

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Jankowskiej-Śliwińskiej
Electrochemical detection of psychoactive substances based on DNA intercalation
przedstawionej Radzie Naukowej
Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęczka PAN w Warszawie.

Promotorem pracy o tytule jak wyżej jest prof. dr hab. inż. Dorota G. Pijanowska o uznanym dorobku i pozycji naukowej w zakresie czujników chemicznych zarówno od strony samego mechanizmu generowania sygnału analitycznego jak i konstrukcji układów elektronicznych. Ostatnio uprawiana tematyka promotora lokuje się coraz bliżej analityki biochemicznej i biomedycznej. W pracy doktorskiej mgr inż. **Joanny Jankowskiej-Śliwińskiej** wspomniane wyżej elementy czerpią z całościowego dorobku macierzystego Zespołu i przyczyniają się do wzbogacenia warsztatu. Dotyczy to przede wszystkim wykorzystania projektowanych i tworzonych w IBIB PAN narzędzi i technik, które nie ograniczają się jedynie do analitycznych zastosowań.

Mgr inż. J. Jankowska-Śliwińska w rozprawie wzięła na warsztat istotny problem praktycznego oznaczania poziomu psychotropów stosowanych w przypadku chorób i powikłań psychicznych. Dla leczonych pacjentów szpitali znaczenie mają nie tylko zaburzenia samoistne, ale też wywołane przedawkowaniem leków. Oprócz pacjentów problem jest też ważny dla bezpieczeństwa ogólnego, szczególnie znaczącego w przypadku zachowania kierowców, a ogólnie operatorów sprzętu mechanicznego. Autorka we wstępie przekonuje o zaletach testów służących do szybkiego oznaczania/wykrywania substancji biologicznie aktywnych. Zaletą testów jest nieskomplikowany sposób i szybkość wykonywania oznaczeń wybranych analitów oraz niska cena czujników, nawet jednorazowego użytku. Dodatkowymi zaletami systemu testów jest stosowanie niewielkich objętości próbek i nikłe zużycie odczynników, co przekłada się na troskę o ochronę środowiska. Wreszcie zaletą takich testów jest możliwość dokonania analiz w miejscu pobierania próbek i niekoniecznie w szpitalu. Może to mieć kluczowe znaczenie dla szybkości diagnozowania.

Od siebie dodam, że spośród „testów” wspomaganych aparaturowo te elektrochemiczne są najbardziej dostępne, relatywnie tanie, łatwe w obsłudze, mogą służyć do oznaczania różnych analitów, nawet przy bardzo niskich stężeniach. Dlatego znakomicie nadają się do badań (przesiewowych) materiału biologicznego. Takie testy w odróżnieniu od powszechnych spektroskopowych mogą być wykorzystane w barwnych roztworach. Z kolei słabością testów jest wąski zakres użytecznych potencjałów, co może spowodować nakładanie się pików dla podobnych układów redoksowych. Ale rozwiązywanie przeciwności tkwiących w naturze analitów w dużej mierze zależy już od inwencji eksperymentatora. W obszar inwencji badawczej w znacznym stopniu wpisuje się recenzowana praca doktorska.

Powyższe refleksje narzuciły cel pracy doktorskiej, którym było opracowanie selektywnej metody oznaczania/wykrywania kilku wybranych substancji, w tym psychoaktywnych. Ambitny cel pracy jest wynikiem zapału Doktorantki, względami bezpieczeństwa i potrzebą dyskutowania dorobku Zespołu, w którym pracuje.

Po dokładnym przeanalizowaniu stanu wiedzy Autorka z pełną świadomością wyzwań postanowiła:

- 1) zastosować jako narzędzie analityczne czujniki elektrochemiczne wykonane techniką drukowania bezpośredniego do detekcji hybrydyzacji kwasów dezoksyrybonukleinowych zakotwiczonych na powierzchni elektrod i
- 2) wykorzystać selektywność oddziaływania wybranych substancji psychoaktywnych, np. z grupy fenotiazyn i/lub trójcyklicznych antydepresantów poprzez zjawiska interkalacji cząsteczek wymienionych substancji z DNA.

Początkowy fragment rozprawy umieszczony na stronach I - XVI obejmuje w j. polskim **CEL PRACY, TEZY PRACY DOKTORSKIEJ** – wskazujące na wiarygodność zaproponowanego celu, **STRESZCZENIE**, a w j. angielskim **Contents, List of Abbreviations, List of Symbols i Summary**. Nazwy cząstkowe z Contents nie zawsze są zachowane w rozprawie. W tej części Autorka określa ramy tej pracy, przyjęty obszar eksperymentów, a przede wszystkim metody badawcze z podaniem ważnych charakterystyk wyników pomiarów jak zakres wykrywalności czy selektywność oznaczania analitu, sprawdzania poprawności metodyki i działania poszczególnych urządzeń zastosowanych w analizie roztworów wodnych i w serum. Wiele miejsca poświęca Autorka charakteryzowaniu powierzchni czujników, zjawiskom towarzyszącym ich modyfikowaniu, różnicowaniu metod elektroanalitycznych służących poprawie selektywności procesów analitycznych.

Główną obserwacją wynikającą z testowania metodyki analitycznej jest stwierdzenie (str. XII), że materiały z których wykonane są czujniki w znacznym stopniu wpływają na parametry oznaczeń. Taka obserwacja w przypadku czujników nie jest nagminnie dyskutowana.

Wstępna część rozprawy zajmuje 16 stron, co łącznie z częścią angielskojęzyczną, streszczeniem, spisem publikacji Autorki i addendami daje całkowitą objętość pracy równą 192 strony. Ścisłe merytoryczna część napisana w j. angielskim jest podzielona na rozdziały. Generalnie rozdziały mają układ typowy dla publikacji (wstęp, część teoretyczna, część doświadczalna z listami odczynników, materiałów i aparatury, dyskusja wyników, spis cytowanej literatury, wnioski). Chodzi tu głównie o rozdziały 3, 5 i 6, które są tekstami prac wysłanych do druku, a obecnie już opublikowanych. Uwagi z części wstępnej o zakresie ram poszczególnych wywodów odnoszą się również do pozostałych rozdziałów; będę je pomijał w dalszych rozważaniach. Każdy rozdział ma integralny przegląd literatury, specyficzne eksperymenty i wnioski wynikające z doświadczeń. Wszystkie przeglądy literaturowe są drobiazgowo, licznie cytowane i tchną świeżością. W wielu miejscach ważne informacje z literatury są zebrane w postaci przejrzystych tabel. Tabelaryczne zestawienia dotyczą też wyników doświadczeń. Ta forma prezentowania bardzo ułatwia śledzenie toku rozwijania tematyki. Odnośników do literatury jest mrowie. W zasadzie publikacje, na które Autorka się powołuje nie powtarzają się od rozdziału do rozdziału.

CHAPTER 1; INTRODUCTION (str. 1-23, zawierający 123 odnośniki do literatury) jest wstępem do rozważań prowadzonych w kolejnych rozdziałach. Obejmuje zasady działania i klasyfikację biosensorów, w szczególności zastosowanie metod enzymatycznych i polegających na oddziaływaniu analitów z DNA. Tej kluczowej sprawie Autorka poświęca wiele miejsca omawiając budowę i znaczenie DNA (RNA), rodzaje kwasów dezoksyrybonukleinowych (ssDNA, dsDNA), sposoby wiązania ssDNA do powierzchni elektrod złotych, hybrydyzację zakotwiczonych oligonukleotydów i wreszcie rodzaje oddziaływań/interkalacja substratów z DNA. Celne jest omówienie budowy i działania biosensorów, ich podział ze względu na generowanie różnych sygnałów, a głównie na elektrochemiczne z dalszym podziałem według rodzaju przetwornika/transduktora. Oddzielnie, zgodnie z tytułem pracy, i szerzej omówione są biosensory wykorzystujące DNA do międzycząsteczkowej akumulacji analitu. Autorka omawia mechanizmy akumulacji w odniesieniu do wielu różnych substancji, np. antybiotyków antrachinonowych. Tu zwraca uwagę na brak szerszych badań oddziaływania DNA z typowymi lekami psychotropowymi i podkreśla, że poza przypadkami klinicznych zaburzeń po zastosowaniu antydepresantów są szczególnie niebezpieczne, gdy dotyczą operatorów sprzętu mechanicznego.

Atrakcyjność tematu rozprawy podkreśla analiza perspektyw rozwoju i majoryzacji rynku biosensorów. Dodałbym, że liczba osób zażywających psychotropy też ma tendencję wzrostową.

Dojrzały przegląd literatury wymienia aż 123 publikacje, w większości bardzo aktualne i starannie wyłowione spośród morza innych doniesień literaturowych. Cytowana literatura wyczerpuje opis tła i celów pracy. Literatura oddzielnie zebrana po każdym rozdziale niewątpliwie ułatwiła Autorce prace redakcyjne, a czytelnikowi poruszanie się po bogato przywoływanych odnośnikach.

CHAPTER 2, MATERIALS AND METHODS (str. 24-47; 9 przywołanych publikacji) jest niemal najważniejszą częścią rozprawy. Zawiera przede wszystkim dokładny opis „drukowania” czujników z użyciem własnych rozwiązań aparaturowych. Dokładnie omówione są czujniki trójelektrodowe (każda elektroda z innego materiału), sposoby badania jakości warstw wytwarzanych metodą sitodruku i wykonanych przez robota. Powtarzalność właściwości w ostatnim przypadku jest najlepsza.

Kluczową rolę w dalszych badaniach pełnią czujniki ze złotą elektrodą pracującą, właściwie jedyną, na której można zakotwiczyć monomolekularne warstwy tioli, w tym „tiolowane” oligonukleotydy, a następnie zablokować pozostałe wolne miejsca małowcząsteczkowym tiolem. Powierzchnię złotych elektrod przed immobilizacją tioli oczyszczano i polerowano (stabilizowano). Stosowano też metodę oczyszczania elektrochemicznego. Jakość powierzchni modyfikowanej elektrody złotej została zbadana z zastosowaniem pomiaru kątów zwilżania, widm w podczerwieni z transformacją Fourier'a i widm refleksyjnych UV-Vis, które posłużyły także do rozróżnienia ssDNA i dsDNA zarówno w roztworze jak i na powierzchni elektrody. W połączeniu z badaniami woltametrycznymi metody te posłużyły Autorce do pełnej kontroli procesów prowadzonych na czujniku.

Dla potwierdzenia poprawności pracy czujników i wyskalowania metody pomiarowej Autorka przeprowadza eksperymenty z udziałem roztworów wzorcowych, z wyznaczaniem selektywności i granicy wykrywalności.

Obok prac prowadzących do uzyskania jakościowo dobrych czujników rozdział zawiera krótkie i jasne wyłożenie konsekwencji równania Nernsta (str. 38) dla różnych technik elektroanalitycznych (LSV-linear sweep voltametry, DPV-differential pulse voltametry) i ich specyfikę w zakresie analiz ilościowych, selektywności oznaczeń, odwracalności procesów i zależności od stężenia analitu. Te specyficzne cechy voltametrii zostały przez Doktorantkę z dobrym skutkiem wykorzystane w kolejnych rozdziałach.

Poznane właściwości czujników wykorzystała Autorka do opracowania elektrochemicznego oznaczania zasad nukleinowych, sposobów stwierdzania zjawiska interkalacji i oznaczania substancji psychoaktywnych. W powyższych procedurach ważną rolę odegrały badania selektywności, granicy oznaczalności i korelacja z wynikami uzyskanymi metodami spektroskopowymi.

W tym miejscu pragnę podkreślić bardzo staranny opis wszystkich czynności poprzedzających prace ściśle analityczne. Ta uwaga dotyczy wszystkich opisów i wszystkich rozdziałów, a są one kwantyfikatorami jakości prowadzonych eksperymentów.

CHAPTER 3. COMPARISON OF ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF PURINE AND PYRIMIDINE BASES ON CARBON, GRAPHITE AND GOLD ELECTRODES (str. 48-78; 82 odnośniki do literatury). W rozdziale Autorka w pierwszej kolejności przegląda głównie elektrochemiczne metody wykrywania i oznaczania puryn i pirymidyn, ale z licznymi odniesieniami do innych technik, np. elektroforezy kapilarnej, spektrometrii mas, HPLC i HPLC/MS, metod chromatograficznych, spektroskopii Ramana, IR z metodami refleksyjnymi, metod rentgenowskich, chemiluminescencji, spektroskopii impedancyjnej, rezonansu Rayleigh'a. Omawiając metody elektrochemiczne Autorka odnosi się do materiałów z których wykonane są elektrody, w tym elektrody modyfikowane, elektrody o różnej wielkości, modyfikowane węglikiem krzemu, modyfikatorami organicznymi, nanomateriałami, materiałami kompozytowymi, przewodzącymi polimerami, ich kombinacjami, np. z cyklodekstryną, ftalocyjaninami, itd. Wymieniam umyślnie przywoływane techniki analityczne aby ukazać jak drobiazgowo Autorka przeanalizowała literaturę.

Powyższy przegląd wpisuje się w problem oznaczania zasad purynowych i pirymidynowych w jednoniciowych i dwuniciowych DNA, ze względu na zakłócenia, spowodowane podobieństwem elektrochemicznych właściwości do fragmentów uszkodzonego DNA. Autorka wspomina też o elektrodzie rtęciowej, która jest świetnym narzędziem, ale toksyczność stanowi istotne ograniczenie jej stosowania.

Istotną częścią rozdziału jest porównanie metod wykrywania/oznaczania zasad purynowych i pirymidynowych. Po wprowadzeniu korekt linii podstawowej i z zastosowaniem różnych procedur analitycznych Autorka przedstawia znakomite voltamogramy ukazujące różnice w liczbie i wartościach potencjałów redoksowych, a następnie demonstrowa wykrywanie i oznaczanie tych zasad w mieszaninach i na elektrodach z różnych materiałów. Granice wykrywalności adeniny, guaniny, cytozyny i tyminy mieszczą się w granicach od $7,4 \cdot 10^{-7}$ do $1,3 \cdot 10^{-6}$ M, a czułości od 39,8 do 3.0 nA/ μ M). Rozdział zaopatrzony jest także w tabelaryczne zestawienia zarówno procedur jak i charakterystyki analiz, łącznie z uwzględnieniem błędów pomiarów. Rozdział kończy ukazanie przebiegu identyfikacji zasad nukleinowych w mieszaninie. Wykrywalności zasad leżą w granicach stężeń 10^{-6} – 10^{-7} M przy dobrych nachyleniach charakterystyk. Dalsze voltamogramy znajdują się w Apendyksie do tego rozdziału umieszczone na końcu rozprawy.

CHAPTER 4. IMMOBILIZATION AND HYBRIDIZATION OF DNA (str. 79-107; 105 odnośników do literatury) napisany jest w formie publikacji. Zawiera typowe dla manuskryptu wprowadzenie, część doświadczalną z listą materiałów, przygotowaniem czujników i użytą aparaturą. Część eksperymentalna opisuje immobilizację „tiolowanego” ssDNA, maskowanie wolnej powierzchni złota małowcząsteczkowym tiolem, a potem hybrydyzację z komplementarnym ssDNA. Autorka śledzi powyższe procesy stosując jako wskaźnik układ redoks żelazo/żelazicyjanek potasu, poprzez reakcje selektywnego utleniania i metody z zastosowaniem interkalujących barwników, jako metod najbardziej dopasowanych do charakteru i dalszych rozdziałów rozprawy. Szczególnie ważne jest tu zastosowanie redoksowego błękitu metylenowego należącego do grupy fenotiazyny czy barwnika Hoechst 33258, co w kolejnych rozdziałach daje podstawę do stwierdzania interkalacji leków psychotropowych. Do śledzenia immobilizacji, hybrydyzacji i interkalacji referencyjnie zastosowano FTIR i refleksyjną spektroskopię UV-Vis. Zasadniczą właściwością modyfikowanej elektrody jest szybka akumulacja redoksowego materiału na monomolekularnej warstwie dsDNA. Zapewnia to zbliżenie analitu do powierzchni

elektrody, co przekłada się na wzrost wielkości sygnału analitycznego. Warunki immobilizacji i hybrydyzacji Autorka zoptymalizowała na grupie 30 czujników.

Porównując opracowaną metodę Autorka słusznie stwierdza, że literaturowe metody wykrywania hybrydyzacji DNA są zdecydowanie wolniejsze (elektroforeza, techniki membranowe).

CHAPTER 5. DNA INTERACTION-BASED BIOSENSOR FOR IMIPRAMINE DETERMINATION (str. 108-138; 78 pozycji literaturowych). Rozdział ma również układ typowy dla manuskryptu publikacji. Zaczyna się od wstępu teoretycznego o zastosowaniach imipraminy (Torfanilu) ze szczególnym podkreśleniem ubocznych efektów leczenia. Te efekty są potęgowane produktem biodegradacji imipraminy (desipraminy) i jednoczesnym przyjmowaniem amfetaminy. Na owadach stwierdzono oddziaływanie tego specyfiku z dsDNA powodującą genotoksyczność, a uboczne reakcje po zażyciu uniemożliwiają kierowcom prowadzenie pojazdów. Wnioskiem jest konieczność analizowania zawartości imipraminy albo w osoczu krwi, surowicy, moczu albo ślinie.

Autorka omawia znane metody instrumentalne oznaczania imipraminy: HPLC, HPLC/MS, GC, GC/MS, spektrofotometria, elektroforeza kapilarna (CE) lub CE/MS z krótką ale rzeczową dyskusją tych metod. Jak widać, aparatura stosowana w innych pracowniach jest droga, a często bardzo skomplikowana. Natomiast w metodach elektrochemicznych stosowano GCE, elektrody węglowe, z pasty węglowej, również funkcjonalizowanej, elektrody z dotowanego borem diamentu, z kompozytów nano-glinek, platynowe, złote, ITO i ITO dotowane nanocząstkami i wreszcie polimerowe z wdrukowanymi wzorcami molekuł.

Na GCE i elektrodach z pasty węglowej po pre-akumulacji analitu granica wykrywalności wynosi 1.5×10^{-8} M. Tę granicę można dalej obniżyć stosując modyfikowaną pastę elektrodową. Metody dają się udoskonalić poprzez zastosowanie DNA, cyklodekstryn i polimerów tych makrocyclicznych związków, co ułatwia pre-akumulację na elektrodzie.

Jako całkowite novum do detekcji/oznaczania imipraminy Autorka zastosowała chemicznie zakotwiczoną na złotej elektrodzie monomolekularną warstwę unc59a-dsDNA. Warstwa sprzyja szybkiej pre-akumulacji / interkalacji analitu (optymalnie 2 minuty) i zwiększa amperometryczny sygnał. Pomiarów dokonywano metodą LSV i DPV na złotych elektrodach o czystej (bare) powierzchni i modyfikowanej DNA o mieszanej sekwencji zasad. Pierwsza metoda jest nieselektywna; ta druga dała znacznie lepsze i selektywne wyniki. Są one zestawione w tabelach na str. 124 i 126. Wyniki w tym rozdziale są ilustrowane wybranymi oznaczeniami z podaniem statystycznego rozrzutu. Kwintesencją rozdziału jest charakterystyka selektywności oznaczeń różnych redoksowych analitów metodą LSV i DPV. Różnicowa voltametria pulsowa okazała się najlepsza, a jej czułość jest równa $3,44 \mu\text{A}/\mu\text{M}$. Ten fragment pracy kończy dyskusja wad i zalet opracowanej metody w porównaniu z metodami opublikowanymi. Najniższa granica wykrywalności imipraminy to $1,6 \times 10^{-9}$ M. Dalsze porównania znajdują się w Tabeli 5.2 na str. 126.

Rozdział przynosi też porównanie właściwości sorpcyjnych (interkalacyjnych) elektrod złotych modyfikowanych DNA z mieszanymi zasadami i polinukleotydami o jednolitym składzie zasad. Porównanie najlepiej jest widoczne na rys. 5.9. Ten wynik unaocznia i potwierdza interkalację w rejonie określonych zasad purynowych/pirymidynowych w DNA.

Czujniki z immobilizowanymi oligo-dsDNA zostały scharakteryzowane metodami jak opisano to w poprzednim rozdziale. Dla modyfikowanych czujników interesujące jest przesunięcie potencjałów utlenienia w kierunku bardziej dodatnich.

W badaniach o większej zdolności aplikacyjnej Autorka zastosowała matrycę w postaci płodowej surowicy bydlęcej sprawdzając stosowalność opracowanej metody do oznaczania imipraminy w biomateriale.

W konkluzji Autorka stwierdza, że oznaczanie imipraminy jest możliwe tylko na elektrodzie złotej z immobilizowanym DNA. Zakres odpowiedzi elektrody pokrywa się z terapeutycznym zakresem stężeń dawki równej 14.4×10^{-5} M dla objętości krwi równej 5 l. Dla pacjentów hospitalizowanych dzienna dawka to 100 – 200 mg, czyli 7.2×10^{-5} - 14.4×10^{-5} M, a granica wykrywalności jest rzędu 6×10^{-8} M. Dla mono-GC sygnał jest 3,6 razy mniejszy niż dla mieszanej-dsDNA, a dla mono-AT-DNA brak jest piku utlenienia. Metoda jest selektywna w stosunku do najczęstszych substancji interferujących, to jest kwasu askorbinowego i acetaminofenu.

CHAPTER 6. DNA INTERACTION-BASED BIOSENSOR FOR CHLORPROMAZINE DETERMINATION (str. 139-162; 55 pozycji literatury) poświęcony jest metodzie oznaczania chlorpromazyny (Thorazine, Chlorazin, Fenactil, Largactil), psychotropu z grupy fenotiazyn. Jest to najważniejszy specyfik stosowany w leczeniu i w opiece psychiatrycznej. Dla kierowców jest niebezpieczny w dawce już około 75 mg/dzień. Znane metody oznaczania tego preparatu polegają na wykorzystaniu chromatografii, elektroforezy, metod optycznych. W

literaturze jest tylko kilka wzmianek o czujnikach elektrochemicznych dla związków z grupy fenotiazyny i ich pochodnych. Jako materiał elektrod wykorzystuje się węgiel, węgiel szklisty, wielościenne nanorurki węglowe z modyfikatorami albo z niespecyficznym zaadsorbowanym DNA i kombinacje pasty grafitowej z cieczą jonową jako pokrycia elektrod złotych. Ponadto stosuje się pomiar impedancji piezoelektrycznej na kryształach kwarcu z DNA zaadsorbowanym na MWCNTs na elektrodach złotych.

Inspirowana poprzednimi wynikami Autorka w części eksperymentalnej wykorzystuje czujniki z elektrodą złotą modyfikowaną oligonukleotydami o mieszanych zasadach i z czystą złotą powierzchnią. Ten pierwszy czujnik ma wyższe powinowactwo do chloropromazyny na skutek interkalacji, co zwiększa czułość i selektywność metody oznaczania. Elementy analizy są takie same jak w poprzednich rozdziałach. Tak jak poprzednio Autorka wybrała dwuminutowy czas pre-akumulacji i pomierzyła zakres liniowy krzywej wzorcowej, czułość, granicę oznaczalności itd. dla chloropromazyny i perfenazyny (Trilafonu). Na str. 151 jest tabelaryczne zestawienie metod i parametrów analitycznych dla szeregu metod oznaczania fenotiazyn i na różnych elektrodach. Kolejne informacje o wpływie struktury DNA związanego z elektrodą złotą na krzywe kalibracyjne przynosi rys. 6.6 na str. 152. Czułość sensora z mieszanym DNA wynosi 60 nA/μM, dla mono-GC-DNA wynosi 30 nA/μM, a dla mono-AT-DNA wynosi zaledwie 2 nA/μM. W odróżnieniu od analiz z poprzednich rozdziałów jest interesujące, że lepsze wyniki oznaczeń chloropromazyny uzyskuje się metodą LSV niż DPV.

Oznaczenia chloropromazyny na czystej złotej elektrodzie mają jeszcze inną wadę, polegającą na małej selektywności w porównaniu z kilkoma substancjami interferującymi. Odróżnienie chemicznie pokrewnych materiałów, to jest imipraminy i chloropromazyny jest możliwe, gdyż w metodzie LSV pierwszy lek nie jest widoczny. Zestawienie rezultatów badań selektywności kwasu askorbinowego, imipraminy, chloropromazyny i paracetamolu metodą LSV znajduje się na str. 157, w Tabeli 6.3 i na rys. 6.10.

Pomiary przeprowadzone na serum bydlęcym potwierdziły możliwość oznaczania chloropromazyny przy stosowanych dziennych dawkach 75 mg na dobę na pacjenta.

CHAPTER 7. CONCLUSIONS (str. 163- 167; liczba cytowanych artykułów 8). To podsumowanie jest niezależne od cząstkowych konkluzji zamieszczonych w końcowej części każdego rozdziału. Wylicza ono najważniejsze osiągnięcia Autorki, o których starałem się nie zapomnieć w przedłożonej recenzji.

Rozprawa doktorska jest napisana w języku angielskim z polskim tłumaczeniem obejmującym **CEL PRACY, STRESZCZENIE** i jeszcze kilka wybranych fragmentów. Do nich należą informacje o finansowaniu pracy z następujących źródeł:

Projekt kluczowy, współfinansowany przez UE z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego o nazwie: MIKRO- I NANO-SYSTEMY W CHEMII I DIAGNOSTYCE BIOMEDYCZNEJ

Własny projekt badawczy finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, w ramach grantu PRELUDIUM

W trakcie opracowywania rozprawy Autorka uzyskała STYPENDIUM DLA DOKTORANTÓW Biocentrum Ochota, finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w PROGRAMIE KAPITAŁ LUDZKI.

Oceniając całość stwierdzam, że Autorka opracowała skuteczniejsze od dotychczasowych metody oznaczania wybranych substancji, w tym psychotropowych. Metody są obiektywne, a ich walory zostały potwierdzone badaniami statystycznymi, poprzez wyznaczenie selektywności, granicy wykrywalności i czułości. Metody zostały wsparte szeregiem nieelektrochemicznych metod badawczych. Zaproponowane materiały czujnikowe zostały wybrane spośród nowych konstrukcji opracowanych w zespole NB IBIB PAN. Pomysł wykorzystania oligomerów DNA jako interkalatorów analitów wpisuje się doskonale w utrzymujące się od niejakiego czasu trendy polegające na zastosowaniu tego biomateriału w wielu dziedzinach wiedzy, nie tylko w analityce.

Chciałbym podkreślić bardzo dobre opracowanie literaturowe, znakomite rysunki i doskonały warsztat analityczny. Trzeba też z naciskiem podkreślić, że opracowana metoda może być względnie łatwo zaadoptowana do praktycznego stosowania, to jest do wykrywania psychotropów w płynach ustrojowych.

Znaczna część pracy została przedstawiona na międzynarodowych konferencjach i wydrukowana w materiałach zjazdowych i w czasopiśmie o raczej nieznacznym obiegu. Do tej pory w sumie Autorka opublikowała 12 prac, z których 5 z lat 2010-2015 zamieszczonych w Przeglądzie Elektrotechnicznym w ocenie MNiSW zasługuje na 79 punktów. Szkoda, że do tej pory nie zostały opublikowane trzy najważniejsze rozdziały pracy wysłane do druku w czasopiśmie o większej randze. Warto jeszcze powiedzieć, że mgr inż. J. Jankowska-

Śliwińska z okresu pracy w Instytucie Chemii Organicznej PAN opublikowała 6 prac z zakresu chemii organicznej w czasopiśmie o bardzo wysokim IF.

Przy całej redakcyjnej staranności praca nie jest pozbawiona nielicznych zresztą usterek

Wymienię tu tylko kilka, aby udowodnić, że starannie wykonałem zlecenie Rady Naukowej IBIB PAN.

I tak na str. XIV podane „fizjologiczne” stężenie chloropromazyny we krwi w granicach $(7.2 \div 14.4) \cdot 10^5$ M lekko licząc jest nierzeczywiste. Dotyczy to jednak tylko wersji polskojęzycznej. Pomijam tu stawianie kropek w miejsce przecinków w zapisie ułamków dziesiętnych, co nie powinno mieć miejsca w tekście polskim.

Str. 82: co to jest poly(dG) poly (dC) immobilizowane na GCE; skrót pochodzi z literatury?

Na rys.5.13a stężenia imipraminy podane są w nanomolach, a pod rysunkiem stężenia są 1000 razy większe.

Str. 127: założenie, że skutkiem podobieństwa imipraminy i fenotiazyny ich „adsorpcja/interkalacja” zachodzi w takim samym stopniu nie musi być prawdziwe.

Str. 132. Opis oznaczania imipraminy w płodowej surowicy bydłowej nie jest jasny. Zaczyna się od nM, a pod rysunkiem są μ M. Nachylenia są normalne?

Rys. 5.13a, po rozcieńczeniu nie wiadomo jakie jest stężenie (M). Sprawy wyjaśniają dopiero dwie linie tekstu na str. 133.

Str. 141, rys. 6.1: Schemat reakcji utleniania chloropromazyny. Tu tworzy się sulfotlenek a nie sulfon.

Tu pytanie, czy powierzchnię złota trzeba czyścić/polerować przed każdym eksperymentem?

Dwukrotnie podany jest symbol Oxidation peak current i_{pa} i i_{pc}

Angielski jest na ogół poprawny: narracja prosta, ale miejscami nieco zawiła, np. dół str. XII. Osobiście zwiększyłbym liczbę przedimków nieokreślonych. Zawsze uściślają tekst.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że rozprawa z wyraźnym nadmiarem spełnia wymagania stawianym pracom doktorskim przez Radę Naukową IBIB PAN oraz kryteria sformułowane w Ustawie o tytule i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku ze zmianami (Dz.U. z 2005 r., nr 164, poz. 1365 i Dz.U. z 2011 r., nr 84, poz. 455). Wnoszę więc do Rady Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN im. Prof. M. Nałęczca w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Joanny Jankowskiej-Śliwińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, 23.02.2016.

