

dr hab. inż. Iwona Grabowska, prof. Instytutu
Zespół Bioelektroanalitik
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
ul. Trylińskiego 18
10-683 Olsztyn
tel.: +48 89 500 33 44
fax.: +48 89 500 32 00
e-mail: i.grabowska@pan.olsztyn.pl

Olsztyn, dnia 25 kwietnia 2025 roku

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Sylwii Pniewskiej (z domu Karoń)
pt. „Opracowanie modyfikowalnych platform biosensorowych
do wieloparametrowej immunodetekcji wybranych biomarkerów
związanych z infekcjami wirusowymi”**

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Sylwii Pniewskiej, zatytułowana „Opracowanie modyfikowalnych platform biosensorowych do wieloparametrowej immunodetekcji wybranych biomarkerów związanych z infekcjami wirusowymi”, wykonana została w Katedrze Biotechnologii Medycznej, Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, pod kierunkiem Pani Promotor prof. dr hab. inż. Elżbiety Malinowskiej oraz Pana Promotora pomocniczego dr inż. Marcina Drozda. Warto na wstępie podkreślić, że badania zostały wykonane w ramach grupy badawczej, która ma duże doświadczenie i sukcesy w opracowywaniu warstw receptorowych biosensorów powinowactwa do wykrywania biomarkerów istotnych z punktu widzenia diagnostyki medycznej.

Praca doktorska dotyczy projektowania nowoczesnych metod tworzenia i kontroli jakości białkowych warstw receptorowych, przeznaczonych do jednoczesnego wykrywania kilku biomarkerów infekcji wirusowych. W ramach realizacji tej pracy Doktorantka prowadziła badania nad usprawnieniem procesu unieruchamiania białek w produkcji immunotestów, między innymi z wykorzystaniem

metody rezonansu plazmonów powierzchniowych (Surface Plasmon Resonance, SPR).

W pracy poruszone zostały dwa niezwykle istotne aspekty. Pierwszy z nich dotyczy opracowywania zaawansowanych immunoplatform diagnostycznych, umożliwiających jednoczesne wykrywanie kilku biomarkerów. Ma to ogromne znaczenie, ponieważ równoczesna detekcja dwóch lub więcej biomarkerów wskazujących na obecność stanu chorobowego w ramach jednej analizy, pozwala na postawienie trafniejszej diagnozy, a jednocześnie skraca czas i obniża koszty całego procesu diagnostycznego. Co więcej, zaprojektowane immunotesty zostały wykorzystane do detekcji wybranych biomarkerów związanych z infekcjami wirusowymi. Jak pokazały wydarzenia ostatnich lat, pandemia COVID-19 doprowadziła nie tylko do znacznej liczby zgonów, lecz także do poważnych zakłóceń gospodarczych i społecznych na całym świecie. Dlatego też poszukiwanie nowoczesnych, szybkich, czułych i niezawodnych narzędzi diagnostycznych do wykrywania infekcji wirusowych jest obecnie zagadnieniem o kluczowym znaczeniu. Nie mam żadnych wątpliwości, że przedstawiona do oceny praca doktorska wpisuje się w niezwykle aktualny i interesujący trend badawczy, a jednocześnie stanowi odpowiedź na istotny problem społeczny.

Autorka pracy oceniła wpływ składu monowarstwy zawierającej sondy ssDNA oraz czystości i stechiometrii koniugatów DNA-białko na stabilność i gęstość powierzchniową warstw receptorowych. Dodatkowo Pani mgr inż. Sylwia Pniewska była zaangażowana w opracowanie nowatorskiej metody odwracalnego znakowania białek na powierzchni z wykorzystaniem barwników anionowych, kompatybilnej z SPRi w formie mikromacierzy, co umożliwiło mapowanie rozmieszczenia receptorów na powierzchni.

W kolejnej ze swoich prac udowodniła możliwość konstrukcji wieloparametrowych immunoplatform na podłożach z foli PET, z zastosowaniem reaktywnych kopolimerów, przeznaczonych do diagnostyki serologicznej COVID-19.

W kolejnych częściach recenzji przedstawię swoje uwagi odnośnie poprawności redakcyjnej rozprawy oraz jej wartości naukowej, merytorycznej i użytkowej.

Strona redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Sylwii Pniewskiej została napisana w języku polskim, w sposób zrozumiały, przystępny, staranny i logiczny. Składa się z czterech głównych rozdziałów, obejmujących: 1. wprowadzenie w problematykę badań, 2. cel i zakres pracy doktorskiej, 3. komentarz do cyklu artykułów naukowych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej oraz 4. podsumowanie.

Dodatkowo rozprawa zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz oraz kopie publikacji będących podstawą rozprawy, bibliografię, oświadczenia współautorów publikacji, wykaz dorobku naukowego Autorki oraz użyteczny „Wykaz skrótów”.

Bibliografia obejmuje 159 najnowszych pozycji literaturowych. Rysunki, schematy i tabele zostały przygotowane w sposób przejrzysty i obrazowy, co podnosi zarówno wartość merytoryczną, jak i estetyczną pracy.

Strona merytoryczna rozprawy

Wprowadzenie do tematyki badań w rozprawie stanowi solidne fundamenty dla zrozumienia znaczenia biomarkerów w diagnostyce zakażeń wirusowych, w tym zaawansowanych metod detekcji, takich jak multiplexing. Autorka wyczerpująco przedstawia różne typy biomarkerów wykorzystywanych w analizach – od antygenów, przez markery genetyczne, aż po serologiczne wskaźniki, umożliwiające identyfikację zakażeń na różnych poziomach.

W podsumowaniu tej części rozprawy Autorka podkreśla, że kluczowym elementem badań było opracowanie platform diagnostycznych, zawierających modelowe receptory, przeciwciała klasy IgG oraz białka antygenowe, w tym białko nukleokapsydu (N) wirusa SARS-CoV-2. Wybór tych konkretnych modelowych receptorów miał na celu pokazanie uniwersalności i wszechstronności zaprojektowanych systemów diagnostycznych, które mogą być potencjalnie stosowane w przypadku różnych patogenów i odpowiedzi immunologicznych. Dzięki temu możliwe jest jednoczesne wykrywanie wielu biomarkerów związanymi z samymi zakażeniami, jak i z reakcjami układu odpornościowego, co stawia tę metodę w czołówce nowoczesnych technologii diagnostycznych.

W kolejnym podrozdziale mgr inż. Sylwia Pniewska opisała mikromacierze białkowe jako przykład narzędzia umożliwiającego multipleksową immunodetekcję, a także omówiła odwracalne i nieodwracalne strategie unieruchamiania receptorów oraz nowo opracowane metody odwracalnego unieruchamiania receptorów. Z uwagi na fakt, że jakość wytworzonej warstwy receptorowej ma istotny wpływ na parametry użyteczne bioczuJNIKÓW i biotestów, Doktorantka w kolejnym kroku przedstawiła metody kontroli jakości białkowych warstw receptorowych.

Podsumowując ten rozdział, Pani mgr Pniewska stwierdziła, że wpisała się w ten nurt badań rozwijając kowalencyjną jednoetapową metodę dowiązania białek do warstwy reaktywnych kopolimerów. Aby wykazać zalety immobilizacji białek za pomocą kotwic DNA (DDI) w zastosowaniach mikromacierzowych, Autorka pracy opisała wpływ składu monowarstwy zawierającej kotwice ssDNA na stabilność i gęstość powierzchniową warstw receptorowych.

Rozdział 1, dotyczący wprowadzenia do tematyki badań, Pani mgr inż. Sylwia Pniewska zakończyła opisem oraz praktycznym porównaniem strategii detekcji, z uwzględnieniem strategii bezznacznikowych, oraz wykorzystujących znaczniki. Jako puentę tego rozdziału podkreśliła, że w swojej pracy doktorskiej zaproponowała dwojakie wykorzystanie technik bezznacznikowych (SPR oraz SPRI) - jako strategię detekcji w konstruowanych immunoczuJNIKACH, jak również narzędzie pozwalające na monitorowanie oddziaływań wybranych receptorów z badanymi analitami w czasie rzeczywistym.

Podsumowanie komentarza do rozdziału wprowadzającego do tematyki badań

Układ zaprezentowanych zagadnień w rozdziale wprowadzającym, uważam za bardzo trafny i logiczny. Każdy z podrozdziałów kończy się jasną konkluzją, wskazującą, dlaczego Doktorantka zdecydowała się na podjęcie danej tematyki badawczej oraz jakie elementy stanowiły nowość w kontekście istniejącej literatury przedmiotu a nadto, jaką lukę badawczą zamierzała wypełnić. Takie podejście umożliwiło płynne przejście do kolejnego rozdziału, w którym przedstawiono cel i zakres pracy doktorskiej. W odniesieniu do tego rozdziału nie zgłaszam żadnych

uwag - cel pracy został precyzyjnie sformułowany, a wyszczególnione zadania badawcze zostały konsekwentnie zrealizowane i stanowiły podstawę do opracowania cyklu czterech artykułów naukowych.

Na podstawie przedstawionego w rozdziale 3 komentarza do załączonych publikacji naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej stwierdzam, że wartość merytoryczna pracy jest bardzo wysoka. Uzyskane rezultaty badań obrazują oryginalne podejście do rozwiązania ważnego problemu o znaczeniu społecznym. Wyniki te zostały opublikowane w renomowanych, indeksowanych czasopismach naukowych, gdzie przeszły pozytywną ocenę niezależnych recenzentów powołanych przez edytorów tych czasopism.

Udział Pani mgr inż. Sylwii Pniewskiej w publikacjach naukowych związanych z tematyką rozprawy doktorskiej

Zgodnie z załączoną dokumentacją, Pani mgr inż. Sylwia Pniewska jest współautorką czterech publikacji naukowych bezpośrednio związanych z tematyką rozprawy doktorskiej. Wśród tych publikacji znajduje się jeden artykuł przeglądowy oraz trzy prace oryginalne. W przypadku trzech z nich, figuruje Ona jako pierwsza autorka, co świadczy o Jej wiodącym udziale w realizacji badań. Zakres prac wykonywanych przez Doktorantkę obejmował m.in. współtworzenie koncepcji badawczej, samodzielne przeprowadzenie większości eksperymentów, analizę, opracowywanie i interpretację uzyskanych wyników. Ponadto Pani Sylwia Pniewska przygotowała część rysunków do manuskryptów oraz była odpowiedzialna za przygotowanie ich pierwotnych wersji i korektę tekstu. Tak szeroki zakres zaangażowania potwierdza istotny wkład Doktorantki w powstały dorobek naukowy.

Warto podkreślić, że czwarta praca, tj. *Sensors*, 2024, 24 (23), 7766 stanowi owoc naukowej współpracy, którą Pani mgr inż. Sylwia Pniewska nawiązała z międzynarodowym zespołem badawczym podczas swojego stażu naukowego. Zespół ten odpowiadał za syntezę kopolimerów zawierających reaktywne grupy funkcyjne, które następnie posłużyły do funkcjonalizacji folii PET. Co istotne, współpraca ta była kontynuowana po powrocie Doktorantki do macierzystej jednostki.

Komentarz do cyklu publikacji naukowych mgr inż. Sylwii Pniewskiej, stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, zwięźle i precyzyjnie przedstawia otrzymane wyniki badań nad opracowywaniem nowatorskich immunoplatform do multipleksowej detekcji biomarkerów zakażeń wirusowych z wykorzystaniem SPRI oraz spektrofotometrii. Publikacje Autorki natomiast szczegółowo omawiają metodykę eksperymentalną, w tym projektowanie platform detekcyjnych i optymalizowanie platform detekcyjnych, a także ich zastosowanie w analizie próbek biologicznych. Zdecydowanie warto zapoznać się z tymi pracami, aby uzyskać pełny obraz zastosowanej technologii oraz wyników eksperymentalnych. Na podstawie lektury tych prac nasunęły mi się następujące pytania, które chciałabym zadać Pani Doktorantce w trakcie publicznej obrony rozprawy doktorskiej:

1. Jaka była motywacja użycia gotowego zestawu proFIRE® firmy Dynamic Biosensors GmbH do koniugacji białek receptorowych z kotwicami ssDNA? Jaką strukturę chemiczną miał zastosowany „crosslinker”? Jaki był dokładnie mechanizm tego procesu?
2. Dlaczego w pracy *Sensors & Actuators: B. Chemical* 421 (2024) 136512 przetestowane zostały akurat anionowe barwniki białkowe i na jakiej podstawie wybrano sześć barwników do wstępnej selekcji? Czy biorąc pod uwagę niespecyficzny charakter oddziaływań barwników, przedstawioną metodę należałoby kalibrować osobno dla danej pary receptor białkowy – barwnik?
3. Czy wg. Autorki, folie PET sfunkcjonalizowane reaktywnymi kopolimerami w roli podłoża testów immunoenzymatycznych mają realne szanse na zastosowanie ich w praktycznej diagnostyce laboratoryjnej? Czy Doktorantka widzi realne zagrożenia i wady zaproponowanych systemów? O ile wzrósłby koszt pojedynczej analizy próbki ludzkiej surowicy z zastosowaniem podłoży z folii PET modyfikowanych warstwą kopolimeru MCP-2 reaktywnego względem grup aminowych białek lub folii PET z reaktywnym kopolimerem Copoly Azide reaktywnych względem modyfikowanych DBCO sond ssDNA w porównaniu z klasycznymi

podłożami, które wykorzystują pasywną adsorpcję? Czy istnieje potrzeba kontynuacji obranego kierunku badawczego?

Udział Pani mgr inż. Sylwii Pniewskiej w publikacjach naukowych niezwiązanych z tematyką rozprawy doktorskiej oraz innych aktywnościach naukowych

Z załączonej dokumentacji wynika, że Pani mgr inż. Sylwia Pniewska jest współautorką dwóch dodatkowych artykułów naukowych, oprócz czterech będących podstawą rozprawy doktorskiej. Brała także udział w trzech projektach badawczych jako wykonawczyni. Warto jednak podkreślić, że w przypadku projektu pt. „Konstrukcja uniwersalnego, przenośnego urządzenia mikrofluidycznego działającego w formacie pasywnego przepływu do szybkiej immunodetekcji zakażeń wirusowych i monitorowania wybranych biomarkerów odpowiedzi immunologicznej” była jego wnioskodawczynią. Doktorantka pełniła nadto rolę opiekuna naukowego w pracach dyplomowych inżynierskich i magisterskich realizowanych w Katedrze Biotechnologii Medycznej, Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Warto również zauważyć, że Kandydatka brała udział w jedenastu krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Podczas jednej z nich, The 1st International Conference on AI Sensors and 10th International Symposium on Sensor Science w Singapurze przedstawiła prezentację ustną. Odebrała także trzymiesięczny staż naukowy w ramach programu Mobility i NAWA STER. Jest również laureatką II miejsca w konkursie MedTech – Athon – Inżynierowie dla Medycyny.

Ocena końcowa

Pani mgr inż. Sylwia Pniewska z sukcesem osiągnęła zaplanowane cele rozprawy doktorskiej i zrealizowała szczegółowe zadania badawcze. Autorka w swojej pracy współtworzyła oryginalne koncepcje badawcze, rozwiązywała problemy naukowe, niezwykle istotne z punktu widzenia społecznego. Ponadto wykazała się umiejętnościami samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, zaprezentowała ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki.

Uwzględniając całość zaprezentowanej rozprawy doktorskiej mgr inż. Sylwii Pniewskiej pt. „Opracowanie modyfikowalnych platform biosensorowych do wieloparametrowej immunodetekcji wybranych biomarkerów związanych z infekcjami wirusowymi” stwierdzam, że spełnia ona wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. 2024, poz. 1571 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie przedstawionej rozprawy do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z wyrazami szacunku

Iwona Grabowska