

prof. dr hab. Renata Gadzala-Kopciuch
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalizy
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr. Pawła Falkowskiego
pt. *Badania wpływu architektury i budowy chipa
na wybrane parametry analityczne metod wykorzystujących biosensory SPRi*

wykonanej w Pracowni Bioanalizy
w Katedrze Chemii Fizycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku
pod kierunkiem Pani dr hab. Ewy Gorodkiewicz, prof. UwB

Wybór tematyki badawczej

Przedmiotem niniejszej recenzji jest praca doktorska Pana mgr. Pawła Falkowskiego pt. *Badania wpływu architektury i budowy chipa na wybrane parametry analityczne metod wykorzystujących biosensory SPRi*, w której przedstawione zostały wyniki badań związanych z opracowaniem nowej konstrukcji biosensora w metodach oznaczania markerów chorób nowotworowych, takich jak: rak jajnika i glejak, czy choroby jaką jest endometrioza. Tematyka tych badań jest ściśle powiązana z obszarem zainteresowań naukowych realizowanych w grupie badawczej Pani dr hab. Ewy Gorodkiewicz, prof. UwB w zakresie badań nad nowymi bioczuJNIkami do oznaczania wybranych związków o znaczeniu diagnostycznym z wykorzystaniem techniki powierzchniowego rezonansu plazmonowego w wersji *imaging* (SPRi). Nie ma wątpliwości, że tematyka podjęta przez Doktoranta jest aktualna o czym świadczą liczne publikacje dotyczące praktycznego zastosowania SPR jako czulej metody identyfikacji szerokiej gamy związków, zaś technika SPRi poszerza możliwości zastosowania do badań oddziaływań w różnych układach biologicznych zawierających białka, oligonukleotydy, oligosacharydy, lipidy czy komórki wirusów. To także, wspaniała alternatywna w odniesieniu do metod fluorescencyjnych, w których dodatkowo wykorzystuje się znaczniki, co znacząco wpływa na koszt jednostkowego pomiaru. Biosensory z detekcją SPRi, jakimi zainteresował się Doktorant, mają również możliwość analizy próbek wieloskładnikowych zawierających wielkocząsteczkowe związki chemiczne, co otwiera nowe perspektywy w szybkiej diagnostyce medycznej a w konsekwencji podejmowaniu decyzji o dalszym postępowaniu w leczeniu pacjenta. Biorąc pod uwagę powyższe należy uznać, że wybrana przez Pana mgr. Pawła Falkowskiego tematyka badań naukowych, która stała się podstawą jego rozprawy doktorskiej, jest aktualna o istotnym znaczeniu.

Ocena formalna i merytoryczna rozprawy

Recenzowana rozprawa posiada klasyczny układ czyli posiada wyodrębnianą część teoretyczną (*Przegląd literatury*) i eksperymentalną określoną przez Doktoranta jako *Badania własne, Dyskusję wyników i Wnioski*. Łącznie praca liczy 154 strony. Część literaturowa została podzielona na cztery podrozdziały obejmujące 72 strony, a wyniki części doświadczalnej to trzy kolejne rozdziały umieszczone na 54 stronach. Ponadto, Pan mgr Paweł Falkowski zamieścił na początku *Spis treści* i *Wykaz skrótów* wykorzystanych w rozprawie, zaś w części końcowej znaleźć można streszczenie w języku polskim i angielskim, spis literatury oraz dorobek naukowy. Rozprawa doktorska została opatrzona 59 rysunkami, 26 tabelami oraz 133 odnośnikami literaturowymi. Należy zaznaczyć, że materiał zawarty w dysertacji został częściowo opublikowany w trzech publikacjach eksperymentalnych (cytowane jako 84, 128, 129) oraz przeglądowej (*in Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*) w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Rozprawę doktorską rozpoczyna *Wstęp*, który jest bardzo ważny z punktu widzenia osadzenia pomysłu badawczego w wybranej dyscyplinie i sformułowanie problemu badawczego zwłaszcza, że z tytułu rozprawy trudno jest określić o jakich badaniach architektury chipa będzie mowa. Bardzo ogólnie omówiono tu zagadnienia związane z SPR uzasadniając uniwersalność, a zarazem selektywność i czułość tej techniki, chociażby w przypadku chorób nowotworowych, autoimmunologicznych, układu krążenia, itp.

Nie do końca mogę zgodzić się z Doktorantem, że kolejny rozdział trzeci *Przegląd literatury* został zatytułowany poprawnie, gdyż w pierwszym z podrozdziałów 3.1 opisano podstawy teoretyczne techniki powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR), które w zdecydowanej mierze są czysto wiedzą podstawową - książkową. Niemniej jednak jest to dobrze opracowane wprowadzenie do złożoności problemu badawczego. Kolejne trzy podrozdziały nawiązują tematyką do pierwszej części, dotyczą charakterystyki sensorów stosowanych w pomiarach techniką SPR, przegląd obecnie stosowanych urządzeń i przykłady zastosowań techniki SPR w diagnostyce oznaczeń substancji biologicznie czynnych. Przedstawione w sposób logiczny, kompletny i przejrzysty treści, wzbogacone licznymi rysunkami i schematami, stanowią interesującą lekturę w oparciu o aktualny stan wiedzy. Dobrze opracowywany materiał oparty został na obszernym przeglądzie oryginalnych prac badawczych i przeglądowych, które ukazały się w czasopismach naukowych. Zamieszczone w tych podrozdziałach treści dowodzą wiedzy Doktoranta oraz umiejętności studiowania i analizowania problemów badawczych na podstawie odpowiednio dobranego piśmiennictwa. Niewątpliwie, ta część rozprawy stanowi właściwe wprowadzenie do realizacji zaplanowanego celu badań i interpretacji otrzymanych wyników.

Wprowadzeniem do części eksperymentalnej jest cel badań, który Pan mgr Paweł Falkowski sformułował jasno i precyzyjnie, a dotyczył zbadania potencjalnych możliwości wprowadzenia do techniki SPRi nowych rozwiązań materiałowych (chip Ag-Au jako podstawa do biosensora). W tej części oprócz omówienia celu głównego pracy, który ściśle związany jest z jej tytułem, Doktorant podał cele szczegółowe stanowiące swoisty plan badawczy. Przegląd literatury oraz podsumowanie wyników badań uzyskanych przez innych badaczy jednoznacznie wskazują na celowość podjętej tematyki badawczej.

Kolejne podrozdziały rozprawy doktorskiej zawierają szczegółowy opis wykorzystanych odczynników i materiałów (rozdz. 4.2), charakterystykę zastosowanego układu badawczego (rozdz. 4.3), opis chipów wykorzystywanych do pomiaru (rozdz. 4.4) oraz procedurę wykonania chipa (rozdz. 4.5). W tym właśnie miejscu Doktorant opisał szczegółowo otrzymywanie nowego chipa srebro-złoto, który w dalszych badaniach wykorzystany został jako podstawa do biosensora. Pan mgr Paweł Falkowski zaproponował również nowe rozwiązania wpływające na architekturę chipa wytwarzając różne rozkłady warstw na powierzchni biosensora poprzez wykonanie dwuwarstwowej maski polimerowej obejmującą maskę blokującą i rozdzielającą, jednowarstwowej maski polimerowej zawierającej hydrofobową maskę rozdzielającą oraz maski foliowej rozdzielającej. W kolejnym rozdziale Doktorant podjął się określenia przydatności skonstruowanych biosensorów do oznaczania wybranych katepsyn (B, D, S), które należą do grupy proteaz endolizosomalnych. W tym celu wyznaczył krzywe kalibracyjne i pozostałe parametry walidacyjne takie jak: precyzja, dokładność, zakres liniowości, granicę wykrywalności i oznaczalności. Dokonując porównania otrzymanych wyników z walidacji opracowanej techniki z wykorzystaniem poszczególnych chipów, Pan mgr Paweł Falkowski potwierdził, że najlepsze parametry analityczne uzyskał dla metody opartej na chipie Ag/Au z nadrukowaną jedną warstwą maski polimerowej. Dalsze badania wykazały, że ten właśnie biosensor został wykorzystany do oznaczania wybranych enzymów (katepsyn B, D, S) w próbkach biologicznych (osocze, płyn otrzewnowy) pacjentów z endometriozą, glejakiem i rakiem jajnika. Uzyskane wyniki potwierdziły założenia Doktoranta, że chip Ag/Au jest alternatywnym materiałem do obecnie stosowanego, komercyjnego chipu Au i może być zastosowany do oznaczania potencjalnych markerów chorób nowotworowych.

Rozdział piąty zatytułowany *Dyskusja wyników* powinien być połączony z poprzedzającymi podrozdziałami, gdzie zostały umieszczone wyniki badań. Nie tylko zmusza to czytającego do sięgania wstecz, ale zawiera bardzo ogólnikowe sformułowania (strona od 131-133; np. szereg parametrów, łagodnym plateau, pewną powtarzalność, użyteczne zakresy liniowe, pewna systematyczność, itp.), co znacząco utrudnia zrozumienie.

Do najważniejszych osiągnięć Doktoranta uzyskanych w trakcie realizacji zarysowanych powyżej zadań badawczych składających się na recenzowaną dysertację należy zaliczyć:

- otrzymanie nowego rodzaju podstawy biosensora z jednowarstwową maską polimerową zastosowanego w technice SPRI, który z powodzeniem może być zastosowany do próbek biologicznych,
- aplikacyjność skonstruowanego układu do oznaczania wybranych enzymów w próbkach biologicznych z wysoką precyzją, selektywnością i czułością.

Część z wyników umieszczonych w pracy, jak już wspomniano powyżej, została już opublikowana, a więc poddana wnikliwej ocenie przez specjalistów. Z obowiązków jednak recenzenta wymienię kilka punktów, które posłużą do dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej.

- Na str. 42, rysunek 18 (*Przegląd literaturowy*) i str. 91 rysunek 39 (*Badania własne*) – to te same zdjęcia ze skaningowego mikroskopu elektronowego? Jeżeli są to wyniki badań Doktoranta, to dlaczego podana jest literatura [62] (Lee i in., *Anal. Chem.*, 2006). Natomiast można je również znaleźć na rysunku 3 i 4 w artykule *Sensors* (21, 2021, 4348), gdzie Doktorant jest współautorem.
- W rozdziale *Wyniki badań* zabrakło mi pełnej charakterystyki wszystkich otrzymanych materiałów. Stąd też moje pytanie czy mikroskopię sił atomowych i skaningowej mikroskopii elektronowej wykorzystano tylko do chipów srebro-złoto? Co w przypadku pozostałych materiałów jakie otrzymano w wyniku realizacji badań?
- Str. 110, rysunek 54 – Z czego wynika zmniejszenie ilości punktów do czterech dla krzywych wzorcowych dla katepsyny S na chipie Ag/Au? Jakie są kryteria walidacji procedury analitycznej?
- Czy Doktorant mógłby przedstawić kierunki dalszych badań, które mogłyby stanowić kontynuację zadań badawczych ujętych w rozprawie doktorskiej?

Całość rozprawy napisania jest ogólnie ujmując poprawnie. Co prawda, Doktorant nie ustrzegł się drobnych błędów edytorskich, co jest rzeczą naturalną w tak obszernej wypowiedzi. Należy podkreślić, że rozprawa doktorska opatrzona jest licznymi, perfekcyjnie zaprojektowanymi pod względem technicznym rysunkami i schematami, które znacząco podnoszą walory pracy i przyczyniają się do przejrzystego wyjaśnienia czasami trudnych zagadnień.

Podsumowując projekt rozprawy został przemyślany, a jasno określone cele badawcze doprowadziły do osiągnięcia sukcesu przy dużym nakładzie pracy. Wnioski są poparte danymi eksperymentalnymi i odniesieniami do aktualnego stanu wiedzy

prezentowanej przez inne ośrodki naukowe w literaturze. Można więc stwierdzić, że uzyskane i opisane przez Doktoranta wyniki badań w ramach niniejszej rozprawy poszerzają wiedzę na temat nowych biosensorów i ich aplikacyjność ukierunkowaną na diagnostykę medyczną.

Wniosek końcowy

Po analizie przedłożonej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że wnosi ona cenny wkład w poszerzenie wiedzy w zakresie zaproponowania nowych materiałów stosowanych w technice powierzchniowego rezonansu plazmonowego i ich potencjalnego wykorzystania w diagnostyce chorób nowotworowych. Należy podkreślić, że opiniowana rozprawa doktorska zasługuje na uznanie, bowiem świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym, jak i biegłości warsztatowej Doktoranta. Tym samym uważam, że rozprawa doktorska spełnia ustawowe wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora, określone ustawą o stopniach i tytułach naukowych – uwzględnione w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669). Na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu w Białymstoku o nadanie Panu magistrowi Pawłowi Falkowskiemu stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdzając wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktoranta. Podjęta tematyka jest aktualna i ma potencjał aplikacyjny. Ponadto, wysoki poziom merytoryczny i potencjał praktyczny zaprojektowanego rozwiązania oraz opublikowanie wyników badań w czasopiśmie z listy *Journal Citation Reports*, pozwalają na wnioskowanie do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu w Białymstoku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr. Pawła Falkowskiego.

Renata Gadziś-Kopciuk

Toruń, dnia 19 maja 2022 r.