyżej temperatury 45 °C (Schemat 23B). Ponadto, skąd pewność, iż na wykresie 23A maksimum przypada przy 37 °C, a nie np. przy 36 °C. Zadając te pytania chciałabym uczulić doktorantkę by wyznaczając przebieg zależności zagęszczać punkty pomiarowe w pobliżu oczekiwanego maksimum, a jeżeli takowe nie występuje – rozszerzyć zakres badanego parametru. Należy również pamiętać, by unikać wyboru środowiska reakcyjnego na zboczu krzywej, gdyż nawet najmniejsze zmiany kontrolowanego parametru mogą powodować znaczące błędy pomiarowe.

W podpisach Schematów 22C i 23B brakuje podania, odpowiednio, temperatury oraz pH dla których prowadzono pomiary aktywności enzymów

Schemat 33, str. 83: Oba rysunki A i B zbyt małe, nieczytelne, niemożliwe do interpretacji.

Schemat 47 na str. 95 - Błędny podpis osi X

Schemat 48 na str. 96:

W ostatnim zdaniu na tej stronie napisano, cytując: „Na podstawie otrzymanych wyników DPV, na schemacie 48 zobrazowano odpowiedź liniową biosensora wobec szerokiego zakresu stężeń E2 (0,2 – 200 µM) z bardzo dobrym współczynnikiem liniowym ( $R^2=0,99$ )”. Chciałabym prosić doktorantkę o dokonanie małego przeliczenia wartości  $\log(C)$ : 0,8 i 2,0 zamieszczonych na wykresie 48 na osi X na wartości stężenia. Czy nie zaszła tu jakaś pomyłka? Dlaczego nie zastosowano funkcji linowej  $I=f(c)$  przy interpretacji wyników?

Tabela 7, str. 97:

Parametry analityczne układu przedstawione w Tabeli 7, w zestawieniu ze schematem 48, zmuszają do zadania kilku pytań, na które nie znalazłam odpowiedzi w przedłożonej dysertacji (lub je przeoczyłam).

Na czym polega różnica pomiędzy wartościami „Nachylenia krzywej regresji” a „Czułością”? Co się kryje pod pojęciem „Przecięcie”? Jakie są miana wartości podanych w kolumnach 4-8? Z jaką dokładnością mierzono wartości prądowe?

W jaki sposób określano powierzchnię aktywną elektrod? Czy powierzchnia ta ulegała zmianie po kilku cyklach regeneracji? Jak zmieniały się parametry analityczne układu w czasie (ile cykli regeneracyjnych z użyciem może „przeżyć” sensor)?

*Schemat 49 na str. 98:*

Legenda – błąd w opisie 1-szej kolumny. Powinno być E2, a nie E3.

W podpisie brakuje informacji dla jakiego stężenia dodanego interferenta otrzymano wyniki przedstawione na zaprezentowanym wykresie.

*Schemat 51, str. 101 oraz Schemat 53 str. 103:*

Analizując przebieg woltamperogramów CV na rys. 51 przyszło mi do głowy przewrotne pytanie – czy konieczne jest dodawanie tyrozyny by uzyskać selektywny i czuły sensor do oznaczania E2? Czy doktorantka wykonała badania porównawcze (np. krzywa kalibracji, selektywność) dla układów Pt-E i Pt-E/bisEDOTDTSi, analogiczne do przeprowadzonych dla Pt-E/bisEDOTDTSi/Tyr? Jeżeli tak, to co daje kolejna modyfikacja elektrody Pt-E?

*Str. 102-103:*

Skąd wniosek, że zakres prostoliniowej odpowiedzi zaczyna się od wartości 0,5  $\mu\text{M}$ ? Przecież najmniejsza zastosowana w eksperymentach wartość stężenia E2 to 5  $\mu\text{M}$ .

*Schemat 54, str. 104:*

Mam wątpliwości czy, cytując: „*Poszczególne związki interferujące zmieniają wartość odczytu średnio o 10,9%.*” Czy nie zdziwiło doktorantki to, że sygnał maleje i to maleje jednostajnie w czasie? Jaki byłby charakter przebiegu zmian prądu, gdyby odwrócić kolejność dodawanych interferentów (np. zaczynając od AA, a kończąc na UA)?

*Str. 108:*

Jakie mają być stężenia HRP i H<sub>2</sub>Q wytypowane jako najlepsze do dalszych badań – rzędu mM (tekst) czy  $\mu\text{M}$  (wykresy na Schemacie 57A i B)?

*Schemat 58, str. 110:*

Co wyrażają wartości liczbowe na osi X wykresu na rysunku 58C? Jak należy rozumieć podpis tej osi:  $\log_c [\mu\text{M}]$ ?

*Str. 113:*

Czy wyniki pomiarów wykonywanych raz w tygodniu, podczas gdy w międzyczasie sensor przechowywany jest w „odpowiednich warunkach”, mogą być podstawą określenia jego czasu życia (*ang. lifetime*)? Jaka była temperatura podczas przechowywania, a jaka podczas pomiarów? Jak zmieniłby się ten czas, gdyby sensory byłyby używane do pomiarów kilka godzin dziennie?

*Str. 124 i 126:*

- drugie zdanie od dołu na str. 126, cytując: „*Analiza elektrochemiczna próbki farmaceutycznej wykazała bardzo dobrą wartość odzysku w wysokości 2,43% .....*”. Trudno byłoby taki wynik uznać za potwierdzenie skuteczności metody analitycznej.

Podobny błąd autorka popełniła na końcu drugiego akapitu przepisując wartości RSD a nie odzysku z tabeli 8 i 12.

Doktorantka nie ustrzegła się też stosowania kalki z języka angielskiego i skrótów myślowych, co w wielu wypadkach wypacza znaczenie używanych terminów. Przykładowo:

- „..... względem elektrody odniesienia nasyconej 4M KCl.” pojawia się wielokrotnie w tekście;
- „Biosensory jako interdyscyplinarne urządzenia analityczne”;
- „Polimery (lub związki) półprzewodzące”;
- „...wzrosło zapotrzebowanie na inżynierskie technologie wykrywania glukozy, ..”;
- „Konstrukcja **opierała się na wielosciennych nanorurkach....**”;
- „kontakcie.....poprzez parowanie zasad analogowych,...”;
- „Biosensory to potężne narzędzia diagnostyczne,.....”;
- „... liniowa krzywa kalibracji”;
- „... pik utlenienia H<sub>2</sub>Q praktycznie znika na zmodyfikowanej elektrodzie,....”;
- „... analiza żywotności zbudowanego systemu.”.

Uważam jednak, że mgr inż. Kamila Spychalska podjęła się trudnych i czasochłonnych zadań badawczych i dobrze się z nich wywiązała. Doktorantka przedstawiła wartościowe wyniki, wnoszące nowe informacje poszerzające wiedzę zarówno w odniesieniu do konstrukcji biosensorów z bezpośrednim przeniesieniem elektronów, jak również zaproponowała rozwiązania prowadzące do uzyskania biosensorów o parametrach pracy wskazujących na potencjalne możliwość ich praktycznego zastosowania.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że przedstawione w dysertacji wyniki zostały już częściowo opublikowane w formie 2 artykułów i patentu, w których doktorantka jest pierwszym autorem. Co istotne, prace te ukazały się w recenzowanych czasopismach (RSC Advances o IF: 3,36 oraz Journal of Electrochemical Science o IF: 1,765). Ponadto, doktorantka jest także współautorem 7 innych publikacji, 2 patentów i 4 zgłoszeń patentowych i posiada bogaty dorobek konferencyjny obejmujący udział w 14 wystąpieniach na konferencjach (głównie polskich). Aktywnie uczestniczyła w życiu społeczności akademickiej. Jest laureatką kilku nagród i wyróżnień.

#### **Podsumowując:**

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca zawiera szereg bardzo wartościowych wyników i spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późniejszymi zmianami). Jednocześnie wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne w Politechnice Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie do publicznej obrony.

Z poważaniem,

