

Warszawa 14 sierpnia 2025

**Recenzja Rozprawy Doktorskiej magister inżynier Anny Magdaleny Szymczyk-Drozd
pt: „Projektowanie narzędzi (bio)analitycznych wykorzystujących kwasy nukleinowe –
od oddziaływań molekularnych do zastosowań praktycznych”**

Postępy w dziedzinie biotechnologii umożliwiają pozyskiwanie specyficznych i stabilnych receptorów, które wykorzystywane są do rozpoznawania szerokiej gamy analitów. Większy dostęp do nowych materiałów i technologii zapewnia zaś możliwość udoskonalenia konstrukcji sensorów, m. in. w zakresie stosowanych przetworników sygnału oraz możliwości modyfikacji ich powierzchni w celu uzyskania stabilnych warstw receptorowych. Prace nad tego typu urządzeniami trwają od dawna i zaowocowały wprowadzaniem na rynek szeregu sensorów i testów stosowanych w diagnostyce medycznej zarówno w ośrodkach zdrowia, jak i w domach oraz monitoringu parametrów środowiskowych tj. badania jakości powietrza czy wody. Sprostanie współczesnym wymaganiom odnośnie selektywności, miniaturyzacji, dostępności i powszechności stosowania takich urządzeń oraz poszerzające się zapotrzebowanie na oznaczenia nowych analitów stawia nowe wyzwania i konieczność prowadzenia dalszych prac. Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej magister inżynier Anny Magdaleny Szymczyk-Drozd zatytułowana „Projektowanie narzędzi (bio)analitycznych wykorzystujących kwasy nukleinowe – od oddziaływań molekularnych do zastosowań praktycznych” wykonane w Katedrze Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem dra hab. inż. Roberta Ziółkowskiego, profesora uczelni wpisują się więc w ten trend. W trakcie swoich badań Doktorantka pracowała nad udoskonalaniem pracy sensorów elektrochemicznych i poprawie ich parametrów metrologicznych. Wykorzystała krótkie sekwencje DNA jako receptory do rozpoznawania wybranych fragmentów genów wirusa SARS-CoV-2, czy wybranych jonów metali i niemetalu. Opisała wpływ: rodzaju cząsteczki wypełniacza na stabilność warstwy receptorowej i oddziaływanie białek w próbkach złożonych z warstwą receptorową; składu elektrolitu na zmiany konformacyjne warstwy receptorowej i znaczenie długości sekwencji oligonukleotydu na odpowiedź sensora; rodzaju przetwornika sygnału na stabilność i

powtarzalność uzyskiwanych odpowiedzi prądowych, czy właściwości powierzchni materiałów stosowanych do wydzielania kwasów nukleinowych i oczyszczania próbek biologicznych o złożonym składzie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska to seria pięciu powiązanych tematycznie publikacji, w których mgr inż. Anna Szymczyk-Drozd jest pierwszym autorem, co wraz z treścią załączonych oświadczeń współautorów wskazuje na jej znaczący wkład w ich powstanie. Zauważyłam jednak rozbieżności w oświadczeniu Doktorantki i informacjach o wkładzie współautorów w powstanie dwóch publikacji, które ukazały się w International Journal of Molecular Sciences, proszę o komentarz. Wyniki prac badawczych ukazały się w uznanych czasopismach z zakresu chemii analitycznej, tj. Microchimica Acta i Sensors and Actuators B oraz badań multidyscyplinarnych, tj. International Journal of Molecular Sciences i Measurement w latach 2022-2025, dwie spośród nich są chętnie cytowane przez niezależne zespoły badawcze.

Cykl publikacji poprzedzony jest krótkim, ale wyczerpującym przeglądem literaturowym, który wprowadza czytelnika w zagadnienia stanowiące podstawę prowadzonych w ramach rozprawy badań naukowych oraz aktualny stan wiedzy w zakresie dotyczącym biosensorów wykorzystujących oligonukleotydy jako receptory z detekcją elektrochemiczną. Doktorantka zwróciła szczególną uwagę na różne strategie wykorzystywane do oznaczania analitu, w tym metody bezznacznikowe, z użyciem próbników redoks w roztworze i znakowania receptora bądź analitu. Dokładnie opisała mechanizmy oddziaływań receptora z powierzchnią przetwornika sygnału jak i z analitem oraz pozostałymi składnikami próbek środowiskowych i biologicznych. Wskazała zalety i wady wykorzystywanych podejść oraz wyzwania jakim należy sprostać przy konstrukcji sensorów dedykowanym do oznaczeń analitów w próbkach złożonych, wykonywanych poza laboratorium analitycznym umożliwiające selektywne wykrywanie niskich stężeń badanych substancji. Krytyczne uwagi do istniejących rozwiązań wskazują, że posiada niezbędną wiedzę do prowadzonych przez siebie badań.

Następnie Doktorantka jasno sformułowała cel badań, którym było poprawienie parametrów metrologicznych biosensorów opartych na warstwie receptorowej zawierających sekwencje oligonukleotydów: komplementarne z charakterystycznymi fragmentami genów wirusa SARS-CoV-2 i bakterii *Corynebacterium diphtheriae* lub rozpoznające kationy rtęci(II) i aniony selenianowe(VI).

W kolejnym rozdziale zawarła komentarz do cyklu publikacji stanowiącego rozprawę doktorską. W dalszym ciągu przedstawiła zwięzłe podsumowanie prowadzonych przez siebie badań wraz z wypunktowanymi siedmioma najważniejszymi osiągnięciami oraz planem dalszych prac.

Manuskrypty wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały już poddane polemice i ocenie zarówno recenzentów, jak i edytorów podczas procesu publikacyjnego, dlatego pozwolę sobie je tylko krótko przedstawić i skomentować.

W publikacji P1 zatytułowanej „Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem-loop based electrochemical DNA sensor parameters” (A. Szymczyk, K. Soliwodzka, M. Moskał, K. Różanowski, R. Ziółkowski; *Sensors and Actuators: B. Chemicals* 354, 2022, 131086) Doktorantka skupiła się na opracowaniu stabilnej warstwy receptorowej zapewniającej możliwość selektywnego oznaczania analitu o niskim stężeniu w próbkach biologicznych. W tym celu przebadła cztery różne grupy związków chemicznych stosowanych jako elementy blokujące powierzchnię elektrody pomiędzy unieruchomionymi receptorami. Zastosowała merkapto pochodne alifatycznych alkoholi o różnej długości łańcucha węglowego wykazujące częściowy ładunek ujemny, cysteaminę – o częściowym ładunku dodatnim, dietyloditiokarbaminian sodu – obojętną cząsteczkę i tiolowe pochodne z pierścieniami aromatycznymi – zdolne do oddziaływań typu π - π . Po szczegółowej analizie wykazała, że w przypadku rozpoznawania sekwencji nukleotydów bakterii *Corynebacterium diphtheriae* odpowiedzialnej za wywołanie błonicy najniższe stężenia analitu wykryto przy użyciu dietyloditiokarbaminianu sodu w warstwie receptorowej jako wypełniacza. Ponadto zastosowanie tego związku do blokowania powierzchni elektrody zapewniło stabilność warstwy i ograniczyło niespecyficzną adsorpcję białek.

W publikacji P2 „Practical aspects of SAM-based electrochemical DNA biosensors on miniaturized planar gold transducers: A case study with SARS-CoV-2” (A. Szymczyk-Drozd, D. Baran, A. Skiba, A. Zasada, E. Mosiej, J. Krzemiński, A. Peplowski, E. Malinowska, R. Ziółkowski; *Measurement* 250, 2025, 117212) przebadano wpływ przygotowania powierzchni elektrody na oznaczanie fragmentów genu wirusa SARS-CoV-2 za pomocą receptora DNA. W tym celu w pierwszej kolejności zaprojektowano sekwencje nukleotydów i przeprowadzono badania wstępne na klasycznych złotych elektrodach dyskowych. W kolejnych etapach opracowano skład

buforu do prowadzenia hybrydyzacji w celu zminimalizowania oddziaływań niespecyficznych z białkami obecnymi w próbkach po reakcji amplifikacji DNA. Opracowanie warunków do satysfakcjonujących oznaczeń pozwoliło na zastąpienie klasycznych elektrod zminiaturyzowanymi przetwornikami, w których warstwa złota została naniesiona za pomocą sitodruku lub osadzania metalu z fazy gazowej (PVD). Szczegółowa analiza powierzchni przetwornika sygnału pozwoliła wnioskować, że elektrody przygotowane metodą PVD mogą być z powodzeniem stosowane do przygotowania przenośnych, zminiaturyzowanych biosensorów DNA charakteryzujących się dobrymi parametrami metrologicznymi.

Praca P3 „Identification of medium- and mechanism-related pitfalls towards improved performance and applicability of electrochemical mercury(II) aptasensors” (A. Szymczyk, M. Popiołek, J. Krzemiński, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska; *Microchimica Acta*, 2024, 191:189) opisuje systematyczne badania poświęcone zaprojektowaniu sekwencji fragmentu DNA – receptora, określeniu mechanizmu oddziaływania analitu z receptorem, składu buforu pomiarowego, selektywności i regeneracji układu. Ciekawym rozwiązaniem było zastosowanie EDTA do regeneracji i przechowywania sensora co dodatkowo umożliwiło obniżenie granicy detekcji jonów rtęci(II) do wartości pikomolowych. Opracowane rozwiązanie udało się z powodzeniem zaimplementować do układu zminiaturyzowanego z elektrodami otrzymanymi metodą PVD i dokonać pomiaru analitu w próbkach rzeczywistych.

W pracy P4 „Aptamer and Electrochemical Aptasensor towards Selenate Ions (SeO_4^{2-})” (A. Szymczyk, M. Popiołek, D. Baran, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25, 6660) Doktorantka opracowała biosensor zdolny do wykrywania jonów selenianowych(VI) na bazie fragmentu DNA uzyskanego w procesie SELEX. Ponownie wykonała systematyczne badania, które doprowadziły do określenia mechanizmu oddziaływania receptora z analitem, doboru optymalnych warunków pomiarowych w tym stosowanego buforu, pH i substancji umożliwiającej regenerację układu. W konsekwencji uzyskała selektywny i stabilny biosensor zdolny do oznaczeń wybranego analitu w próbkach rzeczywistych.

Publikacja P5 „Comparative Evaluation of Different Surface Coatings of Fe_3O_4 -Based Magnetic Nano Sorbent for Applications in the Nucleic Acids Extraction” (A. Szymczyk, M. Drozd, A. Kamińska, M. Matczuk, M. Trzaskowski, M. Mazurkiewicz-Pawlicka, R. Ziółkowski, E.

Malinowska, International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, 8860) poświęcona jest opracowaniu szybkiej i skutecznej metody izolacji kwasów nukleinowych z próbek o złożonej matrycy. W tym celu Doktorantka wykorzystwała modyfikowane powierzchniowo nanocząstki magnetyczne, które można łatwo usunąć z zawiesiny przy użyciu magnesu. Nanocząstki tlenku żelaza(II,III) zmodyfikowała za pomocą różnych materiałów, tj. kationowy polimer, krzemionka, tlenek grafenu czy złoto. Umożliwiło to wykorzystanie szeregu typu oddziaływań DNA z powierzchniami o różnych właściwościach fizykochemicznych. Systematyczne badania pozwoliły na ustalenie optymalnych składów buforów w procesie adsorpcji i desorpcji DNA z powierzchni nanocząstek.

W trakcie lektury niniejszego doktoratu znalazłam kilka kwestii do dyskusji:

W pracy P1 jak i w komentarzu do niej zabrakło wytłumaczenia zachowania elektrody modyfikowanej dietyloditiokarbaminianem sodu. Dlaczego powierzchnia elektrody złotej modyfikowana tym związkiem zmienia tak drastycznie swoje właściwości – opór (Fig 8 ii w pracy P1). Dla ilu egzemplarzy modyfikowanych tym związkiem elektrod został powtórzony ten eksperyment? Generalnie w tej publikacji brak informacji czy prezentowane wyniki uzyskano z pojedynczych pomiarów, czy były one kilkakrotnie powtarzane. Kolejne pytanie dotyczy słupków błędów na Fig 6 i 7, czy uzyskane były dla kilkunastu pomiarów na tej samej elektrodzie, czy dla kilku niezależnie modyfikowanych egzemplarzy?

W pracy P1 zamieszczono stwierdzenie „mechanizm staje się mniej wydajny”, które moim zdaniem jest niepoprawne. Mechanizm nie może być wydajny lub niewydajny, a jedynie procesy które opisują mechanizm mogą zmieniać wydajność. Proszę o komentarz do ostatniego zdania na stronie 8 w drugiej kolumnie?

W publikacji P2 dyskutowany jest wpływ stężenia buforu MOPS i dodatku jonów diwodorofosforanowych na odpowiedź sensora. Na Fig 4 przedstawione są wyniki w zakresie od 0,01 mM do 10 mM MOPS, natomiast na stronie 14 manuskryptu Doktorantka stwierdziła, że do dalszych badań użyty zostanie bufor o składzie 100 mM MOPS i 1 mM NaH_2PO_4 . Proszę o sprecyzowanie.

Ponadto w manuskrypcie bardzo szczegółowo opisano wszystkie eksperymenty i krzywe za wyjątkiem tych na Fig 7c. Proszę o komentarz odnośnie różnicy potencjałów redoks dla dyskowej i zminiaturyzowanej elektrody złotej.

Czy zminiaturyzowany układ pomiarowy prezentowany w publikacji P2 jest wielokrotnego użytku?

Dlaczego w pracy P2, P3, P4 nie wykorzystano dietyloditiokarbaminian sodu jako elementu wypełniającego powierzchnię elektrody pomiędzy unieruchomionymi receptorami?

W publikacji P5 Doktorantka otrzymała nanocząstki magnetyczne pokryte APTES o średnicy powyżej 160 nm. Moje oszacowanie na podstawie obrazów SEM przedstawionych na Fig 4 dają znacznie inne wartości średnic dla nanocząstek (np. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTS}$ ok 60 nm, zaś $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ ok 20 nm i bare Fe_3O_4 ok 30 nm) niż te zawarte w tabeli pod tym rysunkiem. Czy średnice dla wszystkich typów nanocząstek były uzyskiwane na podstawie zdjęć zamieszczonych w manuskrypcie? Proszę o komentarz.

Podsumowanie

Po zapoznaniu się z treścią rozprawy doktorskiej mogę jednoznacznie stwierdzić, że Doktorantka posiada merytoryczne przygotowanie do prowadzonych przez siebie badań. Przemawia za tym dobrze napisany wstęp, komentarz do cyklu publikacji wraz z podsumowaniem. We wszystkich publikacjach zaprezentowane zostały systematyczne badania, które zaplanowano metodologicznie oraz wykorzystano odpowiednie techniki pomiarowe. Jest to niezmiernie ważne ze względu na interdyscyplinarny charakter przedstawionych badań. W mojej ocenie Doktorantka zaproponowała oryginalny biosensor do oznaczeń jonów selenianowych(VI) na bazie fragmentu DNA uzyskanego w procesie SELEX oraz poszerzyła stan wiedzy o nowe rozwiązania, które mogą być stosowane do przygotowania zminiaturyzowanych biosensorów charakteryzujących się dobrymi parametrami metrologicznymi. Zawarte w tej recenzji krytyczne uwagi nie wpływają na pozytywną ocenę niniejszej pracy. W związku z powyższym, uważam, że rozprawa doktorska magister inżynier Anny Magdaleny Szymczyk-Drozd pt. „Projektowanie narzędzi (bio)analitycznych wykorzystujących kwasy nukleinowe – od oddziaływań molekularnych do zastosowań praktycznych” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571). Na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Anny Magdaleny Szymczyk-Drozd do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

