

dr hab. inż. Iwona Grabowska
Zakład Biosensorów
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
ul. Tuwima 10
10-748 Olsztyn
tel.: +48 89 523 46 54
fax.: +48 89 524 01 24
e-mail: i.grabowska@pan.olsztyn.pl

Olsztyn, 23.05.2023 r.

prof. dr hab. inż. Janusz Zachara
PRZEWODNICZĄCY
Rady Naukowej Dyscypliny
NAUKI CHEMICZNE

Szanowny Panie Profesorze,

Uprzejmie dziękuję za powierzenie mi recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Poliny Ivanovej pt. "Badania aktywności katalitycznej nanozymów monometalicznych i multimetalicznych oraz ich wykorzystanie w konstrukcji biotestów"

W załączeniu przesyłam ww. recenzję.

Z wyrazami szacunku



dr hab. inż. Iwona Grabowska
Zakład Biosensorów
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
ul. Tuwima 10
10-748 Olsztyn
tel.: +48 89 523 46 54
fax.: +48 89 524 01 24
e-mail: i.grabowska@pan.olsztyn.pl

Olsztyn, 23.05.2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Poliny Ivanovej

**pt. "Badania aktywności katalitycznej nanozymów monometalicznych
i multimetalicznych oraz ich wykorzystanie w konstrukcji biotestów"**

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Poliny Ivanovej zatytułowana "Badania aktywności katalitycznej nanozymów monometalicznych i multimetalicznych oraz ich wykorzystanie w konstrukcji biotestów" wykonana została w Katedrze Biotechnologii Medycznej, na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, pod kierunkiem Promotorów: dr hab. inż., prof. uczelni Mariusza Pietrzaka oraz prof. dr hab. Sławomira Sęka.

Głównym celem rozprawy było opracowanie metody syntezy nanocząsteczek w oparciu o kombinację różnych metali, w tym Au, Ru, Pt, Os i Pd, pozwalającej na otrzymanie stabilnych nanocząsteczek o właściwościach katalitycznych typu peroksydazy (zwanym nanozymami), zdolnych do tworzenia koniugatów z przeciwciałami (Abs). Ponadto, bimetaliczne i multimetaliczne nanozymy przetestowano w testach immunosorpcyjnych (NLISA) do detekcji modelowego antygeny, białka C-reaktywnego (CRP) na płytkach MaxiSorp™ oraz w otwartym bioreaktorze PES. Ostatecznie, stworzono prototypowy system modelowy do wykrywania antygenów, oparty na połączeniu modułu separacji magnetycznej i kaset mikroprzepływowych.

Zastosowanie nanomateriałów o aktywności typu enzymu w analityce, diagnostyce i biomedycynie stało się w ostatnich latach bardzo popularne wśród

naukowców. Materiały naśladujące naturalne enzymy, zwani nanozymami, stanowią stabilne, niedrogie i uniwersalne substytuty i w wielu przypadkach mogą zastąpić naturalne katalizatory. Najbardziej interesujące jest połączenie dwóch lub więcej metali, w wyniku czego otrzymywane są nanozymy charakteryzujące się nowo zaprojektowanymi właściwościami.

Innym, ważnym i bardzo aktualnym trendem badawczym jest poszukiwanie nowych, kosztowo efektywnych, czułych i skalowalnych metod analitycznych, które mogą znaleźć zastosowanie do wykrywania biomarkerów różnych chorób. Wiele dostępnych testów opartych jest na naturalnych enzymach, które są wykorzystywane do generowania sygnałów analitycznych. Oprócz zalet, istnieje wiele ograniczeń stosowania enzymów w biotestach, w tym złożoność procesu produkcji enzymu, jego oczyszczania i warunków przechowywania. Z tych powodów, poszukiwanie alternatyw dla naturalnych enzymów stało się bardzo powszechne.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w opisany powyżej trend badawczy. Jest przykładem prezentowanej po raz pierwszy oryginalnej koncepcji tworzenia wielofunkcyjnych nanocząstek poprzez połączenie tlenku żelaza z wyselekcjonowanym metalem szlachetnym, zdobieniem złotem oraz modyfikacją przeciwciałami. Część zbudowana z metali odpowiada za koniugację z bioreceptorem i proces generowania sygnału, natomiast paramagnetyczny tlenek żelaza wpływa na eliminację czynników zakłócających i stężenie próbek. Przedstawione w ramach rozprawy chipy mikroprzepływowe łączą w jednym etapie wstępny proces przygotowania próbki oraz analizę generowanego sygnału. Takie podejście skraca koszt i czas analizy. Dlatego też, test oparty na nanocząsteczkach umożliwia wykrywanie antygenu w miejscu opieki nad pacjentem.

Poniżej przedstawiam swoje uwagi odnośnie poprawności redakcyjnej rozprawy oraz jej wartości naukowej, merytorycznej i użytkowej.

Strona redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Poliny Ivanovej została napisana w języku angielskim. Praca rozpoczyna się streszczeniem w języku angielskim i polskim. Składa się z pięciu głównych rozdziałów, z których pierwszy stanowi przegląd literatury, drugi opis metod eksperymentalnych, trzeci wyniki i ich dyskusję, czwarty podsumowanie i wnioski, zaś ostatni prezentowany jest zbiór cytowanej literatury. W części literaturowej umieszczonych zostało ponad 300 pozycji

uwzględniających najnowsze doniesienia naukowe. Praca została również wyposażona w niezwykle użyteczny dla czytelnika „Wykaz używanych skrótów”. Warto podkreślić, że praca zawiera wiele kolorowych informacyjnych schematów.

Układ ocenianej pracy doktorskiej jest typowy dla tego typu publikacji. Szata graficzna została przygotowana w sposób staranny. Jednakże niektóre rysunki w sekcji „Wyniki” mogły być przygotowane staranniej, z zaznaczonymi osiami x, y, np. Rysunek 17 i inne. Można znaleźć również błędne opisy figur, np. na stronie 127 opisany jest Rysunek 17, a w tekście ten rysunek funkcjonuje jako Rysunek 19.

Są to drobne błędy redakcyjne, które nie zmniejszają wartości merytorycznej pracy.

Strona merytoryczna rozprawy

W części literaturowej Doktorantka omówiła zagadnienia dotyczące metod syntezy nanocząsteczek (NPs) zawierających metale, ich morfologię, stabilizację koloidalnych NPs, zastosowanie NPs wraz z mechanizmem działania mimetyków peroksydazy, metod wykrywania aktywności peroksydazopodobnej, zastosowanie mimetyków peroksydazy i przedstawiła strategię sprzęgania NPs z przeciwciałami. Ta część pracy jest dobrze napisana i wprowadza czytelnika w ogólny temat rozprawy. Pokazuje, że Kandydatka do stopnia doktora pogłębiła swoją wiedzę z zakresu literatury przedmiotu. Podkreśliła również motywację do podjętych badań. Zaskakujące było to, że główne i szczegółowe cele zostały dokładnie opisane w streszczeniu, a nie we wstępie.

W drugim rozdziale, Pani mgr inż. Polina Ivanova przedstawiła część doświadczalną obejmującą odczynniki chemiczne, aparaturę i stosowane metody, a następnie opisała wykonanie wielofunkcyjnego mikroprzepływowego systemu. Ta część zawiera opis wszystkich przeprowadzonych eksperymentów i metod, ale w niektórych miejscach jest to opisane bardzo ogólnikowo.

Wyniki oraz ich dyskusja zostały opisane w kolejnym rozdziale. Przedstawia on wyniki przeprowadzonych krok-po-kroku eksperymentów, zaczynając od syntezy i charakterystyki nanocząstek, ich zastosowanie w testach NLISA, projektowaniu biotestów opartych o koniugaty NPs/Abs wykonywanych na otwartych bioreaktorach PES. Moim zdaniem, najważniejszym osiągnięciem pracy jest opracowanie i wytworzenie urządzenia przeznaczonego do wykrywania CRP składającego się

z mikroprzepływowego kasetowego chipa kompatybilnego ze spektrofotometrem i modułem separacji magnetycznej.

Praca zawiera wiele cennych wyników eksperymentalnych. Jednakże niektóre elementy wymagają komentarzy i wyjaśnień, o które Kandydatka jest proszona podczas publicznej obrony pracy doktorskiej.

1. Czy zmiana absorbancji wyrażona w jednostce „hr⁻¹” jest często stosowana w podobnych pracach naukowych? Jak te wartości były wyznaczone?
2. Jakie było końcowe stężenie H₂O₂ i TMB w roztworze substratu? Czy stężenia tych odczynników były optymalizowane? Czy zastosowane stężenia roztworów tych odczynników są typowe dla podobnych systemów?
3. Strona 103, Figura 9A, co było przyczyną odbiegającego od innych wyniku uzyskanego dla próbek RuNPs rozcieńczonych x40, w porównaniu ze stopniowo zmniejszającą się wartością absorbancji uzyskanej dla próbek rozcieńczonych x20, x60, x80 i x100? Czy był to problem z prawidłowym rozcieńczeniem próbki?
4. Strona 110, na Figurze 12B brakuje jednego punktu kalibracyjnego przy stężeniu ok. logc=0, w porównaniu z danymi na Rysunku 12A. Czy brak tego punktu może mieć wpływ na współczynnik korelacji krzywej kalibracyjnej?
5. Przetestowano wpływ następujących interferentów na wielkość sygnału analitycznego: ludzka immunoglobulina G (IgG), albumina surowicy ludzkiej (HSA), troponina I (Tnl) oraz kompleks tromboplastyny (PTC). Czy przebadane zostały inne interferenty, które mogą być obecne w badanych próbkach biologicznych, takie jak glukoza, kwas askorbinowy lub aniony nieorganiczne? Czy mogą one wpływać na sygnał analityczny w tym układzie?
6. Jak jest opinia Doktorantki, czy inne nanocząsteczki tlenku żelaza o nieregularnych kształtach, takie jak np. „nanoflowers”, mogą znaleźć podobne zastosowanie jak przedstawione w tej rozprawie? Czy testowane „nanocubes” to najlepszy wybór?

Ocena końcowa

Podsumowując, wartość naukową pracy oceniam bardzo wysoko. Opisane wyniki są oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego. Poruszany temat jest bardzo rozwojowy i może być przedmiotem dalszych pogłębionych badań. Rozprawa

doktorska przedstawia wiedzę teoretyczną Kandydatki z zakresu nauk chemicznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Mgr inż. Polina Ivanova udowodniła swoje kompetencje związane z syntezą i charakterystyką stabilnych i aktywnych katalitycznie multimetalicznych nanocząstek. Dodatkowo, przeprowadziła testy immunoenzymatyczne oparte o TMB na wybranych zsyntetyzowanych nanocząsteczkach. I w końcu, brała udział w tworzeniu wielofunkcyjnych mikroprzepływowych kasetowych czipów. Eksperymenty przeprowadzone przez Kandydatkę w ramach projektu doktoranckiego mają charakter interdyscyplinarny. Metodologia badań obejmuje różne dziedziny chemii, biotechnologii i inżynierii materiałowej. Uzyskane wyniki zostały poddane krytycznej analizie i odpowiednio skomentowane. Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników wyciągnęła odpowiednie wnioski. Dodatkowo, dostrzegła możliwości dalszego rozwoju i doskonalenia, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej.

Zgodnie z przedłożoną dokumentacją, mgr inż. Polina Ivanova jest współautorką sześciu publikacji naukowych. Dwie prace naukowe są w trakcie recenzji. Jej dorobek naukowy obejmuje również współautorstwo w dwóch zgłoszeniach patentowych. Kolejny wniosek patentowy jest w toku. Doktorantka uczestniczyła w kilkunastu szkoleniach i dwóch projektach naukowych. Warto podkreślić, że Kandydatka brała udział w jedenastu krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych.

Biorąc pod uwagę całokształt przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr inż. Poliny Ivanovej pt. "Badania aktywności katalitycznej nanozymów monometalicznych i multimetalicznych oraz ich wykorzystanie w konstrukcji biotestów" stwierdzam, że spełnia ona wymogi art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie ocenianej rozprawy do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

