



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

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, tel.: 022-234-5657; fax: 022-234-5631, E-mail: ejmal@ch.pw.edu.pl

Warszawa 2017-09-09

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Edyty Matysiak-Brynda

pt: „*Elektroważymetryczna detekcja wybranych metaloprotein w roztworach i płynach ustrojowych*”

Rozprawa doktorska mgr Edyty Matysiak-Brynda pt: „*Elektroważymetryczna detekcja wybranych metaloprotein w roztworach i płynach ustrojowych*” wykonana została w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrood Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem dr hab. Anny Nowickiej. Praca ta jest poświęcona konstruowaniu elektrochemicznych bioczuJNIKÓW do wykrywania wybranych protein (hemoglobiny, ceruloplazminy transferryny i ferrytyny – paramagnetycznych metaloprotein) z wykorzystaniem elektrod o odpowiednio zmodyfikowanych powierzchniach, przystosowanych do analizy próbek naturalnych.

Biosensory są uznawane za korzystną alternatywę dla klasycznych metod biologicznych oznaczania ważnych bioanalitów, głównie ze względu na niski jednostkowy koszt analizy, możliwość miniaturyzacji oraz znacznie krótszy czas analizy. Opracowanie biosensorów o pożądanym parametrach pracy nie jest łatwe i wymaga połączenia wiedzy i doświadczenia badaczy reprezentujących różne dyscypliny. Warto tu nadmienić iż opublikowano prace dotyczące biosensorów na setki analitów. W rzeczywistości dostępne handlowo są bioczuJNIKI do oznaczania zaledwie kilkunastu różnych substancji, a najbardziej rozpowszechnionym i stosowanym (nie tylko w analizatorach klinicznych, ale także w warunkach domowych) jest sensor do oznaczania glukozy. Badania nad biosensoremami prowadzą renomowane uczelnie i instytucje badawcze na całym świecie i zainteresowanie nimi, jako narzędziami diagnostycznymi, wciąż dynamicznie rośnie o czym świadczy liczba publikacji na ten temat. Na przestrzeni ostatnich 20 lat liczba doniesień naukowych dotyczących biosensorów wzrosła niemalże 10-krotnie (zgodnie z danymi portalu pubmed.gov). Zgodnie z prognozą opracowaną przez Global Market Insights, Inc, przed 2024 r. rynek biosensorów ma być wart około 29,6 mld dolarów, podczas gdy jeszcze rok temu szacowano go na 14,8 mld dolarów. Powyższe argumenty są wystarczająco zachęcające aby podejmować prace badawcze i konstrukcyjne związane z

opracowaniem nowych i optymalizacją znanych biosensorów. Zatem niniejsza praca wpisuje się znakomicie w bieżące światowe trendy badawcze.

Strona redakcyjna

Niniejsza rozprawa ma klasyczny układ składa się z dwóch głównych części: *Części literaturowej* (rozdziały 1-8) oraz *Części eksperymentalnej* (rozdziały 9-13). Rozdział pierwszy stanowi wstęp, kolejny definiuje cel pracy, zaś w rozdziałach 3 – 8 zaprezentowany został przegląd literatury. Część eksperymentalną otwiera rozdział 9, będący istotnym fragmentem pracy, gdyż zawiera informacje dotyczące technik pomiarowych, aparatury, akcesoriów i odczynników wykorzystywanych w badaniach oraz metodyki pracy. Kolejne rozdziały (oznaczone jako 10-13) poświęcone są projektom badawczym realizowanym w ramach pracy doktorskiej. Przedstawiony do recenzji manuskrypt zamykają streszczenia w języku polskim (rozd. 14) i angielskim (rozd. 15), podsumowanie osiągnięć naukowych doktorantki (rozd. 16) oraz spis cytowanej literatury (rozd. 17). Całość została przedstawiona na 227 stronach tekstu ilustrowanego licznymi rysunkami (105) i tabelami (14).

W tym miejscu należy podkreślić niebywałą dbałość o szatę graficzną pracy oraz starannie wykonaną korektę tekstu – co należy do rzadkości i zasługuje na wyróżnienie.

Wartość merytoryczna i użytkowa

Doktorantka we *Wstępie* uzasadnia istotność wyboru metaloprotein, jako obiektu badań w ramach swojej pracy doktorskiej. W kolejnym rozdziale formułuje cel pracy, którym jest opracowanie konstrukcji elektrochemicznych czujników do detekcji paramagnetycznych metaloporfiryn występujących we krwi, a także nakreśla kolejne etapy badań, umożliwiające jego osiągnięcie.

Właściwy przegląd literatury jest podzielony na 5 części, które dotyczą wyselekcjonowanych przez autorkę zagadnień, istotnych ze względu na tematykę dysertacji. Ze względu na analizowany materiał doktorantka przedstawiła charakterystykę płynów ustrojowych jako złożonych próbek analitycznych, omówiła budowę i rolę w organizmie analizowanych metaloporfiryn oraz metody oznaczania białek w płynach fizjologicznych. W pozostałych rozdziałach koncentruje się na zagadnieniach związanych z poprawnością działania projektowanych sensorów, w tym: na odpowiedniej modyfikacji elektrod, sposobach wymiany elektronów w układzie białko/powierzchnia elektrody oraz transporcie depolaryzatorów do powierzchni elektrodowej w obecności pola magnetycznego. We wstępie do rozdziału 8 doktorantka wymienia bogaty zbiór technik pomiarowych jakie stosowała do oceny parametrów pracy czujników, a także oceny jakości uzyskiwanych warstw receptorowych i ich oddziaływań z analitem. Natomiast w kolejnych podrozdziałach (8.1-6) przedstawia podstawy działania i interpretacji uzyskanych danych wybranych technik pomiarowych (tj., voltametrii liniowa, cykliczna oraz pulsowa różnicowa, QCM, EIS, SECM, czy też UV-vis).

Przegląd literatury został wykonany rzetelnie i opisany w klarowny sposób, a jego solidną podbudowę stanowiło aż 411 pozycji literaturowych zarówno najnowszych publikacjach (włącznie do roku 2016) co podnosi walor aktualności stanu prac

badawczych w dziedzinie biosensorów, jak również tych istotnych z lat wcześniejszych (po rok 1936).

Przechodząc do części eksperymentalnej dysertacji czuję się w obowiązku nadmienić, że doktorantka podjęła trudnego zadania, jakim jest opracowanie sposobu detekcji białek z wykorzystaniem techniki elektrochemicznych. Jednakże dobre przygotowanie literaturowe pozwoliło jej na pokonanie największych problemów, jakimi są utrudnienia w wymianie elektronów pomiędzy centrami elektroaktywnymi białek a powierzchnią elektrody oraz podatność białek do denaturacji, a co za tym idzie niepożądanego blokowania przetwornika. Doktorantka jako obiekty swoich badań wybrała metaloproteiny posiadające właściwości paramagnetyczne i wykorzystując właśnie te właściwości zaproponowała innowacyjne podejście do konstrukcji biosensorów, polegające na wykorzystaniu nanocząstek magnetycznych oraz zewnętrznego pola magnetycznego.

Na tę część pracy składają się cztery rozdziały, a każdy z nich można uznać za odrębny projekt badawczy, dedykowany poszczególnym metaloproteinom.

W rozdziale 10, poświęconym detekcji hemoglobiny w próbkach krwi, doktorantka wykazała, że właściwie przeprowadzona procedura modyfikacji elektrody sprawia, iż obecne na jej powierzchni nanocząstki magnetyczne spełniły swoją rolę i intensyfikowały transport hemoglobiny do powierzchni elektrody, a co ważne gwarantowały orientację Hb sprzyjającą bezpośredniej wymianie elektronów. Efektem prac było opracowanie czujnika, który po przeprowadzeniu hemolizy, umożliwił oznaczanie hemoglobiny w próbkach krwi ludzkiej oraz szczurzej.

W kolejnym etapie badań mgr Edyta Matysiak-Brynda podjęła tematykę związaną z aktywnością katalityczną i elektrochemiczną ceruloplazminy – białka zawierającego centrum aktywne bogate w jony miedzi. Wyniki prac pozwoliły doktorantce na sformułowanie wniosku iż możliwe jest stworzenie warunków, do jednoczesnego oznaczanie tego białka i hemoglobiny bez konieczności dodatkowych etapów przygotowania próbki. Wniosek ten został zilustrowany wynikami badań krwi szczurzej. W tym przypadku również zaobserwowano korzystny wpływ ferromagnetycznych nanocząstek tworzących selektywny film na powierzchni elektrody na parametry analityczne opracowanego czujnika. Potwierdzono także znakomitą aktywność katalityczną ceruloplazminy względem jonów Fe(II) w obecności nanocząstek magnetycznych, jak i pola magnetycznego.

Tematyka dotycząca oznaczania wybranej paramagnetycznej metaloproteiny (transferyny) w obecności innych białek zawierających w swojej strukturze jony żelaza (tj., hemoglobina i ferrytyna) jest kontynuowana w rozdziale 12. Podobieństwo właściwości tych metaloprotein sprawiło, że modyfikacja elektrody pracującej nanocząstkami magnetycznymi okazała się rozwiązaniem niewystarczającym. W tym przypadku doktorantka zaproponowała rozwiązanie, w którym hemoglobina usuwana byłaby w wyniku odwirowania krwi, zaś do selektywnego oznaczania transferyny wykorzystana zostałaby elektroda zmodyfikowana przeciwciałem wiążącym transferynę. I w tym przypadku, starannie przeprowadzone prace wstępne polegające na wyborze odpowiedniego przeciwciała, opracowaniu procedury wytworzenia warstwy receptorowej, doborze techniki elektrochemicznej, ocenie analitycznej

charakterystyki wytworzonego sensora, pozwoliła doktorantce osiągnąć zamierzony cel. Ponownie, dzięki wykorzystaniu pola magnetycznego i ferromagnetycznego modyfikatora elektrody, możliwa stała się detekcja kolejnej metaloproteiny – transferryny – z użyciem biosensorów w próbkach krwi. Ten rozdział wzbogacony został wynikami badań pokazujących potencjał jaki niosą koniugaty otrzymywane w wyniku reakcji noncząstek magnetycznych (modyfikowanych powierzchniowo grupami karboksylowymi) i transferryny z myślą o celowanej terapii nowotworowej. Opisany został tu także istotny wpływ zastosowanego pola magnetycznego na uzyskiwaną strukturę konstruktów.

Reakcje powinowactwa wykorzystane zostały także przy opracowaniu konstrukcji biosensora przeznaczonego do oznaczania ferrytyny – występującej podobnie jak Cp i Tf w osoczu krwi (rozdział 13). Do warstwy receptorowej sensora, oprócz nanocząstek magnetycznych, wprowadzone zostało przeciwciało przeciw ferrytynie, a sygnał analityczny (podobnie jak poprzednio) generowany był w wyniku reakcji elektrochemicznej jonów żelaza obecnych w Ft. Ponownie, właściwą orientację ferrytyny kontrolowano dzięki zastosowaniu zewnętrznego źródła pola magnetycznego podczas reakcji ferrytyny i przeciwciała. Możliwości zaprojektowanego sensora, jako narzędzia analitycznego, zilustrowano wynikami oznaczania ferrytyny w króbcie krwi.

Recenzowana rozprawa doktorska zawiera wartościowe elementy nowości naukowej, a planowanie i przeprowadzenie badań oraz końcowe efekty pracy oceniam wysoko. Za najważniejsze elementy rozprawy uważam:

- nowatorskie treści naukowe odnoszące się do umiejętnego wykorzystania nanocząstek magnetycznych i zewnętrznego źródła pola magnetycznego w projektowaniu warstw receptorowych biosensorów przeznaczonych do detekcji wybranych metaloprotein charakteryzujących się właściwościami magnetycznymi;
- dojrzałość doktorantki w projektowaniu badań, w tym przemyślany dobór obiektów badań oraz narzędzi badawczych w celu potwierdzenia stawianych hipotez;
- zrozumienie konieczności łączenia wyników podstawowych prac badawczych z praktycznymi zastosowaniami, co zaowocowało opracowaniem konstrukcji biosensorów o dużym potencjale aplikacyjnym;

Mam kilka uwag/zagadnienia do wyjaśnienia:

- przykładowo pkt. 9.1., str.106, 107; użycie określenia: „.....*nanokapsuły węglowe zawierające żelazo*.....” jest chyba skrótem myślowym/slangiem laboratoryjnym, który nie przystoi tak dobrej pracy. Proszę o wyjaśnienie co się kryje za tym stwierdzeniem, o jakiej formie chemicznej mówimy;

- rozdz. 10; czy konieczność milionkrotnego rozcieńczenia próbki (HB) świadczy o właściwym doborze narzędzia analitycznego?

- str. 105, 107; nieodpowiedni nagłówki;

- str.123 , błąd w numerze tabeli w tekście (powinno być 6 nie 5),

- zastosowanie nanocząstek magnetycznych w metodach analitycznych, w tym również z wykorzystaniem biosensorów nie jest pomysłem nowym. Na czym polega

przewaga metodologii zastosowanej przez doktorantkę nad innymi opisanymi w literaturze?

Rozprawa doktorska mgr Edyty Matysiak-Brynda jest napisana przejrzysto, dobrym językiem naukowym. Począwszy od postawienia problemu analitycznego, poprzez dobór technik pomiarowych i zastosowanie odpowiednich metod analitycznych a skończywszy na obróbce i interpretacji wyników recenzowana praca może stanowić przykład godny naśladowania dla innych młodych adeptów nauki, zwłaszcza tych zajmujących się instrumentalnymi metodami analizy. Na wyróżnienie zasługuje również to, że doktorantka nie ograniczyła się jedynie do stworzenia bogatej listy odnośników literaturowych w rozdziale 17 *Bibliografia*, powołuje się na odpowiednie pozycje planując doświadczenia, jak również przy interpretacji otrzymanych wyników.

Czytając pracę nie natknęłam się na istotne uchybienia merytoryczne, które wymagałyby wyjaśnienia. Nie ma w tym nic dziwnego, skoro opisane w dysertacji wyniki (z wyjątkiem opisanych w rozdziale 13) zostały już wcześniej pozytywnie zweryfikowane przez recenzentów tak ważnych czasopism, jak: *Biosensors and Bioelectronics* (IF₂₀₁₇ = 7,78), *Acta Biomaterialia* (IF₂₀₁₇ = 6,32) czy też *Sensors&Actuators B* (IF₂₀₁₇ = 5,40).

Na osiągnięcia naukowe związane z ocenianą pracą doktorską składa się 5 artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych oraz 2 publikacje w materiałach pokonferencyjnych. Natomiast do dorobku mgr Edyty Matysiak-Brynda należy jeszcze dodać współautorstwo 4 oryginalnych artykułów (suma IF₂₀₁₇ = 17,7) opublikowanych w czasopismach JCR i 1 wysłanego do redakcji, a także 2 rozdziałów monograficznych. Sumaryczny współczynnik oddziaływania dla publikacji doktorantki wynosi $\sum IF_{2017} = 46,4$. Tak bogaty dorobek publikacyjny doktorantki został dostrzeżony i nagrodzony stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia w r. ak. 2016/17. Należy podkreślić, że niniejsza praca była realizowana w ramach grantu NCN, Preludium 9 nr 2015/17/N/ST4/03933.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Edyty Matysiak-Brynda spełnia zawiązanki warunki stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003 roku (wraz z późniejszymi poprawkami) podanymi w Ustawie "Prawo o szkolnictwie wyższym" i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie doktorantki do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Z poważaniem,



Warszawa, 09.09.2017

Wniosek o wyróżnienie

rozprawy mgr Edyty Matysiak-Brynda pt. „*Elektrogravimetryczna detekcja wybranych metaloprotein w roztworach i płynach ustrojowych*”.

Jako recenzent, chciałabym pokreślić iż bardzo wysoko oceniam przedłożoną mi do oceny pracę doktorską ze względu na nowatorskie treści naukowe, umiejętność zaprojektowania i sprawdzenia koncepcji naukowej, zrozumienie konieczności łączenia wyników podstawowych prac badawczych z praktycznymi zastosowaniami.

Na osiągnięcia naukowe związane z ocenianą pracą składa się 5 artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych, 2 publikacje w materiałach pokonferencyjnych oraz jeden manuskrypt w przygotowaniu. Do całkowitego dorobku mgr Edyty Matysiak-Brynda należy jeszcze dodać współautorstwo 4 oryginalnych artykułów (suma $IF_{2017} = 17,7$) opublikowanych w czasopismach JCR, a także 2 rozdziałów monograficznych. Sumaryczny współczynnik oddziaływania dla publikacji doktorantki wynosi $\sum IF_{2017} = 46,4$. Tak bogaty dorobek publikacyjny doktorantki został dostrzeżony i nagrodzony stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia w r. ak. 2016/17. Należy podkreślić, że niniejsza praca była realizowana w ramach grantu NCN, Preludium 9 nr 2015/17/N/ST4/03933.

W związku z powyższym wnioskuję o wyróżnienie rozprawy mgr Edyty Matysiak-Brynda pt. „*Elektrogravimetryczna detekcja wybranych metaloprotein w roztworach i płynach ustrojowych*”.

Z poważaniem,

