



POLITECHNIKA WARSZAWSKA

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Dr hab. inż. Kamil Wojciechowski, prof. PW

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, tel/fax.: 22-234-5106, E-mail: kamil.wojciechowski@ch.pw.edu.pl

Warszawa 2016-09-12

Recenzja  
rozprawy doktorskiej mgr inż. Kamili Doroty Maleckiej

**" Opracowanie i charakterystyka elektrochemicznych genocujników przeznaczonych do wykrywania wirusa ptasiej grypy typu H5N1 "**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska "Opracowanie i charakterystyka elektrochemicznych genocujników przeznaczonych do wykrywania wirusa ptasiej grypy typu H5N1" autorstwa mgr Kamili Doroty Maleckiej wykonana została pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Radeckiego w Zakładzie Biosensorów Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN. Czynności przewodu doktorskiego p. Kamili Maleckiej odbywają się przed Radą Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku.

Autorka może poszczycić się znacznym dorobkiem publikacyjnym w postaci 7 artykułów z Listy Filadelfijskiej, z których 5 stanowi materiał przedstawiony w rozprawie, oraz 1 zgłoszenia patentowego. W dorobku Kandydatki znaleźć można artykuł w czołowym czasopiśmie analitycznym – *Analytical Chemistry*, wydawanym przez American Chemical Society, ale również artykuły w innych bardzo wysoko cenionych czasopismach, jak *Biosensors and Bioelectronics*, *Electroanalysis* czy *Sensors and Actuators B*. Należy tu również podkreślić zaangażowanie Autorki w inne prace naukowe prowadzone w zespołach Prof. H. Radeckiej i Prof. J. Radeckiego, np. dotyczące testów do wykrywania wirusa szarki, groźnej choroby śliw.

Recenzowana praca napisana została w języku polskim i składa się ze streszczenia, wykazu symboli i skrótów, 11 rozdziałów zawierających część literaturową i eksperymentalną oraz podsumowania i wniosków. Całość zamykają spisy ilustracji, tabel, publikacji Autorki oraz bibliografia. Praca liczy 170 stron, z czego 48 przypada na część literaturową, a 56 – na część eksperymentalną. Rozprawa jest bogato ilustrowana 58 rysunkami i 10 tabelami, co znacznie ułatwia jej odbiór. Od strony edycyjnej praca przygotowana jest starannie, pod względem językowym również należy ją ocenić dość wysoko, chociaż Autorka nie ustrzegła się błędów, o czym w dalszej części recenzji. W pracy znaleźć można niestety również przykłady nieprawidłowej interpunkcji.

Na wstępie należy jednak mocno podkreślić bardzo duże znaczenie badań prowadzonych przez mgr Kamilę Malecką, szczególnie w dobie intensywnych migracji ludności, które sprzyjają szybkiemu i niekontrolowanemu rozprzestrzenianiu się chorób takich jak ptasia grypa. Według niektórych badaczy, ryzyko zmutowania się wirusa do formy grożącej pandemią jest duże, o czym wspomina również sama

Autorka we wstępie do rozprawy. Opracowywanie nowych metod analitycznych pozwalających na oznaczanie takich analitów, jak bakterie czy wirusy jest zadaniem równie trudnym, co interesującym. Dlatego Autorce należą się wyrazy uznania za podjęcie tematyki opracowania testów do wykrywania właśnie wirusa ptasiej grypy.

Do najważniejszych moim zdaniem osiągnięć rozprawy zaliczyć należy opracowanie metody modyfikacji powierzchni elektrod złotych z wykorzystaniem reakcji typu „click” – nukleofilowego otwarcia pierścienia epoksydowego. Rozwiązanie to wydaje się być na tyle uniwersalne, że powinno pozwolić na dołączanie również innych sond ssDNA i należy mieć nadzieję, że tematyka ta będzie z powodzeniem dalej rozwijana w zespole prof. Radeckiego.

Z dwóch możliwych dróg podejścia do realizacji wybranego tematu rozprawy (tzn. od strony praktycznej lub od strony mechanistycznej), Kandydatka wybrała podejście praktyczne i skupiła się przede wszystkim na konstrukcji i testowaniu czujników. W tym kontekście wysoko należy ocenić osiągnięte przez nią rezultaty, w szczególności wykazanie, że nawet długie fragmenty DNA i RNA mogą generować sygnał analityczny przy użyciu zaproponowanych przez nią rozwiązań. Jak można wnioskować z Tabel 8-10, niewiele opisanych dotychczas rozwiązań zostało z sukcesem przetestowanych z wykorzystaniem tak dużych cząsteczek analitów jak opisane w niniejszej pracy. Również pod względem granicy wykrywalności przedstawione urządzenia okazały się lepsze od wielu opisanych dotychczas w literaturze.

Jednakże na obecnym etapie zaawansowania prac, ze względu na nieodwracalność działania opisywanych w pracy urządzeń analitycznych, wydaje mi się, że bardziej odpowiednie byłoby w tym przypadku określanie ich mianem „testów”. Ponadto, zarówno tytuł, jak i niektóre sformułowania (np. w streszczeniu) nieco „na wyrost” sugerują, że każdy z opisanych czujników „z powodzeniem nadaje się do wykrywania materiału genetycznego wirusa ptasiej grypy typu H5N1” (str. 5). Z całą pewnością wyniki badań mgr Kamili Maleckiej są bardzo obiecujące i zapewne przyczynią się do konstrukcji takich czujników. Jednak na obecnym etapie nie pokazano jeszcze ich użyteczności do wykrywania rzeczywistego wirusa, a jedynie „specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1”, jak zresztą pisze sama Autorka w podsumowaniu na stronie 126.

Część literaturowa pracy rozpoczyna się od przedstawienia informacji na temat aktualnego stanu wiedzy o metodach wykrywania wirusów ptasiej grypy (AIV). Przegląd ten jest bardzo ciekawy i ważny, ale moim zdaniem nieco zbyt zwięzły. Na 9 stronach udało się zawrzeć prawie wyłącznie informacje na temat zalet i wad stosowanych dotychczas metod wykrywania AIV. W rozprawie doktorskiej, której celem jest poszerzanie wiedzy na temat genoczujujących, spodziewałbym się bardziej pogłębionej analizy literatury. Szczególnie dotyczy to zagadnień związanych z podstawami teoretycznymi poszczególnych metod. W efekcie, po przeczytaniu rozdziału 2 czułem lekki niedosyt wiedzy rozbudzony opisami wielu nowatorskich koncepcji, których szczegółów mogłem się jedynie domyślać na podstawie rozwinięć ich akronimów. Nieco więcej informacji o charakterze mechanistycznym przedstawiono w rozdziale 3, poświęconym opisowi czujników działających wg mechanizmu kanału jonowego oraz zawierających warstwy redoks-aktywne. Przy okazji opisu mechanizmu działania czujników typu kanału jonowego w rozdziale 3, Autorka podała definicję obszaru międzyfazowego elektroda-analit oraz podwójnej warstwy elektrycznej. Moim zdaniem jednak, jak na pracę z obszaru voltamperometrii, opis ten jest zbyt uproszczony

i nie do końca poprawny. Po pierwsze, na stronie 54 Autorka pisze, że „obszar międzyfazowy może rozciągać się do miejsca, gdzie oddziaływania elektrostatyczne między ładunkami maleją liniowo ze wzrostem odległości”. Trudno zgodzić się z takim stwierdzeniem, ponieważ oddziaływania elektrostatyczne między ładunkami maleją zawsze w funkcji kwadratu odległości (wynika to z równania Coulomba). Można domniemywać, że być może Autorka miała na myśli miejsce gdzie potencjał elektryczny jest liniową funkcją odległości, ale i to stwierdzenie nie byłoby prawdą, ponieważ taka liniowa zależność jest w przybliżeniu spełniona jedynie w warstwie Sterna. Druga wątpliwość dotyczy niepoprawnego tłumaczenia terminu „*diffuse double layer*” jako „dyfuzyjna warstwa podwójna”. Cechą wyróżniającą tej warstwy jest „rozmycie”, a nie „dyfuzja”, stąd poprawne tłumaczenie brzmi „rozmyta warstwa podwójna”. Niestety wielu autorów podręczników powieli ten błąd, stąd pomyłkę Autorki należy przynajmniej częściowo usprawiedliwić.

W ostatniej części przeglądu literaturowego w wyczerpujący sposób opisano techniki pomiarowe stosowane w rozprawie. Rozdział ten stanowi płynne przejście od części literaturowej do części eksperymentalnej, którą Autorka rozpoczyna od podania spisu odczynników chemicznych, materiału biologicznego oraz aparatury wykorzystywanej w pracy. Warunki prowadzenia eksperymentów zostały przejrzyście opisane i uzasadnione. Jedyne moje pytanie do tej części pracy dotyczy powodu stosowania azydku sodu tylko w przypadku elektrod sitodrukowanych. Organizacja rozdziałów części eksperymentalnej wskazuje na zdolność Autorki do systematycznego opisu własnych badań w sposób uporządkowany. Jedyne drobne niedociągnięcie w liście stosowanych odczynników to brak informacji o czystości i stężeniu stosowanych odczynników (kwas siarkowy, woda amoniakalna). Drobna niespójność wkradła się również prawdopodobnie do opisu przygotowania roztworów: na stronie 75 mowa jest o użyciu wody „Milli-Q”, podczas gdy w rozdziale 4 (strona 70) Autorka wspomina o oczyszczaniu wody za pomocą systemów HLP smart 1000 i Simplicity 185, które wg mojej wiedzy nie doczyszczają wody aż do czystości „Milli-Q”.

Wyniki przedstawione w rozdziałach 9-11 są uporządkowane i opisane w sposób bardzo przejrzysty, według logicznego klucza. W zrozumieniu dość skomplikowanych dla nie-biochemika zagadnień komplementarności między sondą a analitem bardzo pomaga utrzymanie jednolitego kodowania kolorów linii na wykresach i na schemacie z rysunku 34. Ta dbałość Autorki o szczegóły prezentacji wyników ułatwia śledzenie dyskusji. Podkreślić również należy analityczne podejście do prowadzonych badań – wyniki prezentowane są z uwzględnieniem precyzji pomiarów. Dużą zaletą pracy jest również wykorzystanie komplementarnej względem voltamperometrii techniki, spektroskopii impedancyjnej. Końcowe rozdziały pracy poświęcone są porównaniu parametrów czujników opisanych w pracy z dostępnymi danymi literaturowymi. Jest to istotna, choć w wielu rozprawach pomijana część pracy, która pozwala skonfrontować wyniki kilkuletniej pracy z osiągnięciami innych badaczy. W przypadku osiągnięć Kandydatki, konfrontacja ta wypadła bardzo korzystnie.

Mimo wysokiej ogólnej oceny pracy, nie ze wszystkimi zawartymi w niej stwierdzeniami mogę się zgodzić. Najważniejsze zastrzeżenia zamieszczam w postaci listy poniżej:

- Zamieszczenie na początku pracy listy symboli i skrótów było dobrym pomysłem i bardzo ułatwia czytanie pracy. Byłoby to jednak jeszcze łatwiejsze, gdyby Autorka definiowała wprowadzane skróty również w tekście, a wielkości fizyczne podawane były z jednostkami (podobna uwaga dotyczy zresztą

również legend pod równaniami). Pomogłoby to wyjaśnić niektóre niejasności, np. dlaczego stopniowi pokrycia elektrody nadano symbol  $\Gamma$  zamiast zwyczajowego  $\theta$  i czy w związku z tym Autorka na pewno miała na myśli stopień pokrycia, a nie nadmiar powierzchniowy (oznaczany zwykle właśnie symbolem  $\Gamma$ ). Na podstawie legendy równania (3) ze strony 58 można wnioskować, że jednak chodzi o nadmiar powierzchniowy, w pracy mylnie nazwany „stopniem pokrycia”.

- Jednym z poważniejszych, moim zdaniem, błędów znalezionych w pracy jest mylne użycie terminu „czułość”, który Autorka stosuje w odniesieniu do granicy wykrywalności lub dolnej granicy oznaczalności. Według definicji czułością w dowolnej metodzie analitycznej określa się nachylenie krzywej kalibracji.
- W dyskusji wyników zamieszczonych w rozdziale 9 pojawia się sugestia, że przedłużanie procesu hybrydyzacji „może prowadzić do powstawania oddziaływań niespecyficznych pomiędzy sondą a analitem”. Nieścisłość tego sformułowania polega na tym, że oddziaływania nie powstają w wyniku przedłużającego się procesu hybrydyzacji (istnieją albo nie). W tym kontekście należałoby raczej mówić o powstawaniu wiązań lub po prostu o oddziaływaniu.
- O ile normalizacja wielkości prądu pikowego  $((I_n - I_0)/I_0)$  ma pewne uzasadnienie w postaci eliminowania różnic pomiędzy poszczególnymi egzemplarzami elektrod, to nie widzę istotnych korzyści z przedstawiania zmian potencjału pikowego w postaci znormalizowanej. Ponieważ w mianowniku wyrażenia na  $\Delta E$  [%] znajduje się wielkość względna, to porównywanie wartości  $\Delta E$  pomiędzy pomiarami, w których potencjał pikowy bez dodatku analitu był różny, jest niemożliwe. Czemu więc służy taka normalizacja ?
- Nie udało mi się znaleźć w pracy wyjaśnienia dlaczego niektóre zależności różnicy potencjałów oraz prądu wykazują zależność liniową od logarytmu stężenia (np. rys. 27), a inne, w węższym zakresie stężeń - są liniowe względem stężenia (np. rys. 30). Powstaje zatem pytanie, jakie zależności przewiduje mechanizm odpowiedzi czujników typu kanału jonowego – liniowe względem stężenia analitu, czy względem jego logarytmu ?
- Wyniki zaprezentowane w rozdziałach 9-11 są ogólnie spójne, jedyne wątpliwości budzi porównanie rysunków 55A i 56. Na podstawie wykresu zamieszczonego na rysunku 55A, względny (znormalizowany) spadek wartości prądu, według moich szacunków (korzystając z równania zamieszczonego na stronie 78) wynosi około 30%, podczas gdy z rysunku 56 oraz z tekstu zamieszczonego na stronie 121 wynika, że spadek ten wynosi  $72.2 \pm 4.3$  %.
- Na stronie 30 Autorka pisząc o konieczności utrzymywania dodatniego potencjału (+0.2 lub +0.5 V), nie podała względem jakiej elektrody odniesienia mierzona była różnica potencjałów.
- Do drobnych błędów merytorycznych zaliczyć należy również stwierdzenie ze strony 39, sugerujące że „znaczny sygnał tła powoduje obniżenie granicy wykrywalności” – w rzeczywistości jest odwrotnie.

Inne przykłady niefortunnych zwrotów to m.in.:

- „Sonda SH-ssDNA była bezpośrednio przymocowana do powierzchni elektrody złotej (...)” (strona 4)
- Przyjemność czytania pracy zmniejszają sformułowania żargonowe i skróty myślowe, typu : „Potencjał ten zwiększa stabilność sond, oddziałujących elektrostatycznie pomiędzy dodatnio naładowaną

powierzchnią węgla a ujemnie naładowanym hydrofilowym szkieletem cukrowo-fosforanowym” (strona 30). Na stronie 79 Autorka pisze z kolei, że „woltamperometria (...) była wykonywana w zakresie potencjałów (...)”. Podobny skrót myślowy pojawia się w odniesieniu do techniki EIS na stronie 80, a na stronie 82 i 83 przeczytać możemy wręcz, że „CV” lub „SWV” „była wykonywana w zakresie potencjałów (...)”. Inny przykład skrótu myślowego znaleźć można na stronie 39, gdzie Autorka pisze: „(...) nie tylko w oparciu o bezpośrednią elektrochemię KN”. Z kolei na stronie 61, czytamy „W rezultacie na krzywej woltamperometrycznej odwracalnego procesu dyfuzyjnego pojawiają się dwa piki (...)”. Prawdopodobnie Autorka pisząc o „odwracalnym procesie dyfuzyjnym” miała na myśli proces kontrolowany dyfuzją, a więc odwracalny z punktu widzenia procesów elektrodowych ?

- Prawdopodobnie z powodu zbyt szybkiej korekty pozostawiono w pracy trudne do zrozumienia zdania typu „Informacja chemiczna, o których mowa powyżej, może pochodzić z reakcji chemicznej element rozpoznający – analit lub właściwości fizycznych badanego układu” (strona 20), czy „Obecnie w literaturze sposoby osadzania sond ssDNA na elektrodach są niezwykle zróżnicowane (...)” (strona 28). Podobnie na stronie 32 czytamy: „Drugi sposób opiera się na osadzeniu chemicznie zmodyfikowanej sondy DNA (głównie końca 5') łącznikiem z grupą –SH.” Podobne zastrzeżenia budzi styl zdania ze strony 42: „Bazuje on na mechanizmie podobnym do modelu „klucza i zamka” obecnego w wiązaniach pomiędzy ligandem a makrocząsteczką”. Podczas korekty ostatniego zdania ze strony 50 prawdopodobnie Autorka zapomniała usunąć zwrot „kilkunastu tysięcy” lub „ $10^4$ ”, ponieważ w obecnej formie zdanie to brzmi „(...) mogą one osiągać czułość wahającą się w granicach od 0,43 pg/ml do kilkunastu tysięcy  $10^4$  pg/ml.”
- Drobnie błędy językowe to m.in. niekompletne przetłumaczenie nazwy „Mikrobiopotentiostat” (strona 74), czy skróty myślowe typu „Podsumowanie genoczuJNIKÓW typu (...)”.
- Niepoprawne jest też stosowanie terminu „nanocząsteczki”, zamiast „nanocząstki”. Podobnie zamiast o „ujemnej polarnośći” (strona 44) powinno się mówić o ujemnym ładunku, zaś zamiast „srebrowa elektroda odniesienia” prawdopodobnie powinno być „chlorosrebrowa elektroda odniesienia”.
- Na liście skrótów kationowi  $\text{Co}(\text{Phen})_3^{3+}$  przypisano nazwę soli nadchloranowej, zamiast kationu (strona 11).
- Drobnym błędem wkradł się również do tekstu przed równaniem (5) na stronie 62, ponieważ wartość temperatury  $T_m$  powinna być podana w Kelvinach. Po wstawieniu wartości  $T_m=25$  °C, równanie nie będzie spełnione. Podobnie, być może przez prosty błąd literowy na stronie 109 błędnie podano wartość 80 pM zamiast 80 fM.
- Autorka dość często używa konstrukcji typu „czujnik oparty o (...)”, co nie jest błędem, ale jako kalka językowa powinna być w miarę możliwości unikana.

Waga wyżej opisanych drobnych (a w niektórych przypadkach dyskusyjnych) niedociągnięć nie umniejsza jednak mojej ogólnej wysokiej oceny przedstawionej mi do recenzji rozprawy. Opiniowana praca doktorska przedstawia dużą wartość pod względem poznawczym i praktycznym, tym samym wnosi elementy nowości w dziedzinie nauki chemicznej dyscyplinie chemia. Cała praca jest napisana w sposób

przystępny, zamieszczono w niej liczne tabele i zestawienia graficzne, porządkujące przedstawione informacje i znacznie ułatwiającej jej czytanie. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Kamili Doroty Maleckiej zatytułowana "Opracowanie i charakterystyka elektrochemicznych genoczuJNIKÓW przeznaczonych do wykrywania wirusa ptasiej grypy typu H5N1" spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65/2003 poz. 595). Wobec powyższego wnioskuję do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Kamili Doroty Maleckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

