

dr hab. Agnieszka Kyzioł, prof. UJ
Zakład Chemii Nieorganicznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński
kyziol@chemia.uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 18.05.2023

RECENZJA

**rozprawy w przewodzie doktorskim mgr inż. Poliny Ivanowej
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki chemiczne**

*pt.: „Studies on the catalytic activity of monometallic and multimetallic
nanozymes and their use in the construction of biotests”*

Wydział Chemii

Rozprawa doktorska mgr inż. Poliny Ivanowej została wykonana w Katedrze Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej oraz Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem dr hab. Mariusza Pietrzaka, prof. PW oraz prof. dr hab. Sławomira Sęka z Uniwersytetu Warszawskiego.

Tematem rozprawy doktorskiej mgr inż. Poliny Ivanowej była synteza oraz zbadanie aktywności katalitycznej nanocząstek mono- i multimetalicznych pod kątem ich przydatności jako sond analitycznych do wykrywania modelowych biomarkerów. Postawiona hipoteza badawcza dotyczyła wykorzystania otrzymanych nanocząstek jako tak zwanych nanozymów o ściśle określonej aktywności katalitycznej typu peroksydazy.

Ocena strony formalnej i językowej pracy

Przedstawiona praca doktorska została napisana w klasycznym stylu i zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, przegląd literaturowy, opis części eksperymentalnej, część poświęconą wynikom i ich dyskusji, a następnie podsumowanie i wnioski. Dysertacja stanowi 157 stron maszynopisu w formacie B5. Bibliografia liczy około 290 pozycji, jest to liczba oszacowana przeze mnie, ponieważ nie ma numeracji. Jest to głównie najnowsza anglojęzyczna literatura naukowa, prawidłowo cytowana. Część literaturowa poświęcona jest opisowi syntez nanocząstek metalicznych, ich morfologii, stabilizacji koloidów, możliwych aplikacji zestawionych w obszernej tabeli. Zgodnie z głównym tematem pracy główny nacisk położono na właściwości katalityczne nanomateriałów, w tym te naśladujące działanie naturalnych enzymów (nanozymy). Na uwagę zasługuje bardzo szczegółowo omówiona część przedstawiająca metody badania aktywności katalitycznej: spektrofotometryczne (absorpcyjne i emisyjne) oraz chemiluminescencyjne. Każda opisana metoda została zilustrowana odpowiednim schematem pokazujących istotne reakcje chemiczne zachodzące podczas oznaczenia. Świadczy to o dogłębnym zrozumieniu prowadzonych przez doktorantkę doświadczeń. Osobny rozdział został poświęcony oznaczeniom aktywności katalitycznej nanocząstek metalicznych

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Chemii

naśladujących peroksydazę chrzanową. Co istotne, oznaczenia tego typu jak podaje doktorantka opisywane w literaturze są dopiero od 2007 roku (Nature Nanotechnology, 2007, 2, 9, 577-583, Gao *et al.*, Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles). Zatem podjęta tematyka badawcza jest bardzo aktualna i nie do końca poznana, co jest warte podkreślenia. Moją uwagę zwrócił także bardzo dobrze napisany rozdział poświęcony strategiom koniugacji przeciwciał do powierzchni nanocząstek, opisujący zarówno fizyczne jak i chemiczne podejście do tego typu funkcjonalizacji nanocząstek. Część eksperymentalna została opisana bardzo szczegółowo, w sposób umożliwiający odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów w sposób wiarygodny przez innych badaczy.

Dopatrzyłam się niewielu nieścisłości i niedociągnięć jak np. na stronie 37 w podpisie pod rysunkiem brakuje odnośnika literaturowego, drobny błąd językowy wkradł się na stronie 129 (was powinno być were). Brak wyjaśnienia używanego często w pracy skrótu CRP w liście stosowanych skrótów. Jednak te błędy absolutnie nie wpływają na mój bardzo pozytywny odbiór całej pracy. Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Poliny Ivanowej pod względem edycyjnym została przygotowana w sposób niezwykle dokładny i staranny, z wyjątkową dbałością o detale. Kolorystyka wszystkich grafik i figur przedstawiających wyniki jest jednolita i stonowana. Praca jest wyjątkowo przejrzysta, co w znaczący sposób ułatwia jej odbiór. Zawiera liczne schematy i tabele, a uwzględnienie najistotniejszych schematów reakcji chemicznych zachodzących podczas wykonywanych oznaczeń analitycznych bardzo ułatwia zrozumienie pracy i analizę wyników bez konieczności sięgania do oryginalnych publikacji. Na uwagę zasługują liczne tabele porównujące otrzymane wyniki z dostępnymi danymi literaturowymi, prezentowane na wszystkich kolejnych etapach realizacji pracy oraz Tabela 11 w rozdziale poświęconym wnioskowi końcowemu podsumowująca zarówno oszacowane granice wykrywalności jak i czas potrzebny do wykonania oznaczenia. Zestawienia te stanowią niezwykle cenną naukową wartość poznawczą i pokazują jak ważne są dokonania doktorantki.

Ocena merytoryczna rozprawy

Doktorantka, jako główny cel badawczy swojej pracy doktorskiej zaplanowała zaprojektowanie, otrzymanie i scharakteryzowanie mono- i multimetalicznych nanocząstek o aktywności katalitycznej typu peroksydazy. Doktorantka dokonała modyfikacji nanocząstek wybranymi przeciwciałami w celu wykonania oznaczenia wobec modelowego antygenu tj. białka C-reaktywnego (CRP). Następnie dokonała optymalizacji warunków oznaczenia białka CRP (w szerokim zakresie stężeń 0,02 – 500 ng/ml) testem nonozyme-linked immunosorbent assay (NLISA) wykorzystując otrzymane i scharakteryzowane nanocząstki Pt i Ru. Ponadto zaprojektowała, wykonała i przetestowała mikroprzepływowy układ detekcyjny (chip kasetowy) z zastosowaniem nanocząstek funkcjonalizowanych przeciwciałami do selektywnej analizy badanego antygenu. Sfinalizowanie pracy doktorskiej skonstruowaniem i przetestowaniem tego typu urządzenia jest bardzo dużym osiągnięciem i zasługuje na szczególną pochwałę.

Opis wyników uzyskanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej rozpoczęto od zaprezentowania wpływu czynnika redukującego o różnym

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Chemii

stężeniu (tj. chlorowodoru hydroksylaminy, hydrazyny, borowodoru sodu) na właściwości fizykochemiczne otrzymywanych nanocząstek bimetalicznych. Charakterystyki fizykochemicznej doktorantka dokonała oceniając względną stabilność koloidów oraz wyznaczając średnicę hydrodynamiczną techniką dynamicznego rozpraszania światła. Do dalszych badań nad aktywnością katalityczną zostały wytypowane stabilne nanocząstki o rozmiarze hydrodynamicznym <100 nm. Jako najaktywniejsze katalitycznie doktorantka wskazała nanocząstki Ru o najmniejszym rozmiarze i wyjaśniła to znaną zależnością nanometrycznego rozmiaru i reaktywności chemicznej. Niemniej jednak dalej doktorantka zauważa, że „Such phenomenon can be explained by the fact that catalytic activity of NPs not only related to size, but also other parameters that influence the catalytic activity of NPs” (str. 77). *Chciałabym zapytać, co miała na myśli doktorantka mówiąc o tych innych parametrach, podała je i krótko przedyskutowała, uwzględniając badane przez siebie nanomateriały i ich aktywność?* Ponadto, dalej badając wpływ pH na aktywność katalityczną typu peroksydazy (oznaczenie PhOH/4AAP) nie do końca jest dla mnie zrozumiała interpretacja Tabeli 4 (str. 80). Uwagę zwracają największe zmiany absorbancji w czasie wraz ze wzrostem pH dla serii eksperymentalnej Ru i oraz Ru ii. Zostały one jednak jedynie skomentowane w następujący sposób „Within the pH range between 6.5-10.5, monometallic Ru i and Ru ii NPs synthesized with 30 and 40 mM solution of sodium borohydride, respectively, demonstrated increased catalytic activity in comparison to other types of NPs.” *Bardzo proszę o wyjaśnienie dlaczego jako najaktywniejsze zostały wskazane nanocząstki o znacznie mniejszym przyroście absorbancji w czasie, niestety w pracy nie znajduje się żadne wyjaśnienie tej decyzji?* A co istotne, na podstawie tych właśnie wniosków postawiono hipotezę, że aktywność katalityczna dla nanocząstek Ru jest wynikiem współistnienia dwóch mechanizmów homogenicznego i heterogenicznego. *Na jakiej podstawie została postawiona ta hipoteza, i które wykonane doświadczenia i wykorzystane metody badawcze to jednoznacznie potwierdzają?* Czy oznaczenie aktywności katalitycznej testem PhOH/4AAP, z wykorzystaniem układu dializującego, jest w literaturze naukowej powszechnie opisywane do potwierdzenia mechanizmu homogenicznego? *Jakie jeszcze inne dodatkowe eksperymenty mechanistyczne można byłoby wykonać, aby mechanizmy aktywności katalitycznej potwierdzać lub wykluczyć?* Dodam, że w dalszej części pracy hipoteza ta jest traktowana jako wniosek, co więcej we wnioskach końcowych pojawiło się następujące stwierdzenie: „It was confirmed that Ru-containing NPs can release ions and display heterogenic and homogenic mechanisms of catalytic activity. The combination of these two mechanisms may result in increased catalytic activity, which is important for the catalysts used in the assays”. Uważam, że aby wysunąć tak ważny wniosek końcowy doktorantka powinna mieć niepodważalne argumenty naukowe. *Czy zatem wniosek dotyczący mechanizmu obserwowanej aktywności katalitycznej nie został wyciągnięty zbyt pochopnie na podstawie testów analitycznych (OPD- i PhOH/4AAP), które wydaje mi się, że nie są przeznaczone do badań nad mechanizmami reakcji, a jedynie oceny wydajności reakcji?* Ponadto, można zauważyć, że wniosek końcowy jest sprzeczny z tym co doktorantka twierdziła wcześniej mówiąc jedynie o mechanizmie homogenicznym i skupiając się na jego potwierdzeniu.

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Chemii

Jeśli chodzi o charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych wielofunkcyjnych metalicznych nanocząstek widma UV-vis kolejnych etapów funkcjonalizacji budzą moje wątpliwości. *Czy doktorantka na ich podstawie może jednoznacznie twierdzić o powodzeniu funkcjonalizacji?* Bardzo wysokie podniesie widma w całym zakresie spektralnych może świadczyć o utracie stabilności badanych koloidów i efekcie rozpraszania promieniowania, co obserwowane jest jako podniesienie tła. Moja uwaga krytyczna dotyczy braku skali na zdjęciach prawdopodobnie z elektronowego mikroskopu skaningowego (nie jest to opisane w legendzie) w przypadku analizy EDX. Patrząc na zdjęcia nie wiemy jakich rozmiarów jest badany obiekt i czy nie jest to na przykład agregat. Ponadto, w charakterystyce fizykochemicznej zabrakło wykorzystania rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów, która jednoznacznie potwierdziłaby skład atomowy oraz stany walencyjne metali znajdujących się na powierzchni otrzymanych nanocząstek.

Na szczególną pochwałę zasługuje zaprojektowanie mikroprzepływowego chipu do oznaczania wybranego antygeny, który może znaleźć zastosowanie w testach immunosorpcyjnych wykorzystujących układy mikroprzepływowe. Jest to bezsprzecznie największe osiągnięcie doktorantki, które zostało dokonane dzięki jej ciężkiej pracy na wcześniejszych etapach realizacji swojej pracy doktorskiej. *Chciałabym dowiedzieć się od doktorantki jaki dokładnie był jej osobisty udział w projekcie i wykonaniu tego systemu mikroprzepływowego oraz czy są dalsze plany dotyczące komercjalizacji tego urządzenia i na jakim znajdują się one etapie?*

Doktorantka wykorzystwała w pracy liczne techniki badawcze takie jak: spektroskopia UV-vis, mikroskopia elektronowa (SEM, TEM), fluorescencyjna spektroskopia rentgenowska z dyspersją energii (EDXRF), dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), techniki separacji magnetycznej. Dobór technik badawczych jest odpowiedni do realizowanej tematyki badawczej. Zarówno opanowanie powyższych technik, jak i opracowanie oraz interpretacja otrzymanych wyników pozwala przypuszczać, że doktorantka potrafi dokonać samodzielnej charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych materiałów oraz dobrać odpowiednie metody do oceny ich aktywności katalitycznej. Znajomość wielu różnych metod do badania aktywności katalitycznej typu peroksydazy, szczegółowo opisana we wstępie teoretycznym, pokazuje, że doktorantka jest zapoznana z dostępnymi metodami badania tego typu aktywności katalitycznej, głównie wykorzystującymi metody spektrofotometryczne (absorpcyjne i fluorescencyjne) oraz chemiluminescencyjne. Moja uwaga krytyczna dotyczy podziału metod spektrofotometrycznych opisywanych we wstępie. W mojej opinii metody oparte na pomiarach fluorescencji powinny być ujęte jako podrozdział metod spektrofotometrycznych, a nie stanowić osobny rozdział. W pracy zabrakło także analizy statystycznej, która w przypadku pomiarów analitycznych jest cenna i potwierdza wiarygodność otrzymanych wyników dla prowadzonych oznaczeń analitycznych. Ponadto, na wszystkich wykresach pokazujących różne zależności absorbancji brakuje jednostki (arbitrary unit, [a.u.]).

Podsumowując, na podstawie przedstawionej mi do recenzji pracy mogę jednoznacznie stwierdzić, że pomimo moich nielicznych drobnych uwag krytycznych, wyniki ujęte w ramach niniejszej rozprawy bezsprzecznie stanowią wartościowy wkład do dziedziny naukowej związanej

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

z poszukiwaniami nowych, selektywnych i przede wszystkim wydajnych układów do oznaczania antygenów metodą immunosorpcyjną z wykorzystaniem funkcjonalizowanych nanocząstek metali, w tym w układach mikroprzepływowych. Osiągnięcia doktorantki w istotny sposób przyczyniają się do głębszego zrozumienia fizykochemicznych mechanizmów oddziaływań nanocząstek metali i białek oraz metod oznaczania antygenów w układach przepływowych wykorzystujących nanomateriały metaliczne. Na uwagę zasługuje fakt, że obrona przez doktorantkę tematyka badawcza dotycząca nowej grupy nanomateriałów, jaką stanowią badane nanozymy, jest nowa i aktualnie intensywnie badana na świecie. W końcu pragnę dodać, że jestem pod ogromnym wrażeniem ogromu pracy (trudnej analitycznej pracy laboratoryjnej), jaki wykonała doktorantka w tak krótkim czasie realizacji pracy doktorskiej.

Wydział Chemii

Ocena dorobku naukowego doktorantki

Dorobek naukowy doktorantki jest dość pokaźny i stanowi sześć prac opublikowanych, a następne dwie prace znajdują się w recenzji. Opublikowane prace ukazały się w bardzo dobrych czasopismach takich jak *Advances in Colloid and Interface Science* (imp. fact. 15.19), *Nanotechnology* (imp. fact. 3.95). Doktorantka prezentowała swoje wyniki wielokrotnie na międzynarodowych konferencjach, z czego aż trzy prezentacje ustne były na zaproszenie, co rzadko ma miejsce na tak wczesnym etapie rozwoju naukowego. Wyniki pracy eksperymentalnej doktorantki stanowią podstawę dwóch zgłoszeń patentowych (P441974, P444127), a kolejny patent jest w przygotowaniu. Wszystkie te osiągnięcia świadczą o dojrzałości naukowej doktorantki i jej predyspozycjach do kontynuowania rozwoju naukowego jako samodzielnego naukowca.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Poliny Ivanovej spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 2 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w szczególności artykuły i przepisy o stopniach naukowych i tytule naukowym, wraz z uzupełnieniami. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Poliny Ivanovej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i do publicznej dyskusji nad rozprawą. Jednocześnie biorąc pod uwagę poziom naukowy i jakość przedstawionej rozprawy wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Agnieszka Kypriot

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl

