

Kraków, dn. 23.05.2022r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pawła Falkowskiego pt.  
„Badania wpływu architektury i budowy chipa na wybrane parametry  
analizy metod wykorzystujących biosensory SPRI”**

Recenzowana praca doktorska została wykonana w Pracowni Bioanalizy Katedry Chemii Fizycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku, pod kierunkiem dr hab. Ewy Gorodkiewicz, prof. UwB jako promotora. Zespół, w którym Doktorant realizował badania naukowe i przygotował dysertację to dobrze rozpoznawalna i ceniona w świecie grupa badawcza zajmująca się m.in. projektowaniem i wytwarzaniem innowacyjnych bioczuJNIKÓW przeznaczonych do analizy biomarkerów metodą *Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów Imaging* (SPRI). Praca mgr Pawła Falkowskiego obejmuje dwa fundamentalne zadania badawcze, tj. zaprojektowanie i wykonanie bioczuJNIKA o jak najbardziej korzystnej strukturze typu *sandwich* i architekturze pól aktywnych jego podłoża, zwyczajowo nazywanego „chipem”, oraz jego charakterystykę analityczną przeprowadzoną na podstawie ilościowych oznaczeń enzymów zaliczanych do proteaz lizosomalnych, w materiałach biologicznych, pobranych za zgodą Komisji Bioetycznej, od dawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolécznictwa w Białymstoku oraz pacjentów chorych na endometriozę (*katepsyna B*), glejaka (*katepsyna D*) i raka jajnika (*katepsyna S*) z Białostockiego Centrum Onkologii i Biobanku Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Szczególnie istotne znaczenie dla podjętego kierunku badań odegrały wielowarstwowe struktury typu: szkło-chrom-srebro-złoto, na które nanoszono następnie maski polimerowe (blokującą i rozdzielającą) lub polipropylenową folię rozdzielającą. Na podstawie dostępnych źródeł literaturowych Doktorant dokonał także wyboru linkera i liganda (receptora), które w zoptymalizowanych przez siebie warunkach nanosił na przygotowane wcześniej podłoża (*chipy*) bioczuJNIKÓW. Odpowiednio niskie progi detekcji, bardzo wysoką czułość, selektywność, korzystny stosunek sygnału do szumu (S/N) i niski wpływ złożonej matrycy na rejestrowany sygnał Doktorant osiągnął optymalizując wszystkie etapy procesu, począwszy od modelowania, metodą różnic skończonych (FDTD) i wytworzenia podłoża (*chipa*), naniesienia linkera i liganda, technikę i parametry rejestracji sygnałów, przygotowania próbek, interpretację danych po walidację opracowanej metody. W mojej opinii, praca ma duży potencjał aplikacyjny dlatego doceniam fakt, że wszystkie proponowane procedury zostały rzetelnie udokumentowane i skomentowane. Uważam, że podjęta tematyka badawcza doskonale nawiązuje do aktualnych i przyszłościowych kierunków rozwoju współczesnej analizy instrumentalnej, chemii klinicznej i medycyny laboratoryjnej.

Dysertacja mgr Pawła Falkowskiego została przedstawiona w formie klasycznej monografii na 154 stronach, przy czym część literaturowa obejmuje 79 stron, a część eksperymentalna 71 stron, wraz z cytowanym piśmiennictwem, streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim oraz załączonym wykazem dorobku naukowego. Część literaturową poprzedza spis stosowanych skrótowców. Materiał przedstawiony w rozdziale, pod nie do końca moim zdaniem trafnym tytułem, *Przegląd literaturowy*, 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 nauki. Pragnę docenić zwięzłe i rzeczowe sformułowanie celu, zakresu i celowości podjętych badań. Uzyskane rezultaty Doktorant opisał w 3 rozdziałach, zatytułowanych: *Badania własne*, *Dyskusja wyników* i *Wnioski*. W pracy odnajduję 59 rysunków i 26 tabel, które uznaję za kluczowe dla uzasadnienia formułowanych hipotez, wygłaszanych opinii, a także wyciąganych wniosków. Co godne uwagi, na ich podstawie Doktorant roztoczył interesujące perspektywy dalszych badań. Bogata bibliografia obejmuje 133 prace, w tym nieliczne artykuły o znaczeniu historycznym i w przeważającej liczbie publikacje z ostatnich dwóch dekad. 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. Dysertację zwieńcza lista 5 artykułów, których Doktorant jest współautorem, opublikowanych w renomowanych specjalistycznych czasopismach, jak *Central European Journal of Chemistry* (2003), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (IF=3.935), *Sensors* (IF=3.576), *Biosensors* (IF=5.519, 2 prace), cytowanych 17-krotnie (wg bazy Scopus, 21.05.2022) oraz 1 zgłoszonego wniosku o udzielenie patentu krajowego (P438.864). Nieco skromniej wypada popularyzacja wyników badań własnych o czym świadczy udział tylko w dwóch konferencjach. Mimo wszystko, uważam, że jest to bardzo dobry dorobek jak na młodego Doktoranta.

Rozprawę doktorską mgr Pawła Falkowskiego oceniam bardzo wysoko, bowiem świadczy ona o wnikliwości badawczej Doktoranta oraz nabytej przez niego umiejętności samodzielnego rozwiązywania problemów metodologicznych i doświadczalnych. Z sukcesem zrealizował trudny i ambitny projekt badawczy, i co więcej, ze względu na jego wysokie walory poznawcze i aplikacyjne uważam, że praca doktorska jest wyjątkowo wartościowa.

#### *Znaczenie podjętej tematyki*

Współczesne techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR) to doskonałe narzędzia diagnostyczne stosowane z powodzeniem do identyfikacji i analizy ilościowej na poziomie nano-, piko- a nawet femtomolowym biomarkerów wielu chorób cywilizacyjnych, jak np. choroby układu krążenia, choroby nowotworowe, choroby neurodegeneracyjne czy choroby zakaźne, wywołane np. koronawirusem SARS-CoV-2. Czułość i niski poziom detekcji SPR umożliwiają wczesną diagnostykę wspomnianych chorób, skuteczną kontrolę tempa ich progresji i śledzenie postępów podjętej farmakoterapii. Techniki SPR wymagają jednak użycia specyficznych biosensorów. Stąd przeważająca liczba aktualnych doniesień literaturowych dotyczy ich konstrukcji, parametryzacji i kosztochłonności produkcji. W tym kontekście badania Pana mgr Pawła Falkowskiego należy uznać za oryginalne, inspirujące i dobrze wpisane w aktualne kierunki rozwoju bioanalitiky medycznej.

### *Osiągnięcia pracy*

Oceniając osiągnięcia naukowe mgr Pawła Falkowskiego uznaję, iż przedłożona monografia oraz dołączone do niej artykuły naukowe i zgłoszony patent są rezultatem konsekwentnej realizacji dobrze zaplanowanego i bardzo ważnego z punktu widzenia współczesnej diagnostyki medycznej zadania badawczego. Jako osiągnięcia o charakterze nowatorskim i mające istotne znaczenie dla rozwoju podjętej tematyki badawczej należy uznać:

- 1) Zaprojektowanie i wykonanie oryginalnego podłoża (*chipa*) o wyjątkowo korzystnej strukturze warstwowej typu *sandwich*: szkło-chrom-srebro-złoto, na które osadzano trwale linker i ligand (receptor) otrzymując bioczuJNIKI o znacznie lepszych parametrach niż bioczuJNIKI wytwarzane na komercyjnych podłożach typu szkło-tytan-złoto.
- 2) Przedłożenie koncepcji i wykonanie podłoży bioczuJNIKÓW o architekturze opartej na jednowarstwowej masce polimeru i masce z samoprzylepnej folii polipropylenowej.
- 3) Dokonanie optymalizacji warunków nakładania filmów o określonej nanometrycznej grubości z chromu, srebra i złota na płytki szklane (BK7) techniką próżniowego osadzania z fazy gazowej (PVD), wraz z charakterystyką wytworzonych warstw metodą mikroskopii SEM i AFM.
- 4) Przeprowadzenie optymalizacji procesu nakładania warstw linkera i liganda (receptora) specyficznIE oddziałującego z analitem.
- 5) Wyznaczenie podstawowych parametrów analitycznych dla opracowanych bioczuJNIKÓW na przykładzie wysokoczułego oznaczania takich biomarkerów, jak katepsyny B, D i S techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji imaging (SPRI).
- 6) Dowiedzenie, istotności wpływu typu i metody nakładania maski na funkcjonalność i parametry bioczuJNIKÓW.
- 7) Zastosowanie opracowanych bioczuJNIKÓW do oznaczania katepsyny B, D i S w próbkach moczu i płynu otrzewnowego pobranych od zdrowych i chorych pacjentów.
- 8) Konsekwentne przestrzeganie zasad *zielonej chemii* i *zielonej chemii analitycznej* (GAC).

### *Ocena końcowa*

Praca doktorska Pana mgr Pawła Falkowskiego wnosi znaczny wkład do takich dziedzin nauki, jak chemia, biochemia, medycyna, diagnostyka laboratoryjna, a nawet farmakologia czy inżynieria materiałowa z racji podejmowanych z sukcesem prób funkcjonalizacji materiałów podłoża (*chipa*). Posiada także wiele walorów poznawczych, związanych z propozycją zastosowania innowacyjnych bioczuJNIKÓW w tak wyrafinowanej technice analizy jak SPRI. Jej aspekt praktyczny to opracowane i zwalidowane nowe procedury oznaczania proteaz lizosomalnych, tj. katepsyny B, D i S w próbkach materiałów pobranych od pacjentów chorych na endometriozę, glejaka i raka jajnika. Wysoko oceniam przygotowanie Doktoranta do prowadzenia zaawansowanych badań, ich rezultaty świadczą o Jego pracowitości, determinacji i umiejętności realizacji własnych zainteresowań, co nie zaskakuje, biorąc pod uwagę światową pozycję Promotora w tematyce bioczuJNIKÓW i markerów nowotworowych, i zapewne udzielone mu silne wsparcie merytoryczne.

*Uwagi i komentarze do pracy*

Dysertacja doktorska została napisana w języku polskim. Solidnym wsparciem dla czytelnika do zrozumienia treści pracy są zamieszczone w niej liczne kolorowe ilustracje z legendą i podpisami wyczerpująco objaśniającymi ich zawartość, i co ważne poprawnie cytowane w tekście. Należy zauważyć, że Doktorant wykonał rysunki i tabele z dużą starannością i dbałością o wszystkie szczegóły graficzne. Natomiast w kilku przypadkach można było użyć różnych kolorów dla zestawianych krzywych pomiarowych i wykresów kalibracji, co zdecydowanie ułatwiłoby ich rozróżnianie i interpretację (Rys. 49-54). W każdej pracy mogą się zdarzyć drobne błędy, niejasności czy niedociągnięcia, dlatego z recenzenckiego obowiązku wymieniam: „*złączami sieci krystalicznej*” (str. 13); „*długość zaniku pola*” (str. 16); „*gdy światło monochromatyczne jest oświetlane pod stałym kątem*” (str. 19); „*względem osi kąta padania*” (str. 21); „*przekracza rząd kilku kDa*” (str. 34); „*współczynnik załamania analitu*” (str. 43); „*cienkiej warstwy SPR*” (str. 48); „*popularną konstrukcją czujników jest chip*” (str. 49); „*metaliczną płytkę szklaną*” (str. 96); „*oznaczenie ilości biomarkerów*” (str. 97); „*chip zawierający roztwór aktywowanego liganda*” (str. 98); „*tworzy się plateau Langmuira*” (str. 110); „*posiadały pewną powtarzalność*” (str. 131). Ponadto, nazwy Podrozdziałów 3.1.4.2. i 3.1.4.3. zostały pomyłone; w komentarzu do Tabeli 23 należy poprawić katepsyna B na S; wzór (str. 125) ( $\Delta C_{\text{KatB(A-B)}}$ ) wymaga korekty, poprawny zapis to ( $\Delta C_{\text{Kat(A-B)}}$ ).

Z racji nałożonego na mnie obowiązku recenzenta, zgłaszam też kilka uwag do przemyślenia, prosząc jednocześnie Doktoranta aby w sposób merytoryczny ustosunkował się do nich w trakcie publicznej obrony swojej dysertacji doktorskiej:

- 1) Uważam, że objaśnienia symboli, w przypadku cytowanych równań, muszą uwzględniać także stosowną jednostkę, zgodną z układem jednostek miar SI.
- 2) Zgodnie z równaniem (12), w wyrażeniu (14) czułość powinna być zdefiniowana jako  $S[\text{RIU}/^\circ]$ .
- 3) Stwierdzenie „*analit zawierający biocząsteczkę*” (str. 29) nie jest w zgodne z ogólnie przyjętą nomenklaturą w chemii analitycznej, gdyż w tym przypadku analitem jest biocząsteczka.
- 4) Na stronie 35 Doktorant stwierdza „*Wraz z postępem technologii możliwa byłaby produkcja urządzeń mikroprzepływowych, czyli urządzeń typu lab-on-a-chip ...*”. Główny problem na jaki napotykają konstruktorzy tego typu mikrouządzeń to bardzo silne oddziaływania pomiędzy cząsteczkami badanego medium i ściankami urządzenia, w efekcie uogólnianie procesów zachodzących w świecie makro i przenoszenie ich do świata mikro jest poważnym wyzwaniem. Bardzo proszę Doktoranta aby wyraził swój pogląd w tej sprawie.
- 5) W Podrozdziale 3.1.7. (str. 36) podano informację: „*Obniżenie kosztów może zostać osiągnięte poprzez zastosowanie tańszych surowców takich jak miedź i srebro ...*” i dalej „*90% grubości warstwy metalicznej stanowi srebro, które jest metalem tańszym od złota. ... dlatego też zaproponowano dodatkowo cienką warstwę złota ...*” (str. 89). Koncepcja użycia tańszych materiałów intryguje mnie jako inżyniera-technologa. Czy aby proces PVD nakładania nanometrycznej grubości warstw nie jest z punktu widzenia zapotrzebowania na energię i czas procesu bardziej kosztochłonny niż zużywane złoto? Bardzo proszę Doktoranta o komentarz.

- 6) W Podrozdziale 3.2.1. (str. 37) podano informację: „Każdy sensor z punktu widzenia analizy musi być specyficzny i wysoce selektywny dla oznaczanego analitu, ...” Specyficzna odpowiedź czujnika to zarazem „idealna” selektywność, stąd błąd takiego sformułowania.
- 7) W Podrozdziale 3.2.2. (str. 37) podano informację: „ligand (zwany również w terminologii chemicznej receptorem” ...” Trudno się zgodzić z tak jednoznacznym stwierdzeniem.
- 8) Na Rys. 16 (str. 39) pominięto warstwy linkera i liganda (receptora). Czy aby słusznie?
- 9) W Podrozdziale 3.2.2.2. (str. 38) podano informację „Sterylność materiału bazowego ...” Czy szklane podłoże musi być sterylne czy tylko odpowiednio czyste?
- 10) W Podrozdziale 3.2.2.3. (str. 38) podano informację „... dobór materiałów przy konstruowaniu sensorów ... mogą być zastosowane w urządzeniach przenośnych, gdzie ich wielkość i ciężar odgrywają istotną rolę.” Wydaje się, że to nie bioczuJNIK, a złożony system SPRI ogranicza możliwości produkcji analizatorów przenośnych.
- 11) Legenda na Rys. 20, z opisu w tekście i analizy krzywych wynika, że grubość warstwy ITO narasta w odwrotnym kierunku.
- 12) Na rysunku 24b, błędnie opisano oś Y.
- 13) W Podrozdziale 3.2.2.5. (str. 60) podano informację „... osuszenie w strumieniu ultra czystego gazu obojętnego (...). Tak przygotowane podłoże może być przechowywane ... nawet do 3 miesięcy. [49]” Czy rzeczywiście do osuszania podłoża niezbędny jest gaz ultra czysty?
- 14) Podrozdział 4.7.1. (str. 104) „Katepsyna S  $0,01 - 3,50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ” Czym kierowano się ustalając badany zakres stężenia katepsyny S, skoro jej sygnał analityczny nie różni się od sygnałów katepsyny B i D?
- 15) Podrozdział 4.7.3. (str. 114) bez uzasadnienia, pod równaniem podano i opisano parametr „n”.
- 16) Podrozdział 4.7.4. (str. 119) w Tabeli 22 podano zakres odpowiedzi liniowej bioczuJNIKA odstępując od uwzględnienia LOQ.
- 17) Podrozdział 4.7.5. (str. 121) przytoczono informację „... osocze pobrane od osób zdrowych (grupa kontrolna palaczy).” Jakie znaczenie w tym przypadku miała informacja o palaczach?
- 18) Rozdział 6. (str. 136-137) podano informację: „opracowano 9 nowych wersji biosensorów” w pracy odnajduję tylko 3 nowe wersje, tj. o podłożu Ag/Au z jedno- i dwuwarstwową maską polimerową oraz maską foliową; „pełnej walidacji techniki oznaczania katepsyn B, D i S” niestety nie jest to pełna walidacja; w punkcie 7 podano błędne zakresy liniowości oznaczania katepsyn (patrz Tabele 21-23).

Reasumując, w odniesieniu do meritum pracy trudno sformułować jakiegokolwiek zastrzeżenia merytoryczne. Wszystkie sygnalizowane przeze mnie drobne błędy i uwagi należy uznać za jedynie niewielkie uchybienia, które w żaden sposób nie rzutują na moją bardzo wysoką ocenę. Uważam, że praca wnosi szereg nowych istotnych informacji do dziedziny zgłębianej wiedzy. Należy podkreślić, iż podjęta tematyka dotyczy bardzo trudnych i złożonych procesów bio- i fizykochemicznych, których interpretacja wymaga zarówno bogatego zaplecza badawczego jak i dobrze ugruntowanej wiedzy, doświadczenia oraz niewątpliwie pokory ze strony eksperymentatora. Przeprowadzone badania, podjęta dyskusja wyników, oraz logicznie sformułowane wnioski końcowe jednoznacznie dowodzą, że Doktorant zrealizował zamierzony cel i większość zadań szczegółowych.

**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 zakładane cele zostały zrealizowane. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa mgr Pawła Falkowskiego pt. „Badania wpływu architektury i budowy chipa na wybrane parametry analityczne metod wykorzystujących biosensory SPRI” **spełnia wszystkie wymagania odpowiednich przepisów prawnych i zwyczajowych stawianych pracom doktorskim i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie mgr Pawła Falkowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej**

Wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu w Białymstoku o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Pawła Falkowskiego. Wniosek o wyróżnienie uzasadniam wysokim poziomem prezentowanych w rozprawie badań naukowych, ich interdyscyplinarnym charakterem obejmującym zagadnienia chemii analitycznej, inżynierii materiałowej, biochemii, diagnostyki medycznej i analizy sygnałów, bardzo bogatym, wnikliwie zinterpretowanym materiałem doświadczalnym, a także znaczącym dorobkiem publikacyjnym i wdrożeniowym. 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. Pawła Falkowskiego. Pragnę także zwrócić uwagę na wysoki potencjał aplikacyjny prezentowanych w rozprawie badań i rozwiązań konstrukcyjnych dotyczących innowacyjnych bioczuJNIKÓW.

Kraków, 23.05.2022 r.

