

Prof. dr hab. inż. Piotr Jasiński
Wydział Elektroniki, Telekomunikacji
i Informatyki
Politechnika Gdańska
ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Remiszewskiej
pt. „Mikroukład przepływowy z detekcją optyczną do oznaczania mocznika w płynach
biologicznych”

Pismem SRN/003/121/2020 Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej Polskiej Akademii Nauk z dnia 7 lipca 2020 r. otrzymałem do recenzji rozprawę doktorską Elżbiety Remiszewskiej pt. „Mikroukład przepływowy z detekcją optyczną do oznaczania mocznika w płynach biologicznych”. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. inż. Dorota Pijanowska.

Rozprawa jest napisana po polsku i składa się z 13 rozdziałów podzielonych na 4 części: I Część literaturowa, II Cel i tezy, III Badania własne oraz IV Wyniki i dyskusja - w sumie 160 stron maszynopisu. Część I składa się z rozdziału 1 i 2 opisujących odpowiednio zagadnienia związane z charakterystyką, rolą w organizmie i pomiarami mocznika oraz zagadnieniami związanymi z układami mikroprzepływowymi. Część II formalnie bez numerowanego rozdziału jest zgodna ze swoją nazwą – celami i tezami. W części III znajduje się 6 rozdziałów: rozdział 3 opisuje zastosowane w eksperymentach odczynniki i materiały, rozdział 4 wykorzystywaną aparaturę, rozdział 5 przedstawia metodę badań, rozdział 6 opisuje stosowane w rozprawie podłoża oraz ich modyfikacje, rozdział 7 omawia konstrukcję reaktorów, zaś w rozdziale 8 opisane są zastosowane procedury oznaczania mocznika. Część IV składa się z 5 rozdziałów: w rozdziale 9 znajdują się wyniki oceny modyfikacji chemicznych podłoży, w rozdziale 10 przedstawiono wyniki optymalizacji warunków reakcji enzymatycznych i nieenzymatycznych, w rozdziale 11 opisano wyniki pomiarów w układzie przepływowym, w rozdziale 12 zebrano wyniki oznaczania mocznika w próbkach

biologicznych, zaś w rozdziale 13 znajduje się podsumowanie. Ponadto, w rozprawie znajduje się bibliografia, wykaz skrótów i symboli, streszczenie po polsku i angielsku oraz spis treści.

Problem naukowy rozprawy

Cześć II rozprawy jest poświęcona celom i tezom pracy. Autorka pisze, iż „celem badań było opracowanie metod oznaczania mocznika w hodowlach komórek pochodzenia wątrobowego *in vitro* przy użyciu detekcji optycznej, w analitycznym układzie mikroprzepływowym typu LTCC ze szczególnym uwzględnieniem etapu modyfikacji enzymu”. Ponadto, w tym samym miejscu wypunktowuje dosyć szczegółowy zakres badań do przeprowadzenia. Uważam, że cel rozprawy jest jednoznacznie postawiony. Autorka rozprawy przedstawiła również 2 hipotezy rozprawy:

- „Zaproponowana metoda unieruchamiania ureazy z wykorzystaniem wiązań kowalencyjnych do ceramicznego podłoża, analitycznego układu mikroprzepływowego, umożliwi oznaczenie mocznika w płynach biologicznych.
- Opracowany układ mikroprzepływowy do oznaczeń mocznika w płynach biologicznych umożliwi pomiary w próbkach o mikrolitrowej objętości.”

Hipotezy są nietrywialne i postawione prawidłowo. Należy w tym miejscu pochwalić Autorkę za trud postawienia hipotez, gdyż w ostatnich latach raczej manierą jest unikanie stawiania hipotez w rozprawach doktorskich.

Podejście Autora do osiągnięcia celów pracy

Autorka rozprawy podeszła do realizacji celów w sposób eksperymentalny. W pierwszej kolejności Autorka modyfikowała powierzchnie podłoża i wsadów w celu znalezienia efektywnej metody unieruchamiania enzymów za pomocą wiązania chemicznego lub adsorpcji fizycznej. Badania efektywności unieruchamiania enzymu przeprowadziła wykorzystując, między innymi, metodę potencjometrycznego oznaczania produktów reakcji hydrolizy mocznika oraz metodę spektroskopową FTIR. Na podstawie tych badań nie tylko znalazła efektywną metodę unieruchamiania enzymu, ale również wybrała materiał ceramiczny LTCC, który lepiej nadał się do tego celu niż inne. Materiał ten został wykorzystany do budowy mikroprzepływowego reaktora chemicznego. Następnie bazując na doniesieniach literaturowych wybrała metodą enzymatyczną i nieenzymatyczną oznaczania mocznika i wykonała badania optymalizacyjne stężeń i kolejności wprowadzania reagentów oraz czasu i temperatury reakcji pod kątem wydajności tych reakcji. Przy współpracy z

Politechniką Wrocławską zostały wytworzone mikroreaktory przepływowe (do pomiarów enzymatycznych i nieenzymatycznych), dla których Autorka również wykonała badania optymalizacji wydajności reakcji oznaczania mocznika. Dla zoptymalizowanych warunków wyznaczyła dla obu układów ich parametry czujnikowe. Badania próbek biologicznych przeprowadziła na lizatach komórkowych oraz pożywce pochodzącej modyfikowanych i niemodyfikowanych genetycznie komórek ludzkiego wątrobiaka linii C3A, w których znajdują się nieznacznie ilości mocznika oraz składniki zakłócające pomiary optyczne. Wyniki oznaczania mocznika porównała z testami komercyjnymi. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów udowodniła obie tezy rozprawy. Uważam, że Autorka adekwatnie podeszła do osiągnięcia celów pracy. Należy zauważyć, że podjęte w pracy zadania miały bardzo kompleksowy charakter.

Aktualność tematyki rozprawy

Rozprawa dotyczy budowy i charakteryzacji bardzo popularnych platform typu lab-on-a-chip stosowanych do analizy chemicznej i biochemicznej. Podstawową zaletą takich układów jest ich zmminiaturyzowana forma pozwalająca na ograniczenie zużycia odczynników, możliwość wykonania całego procesu biologicznego lub chemicznego w obrębie jednego układu oraz ich cena w wypadku seryjnej produkcji. Dlatego tematyka rozprawy jest aktualna i doskonale wpisuje się w rozwój przyrządów do analizy biochemicznej. Zagadnienia związane z projektowaniem i badaniem przyrządów lab-on-a-chip wchodzą w zakres tematyczny dyscypliny inżynieria biomedyczna dziedziny nauk inżynieryjno-technicznych dla klasyfikacji obowiązującej od 1 października 2018.

Rozprawa na tle współczesnych doniesień literatury

W rozprawie Autorka cytuje ponad 400 pozycji literaturowych. Cytowania obejmują klasykę literatury oraz najnowsze doniesienia. Uważam, że cytowania są właściwie dobrane i świadczą o dobrej wiedzy Autorki z zakresu rozwoju metod analitycznych oraz współczesnej literatury z dyscypliny naukowej dotyczącej rozprawy.

Wady, słabe strony rozprawy oraz inne uwagi

Rozprawa napisana jest starannie i bez błędów językowych i interpunkcyjnych. Autorka przyjęła typowo publikacyjny podział opisu, w którym część opisu warunków eksperymentu jest w osobnym rozdziale, a wyniki w osobnym. To skutkuje tym, że bardzo

często należy wracać do rozdziału z opisem warunków eksperymentu czytając rozdział opisujący wyniki. Odniosłem wrażenie, że tok przyczynowo - skutkowy w opisie wyników jest zaburzony, gdyż opis wyników eksperymentów na potrzeby oznaczania enzymatycznego i nieenzymatycznego mocznika miesza się wzajemnie w rozprawie. W rozprawie nie zauważyłem błędów merytorycznych. Czytając rozprawę doktorską nasunęło mi się kilka pytań:

- Autorka do porównania efektywności wiązania enzymu do różnych powierzchni użyła metody potencjometrycznej oznaczeń mocznika. Do porównania różnych metod unieruchamiania enzymu na badanym podłożu najczęściej posługiwała się różnicą wartości pH dla próbki o stężeniu mocznika 0,74 M oraz 0 M (proszę mnie poprawić, jeżeli źle zrozumiałem). Wartości umieszczone w rozprawie są zmienne i dla dobrego wiązania enzymu są bliskie 3. Na rysunku 9.11 wartości osiągają nawet wartości bliskie 3,5. Czy jest możliwe oszacowanie wartości teoretycznej? Przy okazji krzywe kalibracji na rysunku 9.14 są przesunięte na osi y o wartość pH~6 w porównaniu do np. rysunku 9.9. Zapewne oznaczenie osi y na tym rysunku powinno być inne.
- w rozprawie brakuje mi informacji, ile układów LTCC Autorka miała szansę przebadać? Czy każdy wymaga indywidualnej kalibracji? Jak długo enzym może być skutecznie wykorzystywany i czy jest możliwa powtórna funkcjonalizacja reaktora enzymem?
- na stronach 96-97 Autorka przedstawia wyniki badań składu chemicznego modyfikowanych podłoży krzemowych metodą ToF-SIMS. Na rysunku 9.1. przedstawia wyniki analizy 2 składowych głównych PCA widma masowego, zaś w tabeli 9.2. porównanie gęstości rozkładu wybranych cząstek w formie zjonizowanej. Autorka wyjaśnia, że gęstości rozkładu są odwzorowaniem procentowej jasności skali barwnej. Proszę o wyjaśnienie z jakich zdjęć (?) została przeprowadzona ta analiza.
- na stronie 72 Autorka opisuje proces tworzenia kulek PAN. Z opisu jednak nie wynika na jakim etapie kulki się tworzą. Proszę o uściślenie.

Wskazane pytania nie umniejszają jakości naukowej recenzowanej pracy i mają charakter uściślający.

Oryginalny dorobek Autora

Do oryginalnego dorobku Autorki zaliczam:

- Badania związane z opracowaniem i przebadaniem analitycznych układów mikroprzepływowych typu LTCC do enzymatycznego i nieenzymatycznego oznaczania mocznika o mikrolitrowej objętości w lizatach komórkowych oraz pożywce pochodzącej modyfikowanych i niemodyfikowanych genetycznie komórek ludzkiego wątrobiaka linii C3A.

Autorka rozprawy posiada dorobek publikacyjny, który potwierdza jej samodzielność naukową. Zgodnie z bazą Scopus Autorka rozprawy w trakcie swojej kariery naukowej została współautorem 8 publikacji, z których w 2 jest współautorem wiodącym. Większość publikacji jest ściśle związana z tematem rozprawy. Między innymi, Autorka jest współautorem 3 publikacji w czasopiśmie *Sensors and Actuators, B: Chemical* (IF=7,1), w tym tej, w której jest współautorem wiodącym.

Podsumowanie

Uważam, że rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i wnoszę o jej dopuszczenie do publicznej obrony.



Gdańsk, 30.10.2020 r.

Piotr Jasiński