



Gliwice, 12.04.2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Sylwii Baluty

pt. „Wytwarzanie biosensorów warstwowych, modyfikowanych strukturami o charakterze półprzewodnikowym”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Joanny Cabaj, profesor Politechniki Wrocławskiej, dotyczy zaprojektowania, konstrukcji i testowania nowych, selektywnych biosensorów warstwowych, modyfikowanych strukturami o charakterze półprzewodnikowym, do oznaczania neuroprzekazników.

Praca doktorska mgr inż. Sylwii Baluty porusza bardzo ważne i aktualne zagadnienia, zarówno z punktu widzenia naukowego jak i praktycznego. Jednym z priorytetów w strategii skutecznego leczenia pacjentów i poprawy jakości ich życia, jest opracowanie szybkich, selektywnych i wiarygodnych metod diagnostycznych. W ten trend doskonale wpisuje się tematyka związana z projektowaniem i konstrukcją coraz to lepszych biosensorów. O istotności tej dziedziny badań świadczy ciągle rosnąca liczba publikacji i patentów. Celem wszystkich dążeń jest opracowanie jak najmniejszych, bardzo czułych, łatwych w obsłudze i przystępnych cenowo urządzeń, mających zastosowanie przede wszystkim w szybkim diagnozowaniu pacjentów, również na odległość. Coraz bardziej popularne stają się określenia *Lab-on-a-Chip* czy *Point-of-care testing*.

Rozprawa doktorska liczy 177 stron, jest napisana poprawnie, z zachowaniem prawidłowych proporcji poszczególnych rozdziałów. Należy podkreślić, że cytowanych jest aż 385 pozycji literaturowych, w dużej części opublikowanych w ostatnich 10 latach, co świadczy o bardzo dobrym rozeznanium w tematyce i przygotowaniu Doktorantki do podjęcia badań w tej dziedzinie. Szeroki zakres opisanych badań, udokumentowanych odpowiednimi wykresami, tabelami oraz analizą wyników i konkretnymi wnioskami, potwierdzają natomiast duży nakład pracy oraz umiejętności mgr inż. Sylwii Baluty. Należy podkreślić, że rozprawa jest interdyscyplinarna i obejmuje wiele obszarów chemii: elektrochemię, chemię analityczną, chemię polimerów oraz biochemię, ale także zawiera elementy optyki czy elektroniki. Można tu jeszcze dodać diagnostykę medyczną (bioczuJNIKI są dedykowane do oznaczania neuroprzekazników).

Na początku rozprawy, w rozdziale „Wprowadzenie i cele badawcze pracy”, Autorka opisała krótko duże znaczenie biosensorów, potwierdzone zakwalifikowaniem ich do priorytetowych technologii, mających kluczowy wpływ na rozwój gospodarczy kraju. Wskazała również, że brak jest



obecnie na rynku urządzeń mierzących szybko i w prosty sposób poziom neuroprzekaźników w płynach ustrojowych człowieka. Po krótkim wstępie Doktorantka przedstawiła najważniejsze założenia, zakres i cel pracy doktorskiej.

Następny rozdział „Przegląd literatury” (34 strony) zawiera najważniejsze informacje na temat typów, budowy i działania biosensorów, szczególnie enzymatycznych. Przedstawione zostały również dane dotyczące samych enzymów i metod ich immobilizacji. O ile dyskusja dotycząca biosensorów jest wyczerpująca, o tyle pewien niedosyt budzi krótkie i ogólne omówienie stosowanych enzymów, które są przecież kluczowym elementem opracowywanych układów. Przydałoby się trochę więcej informacji np. w postaci schematów, przedstawiających budowę miejsc aktywnych poszczególnych enzymów oraz mechanizmy katalizowanych przez nie reakcji. Autorka niektóre z tych zagadnień omawia później w rozdziale poświęconym dyskusji wyników. Część literaturowa obejmuje także omówienie typów i roli neuroprzekaźników w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu ludzkiego, a także możliwe zaburzenia związane ze zmianami ich stężenia. Ze względu na to, że analiza tych związków jest integralną częścią pracy, moim zdaniem trochę szerzej powinny być omówione, opisane już w literaturze, elektrochemiczne metody oznaczania neuroprzekaźników. Zdaję sobie jednak sprawę, że przy tak szerokim zakresie badań, nie wszystko można przedstawić szczegółowo, dlatego mimo drobnych uwag uważam, że przegląd literatury stanowi bardzo dobry wstęp do części badawczej.

W rozdziale „Metodyka badań” (17 stron) Doktorantka jeszcze raz wymieniła poszczególne etapy badań, po czym podała wykaz stosowanych odczynników oraz aparaturę i metodykę badań. Analizując poszczególne procedury, od przygotowania i modyfikacji elektrod wytypowanymi polimerami przewodzącymi lub grafenowymi kropkami kwantowymi, poprzez immobilizację enzymów, aż do konstrukcji kompletnych systemów biosensorów optycznych bądź elektrochemicznych, można łatwo stwierdzić jak szeroki był zakres prac badawczych przeprowadzonych przez Doktorantkę i jak wielu umiejętności wymagał.

Rozdział „Wyniki i dyskusja” (71 stron) zawiera wnikliwą analizę uzyskanych w kolejnych etapach rezultatów. Rozpoczyna go tabelaryczne zestawienie 15 zaprojektowanych systemów detekcyjnych. W kolejnych podrozdziałach omówione zostały wyniki badań nad otrzymaniem wybranych siedmiu biosensorów warstwowych. W pierwszej części, do otrzymania chemoczułych układów, Doktorantka zastosowała 3 pochodne krzemorganiczne zawierające sprzężone układy heteroaromatyczne oraz sprzężony układ zawierający pierścienie tiofenu i pirydyny, jednocześnie dobrze uzasadniając swój wybór. W wyniku polimeryzacji elektrochemicznej, otrzymała stabilne warstwy polimerowe na elektrodach platynowej, złotej oraz platynowej zatopionej w ceramice współwypalanej niskotemperaturowo (LTCC). Powierzchnie tak otrzymanych warstw polimerowych zostały dobrze scharakteryzowane (AFM, SEM), a ich stabilność potwierdzona za pomocą voltamperometrii cyklicznej. Na otrzymanych nośnikach adsorpcyjnie osadzony został jeden z enzymów: lakaza z *Cerrena unicolor*, peroksydaza chrzanowa lub tyrozynaza. Enzymy dodatkowo zostały zsięciowane aldehydem glutarowym. Kolejne badania dotyczyły zastosowania otrzymanych przez Doktorantkę grafenowych kropek kwantowych do konstrukcji bioczuJNIKÓW.

Poszczególne biosensory elektrochemiczne zostały przetestowane w analizie serotoniny, dopaminy i adrenaliny, z wykorzystaniem woltamperometrii cyklicznej, chronoamperometrii oraz woltamperometrii pulsowej różnicowej. Doktorantka otrzymała obiecujące wyniki, w postaci liniowych zależności natężenia prądu od stężenia badanego związku w stosunkowo szerokim zakresie, a granica wykrywalności analitu (LOD) była najczęściej niższa od wielu opisywanych w literaturze czujników. Jak Autorka słusznie zauważyła, w przypadku serotoniny i dopaminy wartości oznaczanych stężeń były jednak znacznie wyższe niż te występujące w osoczu zdrowych osób, ale mimo to otrzymane biosensory mogłyby być użyteczne w analizie tych związków u osób chorych, u których stężenie poszczególnych neuroprzekaźników znacznie wzrasta. Przydatność skonstruowanych czujników została także potwierdzona w analizie próbek zawierających mieszaninę wielu związków, mogących powodować zaburzenie prawidłowego odczytu, w tym w próbkach syntetycznego moczu. Doktorantka określiła zarówno indywidualny wpływ związków takich jak: kwas askorbinowy, kwas moczowy, cysteina, jak również ich mieszaniny. We wszystkich przypadkach otrzymała bardzo dobre wartości odzysku i udowodniła niewielki wpływ związków interferujących na oznaczenia dopaminy, serotoniny czy adrenaliny.

W kolejnych podrozdziałach przedstawione zostały wyniki uzyskane w badaniach biosensorów optycznych. Doktorantka sprawdziła najpierw możliwość wygaszania fluorescencji grafenowych kropek kwantowych przez polidopaminę (poli-DA) oraz udowodniła zależność intensywności fluorescencji od stężenia poli-DA, stosując przepływowy czujnik optyczny. Autorka określiła najbardziej korzystne warunki oznaczania dopaminy, badając wpływ takich czynników jak pH, natężenie przepływu czy substancje interferujące. Moim zdaniem dyskusja na temat mechanizmu polimeryzacji dopaminy byłaby znacznie bardziej czytelna, gdyby Doktorantka umieściła schematy reakcji zachodzących w badanych warunkach. W kolejnych badaniach określiła najbardziej korzystne warunki oznaczania adrenaliny metodą fluorescencyjną, gdzie wykorzystwała zdolność tego związku do tworzenia barwnego kompleksu z jonami żelaza(II) oraz wzbudzenie kompleksu odpowiednią diodą LED. Granica wykrywalności analitu była w tym przypadku dużo niższa niż w przypadku użycia biosensorów enzymatycznych.

W rozdziale „Wnioski” Autorka podsumowała najważniejsze rezultaty uzyskane w trakcie realizacji postawionego na początku celu oraz wnikliwie omówiła wynikające z nich wnioski. Istotne jest tutaj porównanie otrzymanych układów oraz wskazanie możliwości ich zastosowania. Doktorantka wskazała również szereg artykułów, gdzie opublikowała poszczególne wyniki. Pracę kończy krótkie, ogólne podsumowanie.

Strona merytoryczna pracy nie budzi zastrzeżeń, jednak przy tak obszernym dokumencie nieuniknione są pewne niedopatrzenia czy błędy edytorskie i językowe, które w niewielkim stopniu wpływają na moją ostateczną, wysoką ocenę pracy. Z obowiązku recenzenta podaję wybrane uwagi oraz nieścisłości, które zauważyłam podczas analizy rozprawy:

1. Ze względu na to, że większość omawianych wyników została już opublikowana, szkoda, że Autorka nie podała odnośników do tych artykułów w tekście, a szczególnie na schematach, tym

bardziej, że umieszczone w pracy doktorskiej schematy i rysunki często są identyczne z tymi w publikacjach. Są to wprawdzie publikacje w systemie *Open access* i takie działanie jest uprawnione, jednak mimo wszystko powinny być podane źródła.

2. Str.25. W pozycji literaturowej [77] nie znalazłam informacji o zastosowaniu grafenowych kropek kwantowych. Artykuł dotyczył zastosowania pochodnej dihydroksyfenoksazyny jako substratu peroksydazy chrzanowej, do oznaczania nadtlenu wodoru, uwalnianego przez aktywowane ludzkie leukocyty. Niezbyt poprawne jest więc zdanie: „Przykładem działania GQDs jako syntetycznego enzymu o właściwościach peroksydazy jest monitorowanie H_2O_2 uwalnianego przez ludzkie leukocyty, który w nadmiarze może prowadzić do uszkodzenia tkanek, przedstawiony przez Mohanty’ego i współpracowników [77]”.

3. Str.29. Ogólne stwierdzenie: „Dowodzono, że enzymy przechowywane w buforze wykazują aktywność katalityczną od 8 do 48 h, czas ich działania można natomiast wydłużyć poprzez unieruchomienie na podłożu stałym” nie do końca jest prawdziwe. Bez sprecyzowania jakich enzymów to dotyczy, w jakich buforach oraz podania konkretnych warunków takie stwierdzenie nie ma sensu.

4. Str. 56 i 66 Przydałby się bardziej dokładny opis metody oznaczania aktywności badanych enzymów (co dokładnie analizowano, jakie reakcje zachodziły). Określenie, że za jednostkę aktywności enzymu przyjęto zmianę absorbancji o 0,001/min niezbyt precyzyjnie oddaje to co rzeczywiście dzieje się w badanym układzie. To samo dotyczy opisu na str. 66.

5. Str. 74. Bardzo oszczędny jest opis procesu immobilizacji enzymów. Autorka podaje jedynie, że odpowiednie roztwory, zawierające enzymy (2 mg/mL) naniesiono kroplami na powierzchnię. W związku z tym mam pytanie: czy oznaczano ile enzymu rzeczywiście osadzono na powierzchni modyfikowanej elektrody? Czy badano jaka jest powtarzalność immobilizacji? W pracy nie ma informacji ile razy powtarzano eksperymenty i jakich metod statystycznych użyto w obliczeniach.

6. Str.100 – Niezbyt jasne jest zdanie: „Elektrochemiczne utlenianie związków fenolowych czy aminowych, jak w przypadku neuroprzekazników, jest sprzężone z jednorodnymi reakcjami chemicznymi”.

7. Str. 101 schemat 51 A – czy na pewno oznaczenia linii odpowiadają poszczególnym stężeniom dopaminy? Wydaje się być na odwrót.

8. Pod schematami często brakuje warunków, w jakich prowadzono eksperymenty oraz stężeń poszczególnych składników mieszanin reakcyjnych (np. str. 104, 111, 122; schematy 53, 58, 70).

9. str.119, schemat 68 – tytuł A: zgodnie z wykresem jest to raczej zależność intensywności fluorescencji od stężenia dopaminy, a nie odwrotnie.

10. str. 120. Brak warunków, w jakich oznaczano stężenie dopaminy przy użyciu czujnika optycznego z zewnętrzną elektrodą, na której osadzono lakazę. O ile konwencjonalna polimeryzacja dopaminy wymaga środowiska zasadowego (w pracy to bufor o pH 10), o tyle ta katalizowana lakazą nie może być prowadzona w takich warunkach, ze względu na aktywność enzymu (optimum pH 4,6-5,4). Taka informacja powinna więc być podana.

11. W rozdziale “Wnioski” (str. 145) podane są informacje na temat długoterminowej stabilności otrzymanych nośników w kolejnych cyklach reakcyjnych, jednak nie znalazłam opisu takich badań w omówieniu wyników.

Wybrane błędy, w tym edytorskie i skróty myślowe (nie wymagające komentarza Doktorantki):

- a. Str. 8. TBA-TFB tetrafluoroboran tetrabutylamonowy (w pracy jest: tetrabutylamonowy)
- b. Str. 22. Tabela 2: wiersz 2 – chyba chodziło o polianilinę a nie polialaninę; wiersz 4 raczej powinno być poli(3,4-etylenodioksytyfen); wiersz 5 – raczej to kopolimer trzech wymienionych monomerów; dodatkowo, według cytowanej w pracy literatury, jednym z monomerów był *N*-heptylo-3,6-bis(2-tiofeno)karbazol, więc podana w tabeli nazwa jest nieprecyzyjna.
- c. Str. 23. „...granica wykrywalności układu wynosiła 0,93 uM, pracę systemu badano w zakresie stężeń 2,0-60 μM” – brak informacji jakiego związku dotyczyły te dane (Autorka wspomniała wcześniej o pochodnych fenolowych, natomiast w cytowanym artykule dane te dotyczyły konkretnie hydrochinonu).
- d. Str. 28. Schemat 6. Dla struktur konkretnych enzymów wziętych z bazy PDB, powinno się podawać kod identyfikacyjny PDB.
- e. Str.31-32 rozdział 2.1.1.3.2. Informacje dotyczące immobilizacji są ogólne, niezbyt precyzyjne i trochę chaotyczne.
- f. Str. 35 A. alantoiny nie alaintoiny; B. nazwa fosforan (V) 2,2-dichlorowinyliu-dimetylu nieprawidłowa;
- g. str. 36. „...rozpuszczalny w wodzie sprzężony polimer na bazie szkieletu poli(fenyleneotynylenowego) otoczonego anionem grupy sulfonowej PPSEO₃„ – zgodnie ze wzorem podanym w artykule [163], polimer PPESO₃ zawiera w swojej strukturze grupy sulfopropoksyłowe, więc nie można powiedzieć, że jest otoczony anionami; także błąd w skrócie polimeru.
- h. Str 48. w tabeli 5 związek nr 11: w nazwie jest *N*-heksylo-, a we wzorze *N*-nonylo-
- i. Str. 53. – wytłumaczenie wyboru TBA-TFB niezbyt jasne – „TBA-TFB jest bardziej wrażliwy na efekty parowania jonów niż węglowodory, ze względu na wyższą elektroujemność tlenu nad węglem i w konsekwencji wyższy ładunek przenoszony przez dwa atomy tlenu w dianionie. Z tego powodu pochodne fenolu”.
- j. Str. 67. Schemat 21 - Zależność aktywności enzymu od pH dotyczy konkretnych warunków i substratów, należałoby je podać w opisie pod schematem.
- k. Str. 74. schemat 27: słabo widoczne oznaczenia
- l. Str. 73, 104 i 114 – błędy edytorskie: „Charakterystyka szorstkości powierzchni wyraźnie wskazuje na możliwość swobodnego osadzania się cząstek enzymu (może jego rozmiar tu warto podać)” – nie

podano rozmiar; "...oznaczano stężenia serotoniny nr i dopaminy nr w próbkach rzeczywistych..." oraz "...mechanizm wykrywania dopaminy nr..." – pewnie Autorka miała zamiar dodać odpowiednie numery.

m. Str.94 schemat 46 – trudno rozróżnić linie sygnałów odpowiadające poszczególnym stężeniom serotoniny.

n. Str.119. tekst i schemat 68 B; niefortunne określenia typu „prosta liniowości” czy „krzywa liniowa” na określenie prostej.

o. str. 127. Tytuł schematu 77 “Odpowiedź czujnika (intensywność fluorescencji) od czasu, wobec różnych zależności przygotowania barwnika” jest niezbyt precyzyjny.

p. Drobne błędy w spisie literatury, np. poz. 78 powinno być: Materials 2019, 12(13), 2189; poz. 127. Katz nie Kata; poz.222. powinno być Molecules, 2019, 24, 2259.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera wiele cennych wyników badań dotyczących konstrukcji nowych biosensorów warstwowych, zawierających podłoża o charakterze półprzewodnikowym, do oznaczania ważnych neuroprzekaźników. Doktorantka wykazała się dużymi umiejętnościami w wykorzystaniu i analizie danych literaturowych, planowaniu doświadczeń, ich realizacji oraz formułowaniu wniosków. Na podkreślenie zasługuje ilość opracowanych biosensorów warstwowych - elektrochemicznych i optycznych (15) oraz określenie aktywności i selektywności 7 z nich, w monitorowaniu wybranych neurotransmiterów. Świadczy to o ogromnym nakładzie pracy włożonej w realizację założonego na początku celu oraz o dojrzałości naukowej Doktorantki. Niezwykle imponujący jest dorobek naukowy mgr inż. Sylwii Baluty, na który składa się aż jedenaście publikacji z listy JCR, o łącznym IF 29,005 oraz pięć w czasopismach spoza listy filadelfijskiej (w tym 3 punktowane przez MNiSW; łącznie 80 punktów). Doktorantka jest również współautorką 5 patentów, 6 zgłoszeń patentowych oraz 1 monografii. Swoje wyniki Autorka prezentowała na 26 konferencjach (w tym 9 wystąpień). Doktorantka uzyskała również 2 granty na udział w konferencjach międzynarodowych i była recenzentką artykułów naukowych. Długa jest także lista uzyskanych przez Doktorantkę nagród i wyróżnień (14), w tym stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia w dziedzinie nauk chemicznych.

Uważam, że rozprawa doktorska pt. „Wytwarzanie biosensorów warstwowych, modyfikowanych strukturami o charakterze półprzewodnikowym” spełnia wszystkie wymogi merytoryczne i formalne określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, w związku z czym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne, Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Sylwii Baluty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie:

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy potwierdzoną tak licznymi publikacjami, patentami i zgłoszeniami patentowymi, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne, Politechniki Wrocławskiej z prośbą o wyróżnienie przedstawionej mi rozprawy



doktorskiej. Za duże osiągnięcie uważam opracowanie krok po kroku 7 nowych, obiecujących biosensorów warstwowych, zawierających polimery półprzewodzące, ich dokładną charakterystykę i zastosowanie w analizie neuroprzekaźników.

Dorota Gillner