

Prof. dr hab. Sławomira Skrzypek  
Wydział Chemii UŁ  
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej  
Zakład Elektroanalizy i Elektrochemii  
ul. Tamka 12  
91-403 Łódź  
email:slawomira.skrzypek@chemia.uni.lodz.pl

## RECENZJA

### **rozprawy doktorskiej mgr Adriana Koterwy „Charakterystyka i modyfikacja materiałów elektrodowych w celu uzyskania platform biosensorycznych”**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr Adriana Koterwy została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Pana dr hab. prof. UG Pawła Lucjana Niedziałkowskiego. Recenzowana rozprawa dotyczy badań prowadzonych w kierunku opracowania i oceny stopnia modyfikacji materiałów elektrodowych do zastosowania w bioczuJNIkach elektrochemicznych służących do detekcji istotnych biomolekuł takich jak uropatogenne szczepy bakterii Escherichia coli (UPEC-57) czy hormon ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG). Elementem wiążącym zaprojektowane biosensory są nanosześciany złota (AuNCs).

Tematyka pracy doktorskiej realizowanej przez mgr Adriana Koterwę jest bardzo ważna i wpisuje się nurt zainteresowań wielu naukowców związanych głównie z obszarem chemii, medycyny, biotechnologii. Na przykładzie bioczuJNIka glukozy można stwierdzić, że istnieje ciągle zapotrzebowanie na nowe rozwiązania umożliwiające oznaczanie biomolekuł mające na celu obniżenie granicy wykrywalności, zwiększenie zakresu liniowości, zmniejszenie interferencji związanych z matrycą próbki, miniaturyzację, zmniejszenie kosztów itp. Biosensory są stosowane do wykrywania substancji chemicznych w organizmach żywych będących często markerami chorób, monitorowania funkcji organizmu. Wraz z rozwojem technologii coraz więcej nowych ulepszonych biosensorów można spotkać w laboratoriach. Biosensory są proste w użyciu i bardzo dokładne w przypadku wykrywania analitów. Ze względu na diagnostykę laboratoryjną, zgodnie z raportem Analytics Adventures Aplenty 24 Analysis wielkość rynku biosensorów wyceniono na 23,20 mld USD w 2023 r., a szacuje się, że do 2032 r. rynek ten będzie wart 45,99 mld USD. (<https://www.linkedin.com/pulse/rynek-biosensor%C3%B3w-rozmiar-2320-miliard%C3%B3w-ktz0f/>)

Podstawą rozprawy doktorskiej jest spójny cykl prac obejmujący 4 oryginalne publikacje naukowe. Artykuły zostały opublikowane w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się w bazie czasopism JCR, takich jak Langmuir (IF 3.9, 100 pkt MNiSW), Biosensors&Bioelectronics (IF 10.7, 200 pkt MNiSW), Electroanalysis (IF 2.7, 70 pkt MNiSW), Applied Surface Science (IF 6.7, 140 pkt MNiSW). Średni IF przypadający na jedną pracę jest bardzo wysoki i wynosi 6. Warto nadmienić, że Doktorant dodatkowo jest współautorem 4 kolejnych publikacji i 2 monografii.

Przedstawiona do recenzji dysertacja składa się z Wprowadzenia, zasadniczych Części literaturowej oraz eksperymentalnej, które poprzedza Cel pracy i Metodologia. Kolejne części pracy obejmują Podsumowanie i wnioski, Bibliografię obejmującą 131 pozycje literaturowe oraz spis Wystąpień konferencyjnych i innych aktywności. W dysertacji zamieszczone są artykuły będące podstawą rozprawy doktorskiej, a także oświadczenia współautorów.

**Część literaturowa** jest ściśle związana z tematyką prowadzonych badań eksperymentalnych i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w temat rozprawy. Autor w kompetentny sposób przedstawił biosensory elektrochemiczne, ich klasyfikację, a także zastosowanie. Ze względu na obiekty swoich badań scharakteryzował biosensory na bazie DNA, przeciwciał, na bazie peptydów i białek. W rozdziale 2 tej części dysertacji omówił materiały elektrodowe stosowane w badaniach biosensorycznych skupiając się na elektrodach wykorzystanych w jego pracy badawczej takich jak: elektrody z węgla szklanego, elektrody na bazie złota, elektroda z tlenku indu i cyny, a także elektrody drukowane w technologii 3D (zastosowane przez Doktoranta CP-PLA) jako nowe, ekonomiczne i biodegradowalne materiały elektrodowe. W rozdziale 3 Doktorant przedstawia ważne bioanalizy będące przedmiotem Jego badań: uropatogenne szczepy bakterii *Escherichia coli* (UPEC), hormon ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG). Reasumując uważam, że podane w części teoretycznej informacje są bardzo przydatne, umiejętnie przybliżają czytelnikowi problematykę rozprawy doktorskiej i stanowią dobre wprowadzenie do jej części eksperymentalnej. Można stwierdzić, że odpowiednio zebrana bibliografia dowodzi bardzo dobrej znajomości przedmiotu badań. Nie mam również zastrzeżeń do logiki i sposobu narracji wprowadzenia do rozprawy. Redakcja pracy jest bardzo staranna, część teoretyczna zawiera 12 rysunków i 6 tabel. Poglądowe, kolorowe rysunki zostały wykonane bardzo starannie, co ułatwia czytanie i zrozumienie pracy. Przydatny też jest

alfabetyczny Wykaz Symboli i skrótów stosowanych w pracy, przedstawiony na str. 11. Przed częścią eksperymentalną Autor zawarł cel pracy i zadania badawcze, a także metodologię pracy w której przedstawił stosowane w badaniach techniki badawcze. Należy zauważyć, że Doktorant posługuje się nowoczesnym warształem badawczym, stosuje różnorodne metody elektrochemiczne (woltamperometria cykliczna, elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna, skaningowa mikroskopia elektrochemiczna, dynamiczna elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna), spektroskopowe (spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X, spektroskopia UV-VIS) i inne takie jak skaningowa mikroskopia elektronowa, mikroskopia sił atomowych, dyfrakcja rentgenowska, analiza termograficzna. Ponadto badania eksperymentalne zostały uzupełnione o badania teoretyczne, w których wykorzystano teorie funkcyjonału gęstości.

Celem pracy doktorskiej było opracowanie nowych bioczuJNIKÓW na bazie wybranych elektrod z wykorzystaniem do modyfikacji nanosześciANÓW złota (AuNCs). Zasadniczym atutem tego nanomateriału (wśród kilku innych) jest jego zdolność do samoorganizacji na powierzchni modyfikowanego materiału elektrodowego. W Części eksperymentalnej Doktorant omawia krótko cykl prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, co jest częściowym odzwierciedleniem wykonanych badań i uzyskanych wyników w ramach w/w pracy. Chcąc zrealizować postawiony cel Doktorant rozpoczął swoje badania od zsyntezowania nanosześciANÓW złota jako modyfikatora elektrody z węgla szklISTEGO (GC), elektrody z tlenku cyny i indu (ITO) i elektrody złotej (Au). Zmodyfikowane podłoża scharakteryzował metodami XRD, UV-VIS, SEM, CV i EIS. Badania te miały na celu wyłonienie podłoża elektrodowego, które po modyfikacji za pomocą AuNCs stworzy platformę o najlepszym efekcie elektrokatalitycznym. Materiałem tym okazała się elektroda z węgla szklISTEGO. W kolejnym etapie pracy w/w podłoża elektrodowe zastosowano do otrzymania biosensora elektrochemicznego opartego na aptamerze DNA dołączonym do AuNCs. Uzyskana platforma biosensoryczna była wykorzystana do wykrywania uropatogennych szczepów bakterii *Escherichia coli* za pomocą polimerazy RNA. Jest to istotne, ponieważ uropatogenna *E. coli* jest trudnym do leczenia patogenem, który jest odpowiedzialny za większość przypadków szpitalnych zakażeń dróg moczowych. Proponowane podejście oferuje granicę wykrywalności wynoszącą 11,3 CFU/ml dla uropatogennego szczepu *E. coli* nr 57 (choć nie jest specyficzne w stosunku do innych badanych szczepów *E. coli* (BL21(DE3))). Wykorzystując nową technikę

pomiarową do wykrywania dużych biomolekuł przy użyciu modulowanych oddziaływań elektrostatycznych indukowanych przez polaryzację elektrody (DEIS) Doktorant opracował metodę detekcji w/w uropatogennego szczepu w czasie tylko 2 minut. W porównaniu z innymi metodami jest to wynik bardzo dobry (Tabela 1, publikacja nr.2).

Kolejnym osiągnięciem Doktoranta jest opracowanie biosensora na bazie modyfikowanej elektrody złotej za pomocą syntetycznego oligopeptydu PPLRINRHILTR do detekcji hormonu ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG) z wykorzystaniem techniki EIS. Zastosowanie w/w oligopeptydu wydaje się rozwiązaniem nie tylko ciekawszym, ale dużo tańszym niż stosowanie do modyfikacji przeciwciał. Uzyskana platforma biosensoryczna pozwala na wykrycie hCG w roztworze buforu fosforanowego w zakresie stężeń  $1 \times 10^{-12}$  -  $1 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> (Artykuł nr 3, Tabela S3), a także w ludzkiej surowicy na poziomie  $1 \times 10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup>.

Doktorant do cyklu swoich publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego włączył także pracę (chronologicznie pierwszą opublikowaną z omawianych czterech, (Artykuł nr 4, 2021r.), dotyczącą wydrukowania w technologii 3D elektrod z tworzywa kwasu polimlekowego (PLA) i wysokoprzewodzącego wypełniacza, sadzy (CB), rozproszonej w matrycy polimeru termoplastycznego. W trakcie prac eksperymentalnych porównano nowe aktywacje CB-PLA poprzez aktywację elektrochemiczną oraz aktywację z wykorzystaniem proteinazy K. Zaproponowano mechanizm aktywacji.

Ostatni (nie opublikowany w w/w artykule) etap badań dotyczył opracowania platformy biosensorycznej CB-PLA z wykorzystaniem AuNCs jako modyfikatora oraz przeciwciał monoklonalnych oddziaływających także z hormonem ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej. Doktorant uzyskał nawet lepsze wyniki niż te prezentowane w pracy dotyczącej modyfikacji elektrody złotej za pomocą syntetycznego oligopeptydu (LOD  $3 \times 10^{-15}$  mol L<sup>-1</sup>, zakres stężeń  $1 \times 10^{-12}$  -  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>)

Podsumowując część eksperymentalną w przypadku rozprawy doktorskiej opartej na cyklu prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, rola recenzenta jest w pewnym sensie ograniczona. Opublikowane manuskrypty zostały już zaopiniowane i przeanalizowane przez specjalistów z danej dziedziny, a ewentualne niedociągnięcia wskazane autorom i przez nich skorygowane. Recenzentowi pozostaje więc stwierdzenie, jaki był udział Autora w badaniach, ponieważ wszystkie prace zgłoszone do rozprawy są wieloautorskie.

Współautorzy publikacji wypowiedzieli się co do ich udziału w pisemnych oświadczeniach. Co prawda Doktorant nie załączył informacji o własnym udziale w pracach, jednak pierwsze miejsce na liście autorów w 3 z załączonych prac oraz drugie miejsce w pracy opublikowanej w *Langmuir* wskazują na istotny udział Doktoranta w przeprowadzonych badaniach i omawianych publikacjach.

Recenzentce trudno było określić, którą część pracy można zaliczyć do najciekawszych osiągnięć naukowych i praktycznych Pana mgr Adriana Koterwy. Wiele badań jakie przeprowadził w swojej pracy doktorskiej znalazło odzwierciedlenie w 4-publikacjach w tym w bardzo wysoko punktowanym czasopiśmie z listy filadelfijskiej *Biosensors and Bioelectronics* (If 2023 = 10.7) czy *Applied Surface Science* (If 2022 = 6.7). Publikacja wyników w tak dobrym czasopiśmie jak np. *Biosensors and Bioelectronics* potwierdza oryginalność rozwiązań w opracowanych, elektrochemicznych czujnikach. Doktorant jest ponadto współautorem 4 kolejnych publikacji i 2 rozdziałów w monografiach. Dodatkowo prezentował liczne referaty i postery na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Podsumowując część eksperymentalną chciałabym podkreślić, że przeprowadzone przez Doktoranta badania wymagały specjalistycznej i szerokiej wiedzy. Doktorantowi udało zakończyć swoją pracę niewątpliwymi osiągnięciami. Świadczy to o bardzo dobrych podstawach naukowych, wszechstronności i nowoczesnym podejściu Doktoranta do postawionego problemu naukowego.

Moja ocena pracy doktorskiej jest wysoka, po przeczytaniu pracy i artykułów pojawia się jednak kilka pytań odnośnie sposobu prezentacji czy dyskusji wyników, które z pewnością mogą być doprecyzowane w trakcie publicznej obrony:


- 1) Jak Doktorant definiuje określenie „detekcja”, a jak „oznaczenie” związku chemicznego? Tytuł artykułu „*An electrochemical biosensor for the determination of hormone Human Chorionic Gonadotropina*” mówi o oznaczeniu, ale już artykuł dotyczy *de facto* detekcji (tytuły podrozdziałów, np. 3.1, 3.3, 3.4, podpis pod Rys.1, podpis pod Tabelami S2, S3, S4).
- 2) Doktorant opracował metodę wykrywania uropatogennego szczepu bakterii EC opisaną w pracy zatytułowanej „*Rozróżnianie interakcji makromolekularnych w oparciu o impedymetryczny odcisk palca wspierany przez wielowymiarową analizę danych w celu szybkiego rozpoznawanie nie znakowanej Escherichia coli w ludzkim moczu*”. Podał

równocześnie, że nie jest to metoda specyficzna w stosunku do innych badanych szczepów. Co zdaniem Doktoranta należałoby jednak zastosować, aby taką selektywność rozróżniania szczepów uzyskać? Czy jest to w ogóle możliwe?

- 3) Nawiązując do powyższego pytania, czy opracowując w/w metodę wykrywania Doktorant przeprowadził statystyczną ocenę wyniku? Czy można także określić „zakres stężeń” bakterii (w jednostkach Colony Forming Unit - CFU) w jakim sensor może pracować w roztworach soli fizjologicznej i rzeczywistych próbkach ludzkiego moczu (biorąc pod uwagę zmiany powierzchni biosensora Rys. 4, publikacja 2)
- 4) Przygotowanie elektrochemicznego biosensora do detekcji ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (Artykuł nr 3) jest wieloetapowe i kończy się nakropieniem próbki badanej na powierzchnię zmodyfikowanej elektrody złotej. Czy Doktorant badał, jak długi jest czas życia takiego biosensora? Czy sensor był czyszczony między pomiarami metodą EIS? Tabela S3 przedstawia zestawienie różnych metod detekcji ludzkiej gonadotropiny, przy czym opracowana przez Doktoranta metoda pozwala na jej oznaczenie w zakresie liniowości od  $1 \times 10^{-12}$  do  $1 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>. Czy przeprowadzono i w tym wypadku statystyczną ocenę wyników, powtarzalność, odtwarzalność wyniku?
- 5) Na str. 54 pracy doktorskiej w podsumowaniu części eksperymentalnej Doktorant mówi o granicy oznaczalności (limit of quantification, LOQ) stosując symbol LOD (limit of detection) i podaje wartość raczej LOD patrząc na zakres oznaczalności. Proszę o zdefiniowanie LOD i LOQ.

Pomimo moich powyższych uwag, które mają oczywiście charakter dyskusyjny chciałabym wyrazić moje uznanie dla wkładu pracy Doktoranta, podkreślić wysokie znaczenie naukowe uzyskanych wyników. Przedstawioną pracę cechuje wysoki poziom naukowy, praca wykazuje oryginalność rozwiązań, posiada wyraźny element nowości naukowej i spełnia wszelkie wymagania określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 2018 r., z późniejszymi zmianami. Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Adriana Koterwy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zważywszy na szeroki zakres badań, ich wartość merytoryczną i potencjał aplikacyjny, oraz ogólny dorobek naukowy Doktoranta (o czym pisałam wcześniej), w tym kierowanie dwoma grantami w ramach IDUB (UGrants-start 2 i UGrants-start 3) oraz uczestnictwo w OPUS-19 wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Adriana Koterwy.

  
Sławomira Skrzypek