

Prof. dr hab. inż. Dorota G. Pijanowska
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcz PAN
ul. Księcia Trojdena 4, 02-109 Warszawa
E-mail: dpijanowska@ibib.waw.pl

Warszawa 5.09.2022r.

Recenzja w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego dr. inż. Robertowi Ziółkowskiemu

Podstawą sporządzenia recenzji jest udział w Komisji habilitacyjnej, jako recenzenta wyznaczonego przez Radę Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej, uchwałą nr 189/22/2022 ws. przeprowadzenia postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego dr. inż. Robertowi Ziółkowskiemu, wszczętego w dniu 11 kwietnia 2022 roku w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Jednostka prowadząca postępowanie habilitacyjne: Politechnika Warszawska

Tytuł osiągnięcia naukowego: *Projektowanie i parametry pracy elektrochemicznych (bio)sensorów oraz przykłady ich wykorzystania, ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki zakażeń bakteryjnych*

Po przeanalizowaniu dokumentacji złożonej przez Habilitanta, odnoszącej się do osiągnięcia naukowego, zawierającej następujące dokumenty podstawowe: autoreferat w języku polskim i angielskim; wykaz opublikowanych prac naukowych; ww. cykl publikacji oraz pozostałą dokumentację przygotowaną zgodnie z przepisami, stwierdzam, że otrzymane dokumenty stanowią wystarczający materiał do dokonania analizy dorobku naukowego w przewodzie habilitacyjnym. Spełniają one wymogi formalne w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

1. INFORMACJE OGÓLNE

Dr inż. Robert Ziółkowski ukończył studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, w roku 2005 na kierunku technologia i biotechnologia środków leczniczych broniąc pracę zatytułowaną: „*Analiza fenotypowa i genotypowa populacji enterokoków opornych na wankomycynę (VRE) izolowanych u ludzi w Polsce w latach 2002-2004*”, której promotorem była dr Hanna Jaworowska-Deptuch. Stopień doktora nauk technicznych w dyscyplinie nauki chemiczne został nadany uchwałą Rady Wydziału Chemicznego PW w roku 2013, na podstawie rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „*Badania warstw receptorowych biosensorów zawierających oligonukleotydy*”, której promotorem była prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska.

2. OCENA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ UBIEGANIA SIĘ O STOPIEŃ DOKTORA HABILITOWANEGO

Przedłożone przez Habilitanta osiągnięcie naukowe będące podstawą postępowania, zatytułowane „*Projektowanie i parametry pracy elektrochemicznych (bio)sensorów oraz przykłady ich wykorzystania, ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki zakażeń bakteryjnych*”, jest w postaci cyklu 10 powiązanych tematycznie artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach indeksowanych w bazie w Journal Citation Reports (JCR), spełniający wymagania ustawowe (art. 219 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dn. 20 lipca 2018 r.). W szczególności są artykuły opublikowane w czasopiśmie: J Electrochemical Soc. (3 artykuły z roku 2018 – IF 3,12; 2016 – IF 3,259; 2019 – IF 3,721), Microchemical J (1 art. z roku 2020 – IF 4,821), Bioelectrochemistry (1 art. z roku 2020 – IF 5,373), Talanta (1 art. z roku 2021 – IF 6,057), Electrochimica Acta (1 art. z roku 2019 – IF 6,215), Sensors Actuators, B Chemical (2 artykuły z roku 2017 i 2022 - IF 5,938 i 7,46). Poniżej ww. cykl 10 artykułów:

- [H1] Szymczyk A, Soliwodzka K, Moskal M, Rożanowski K, Ziółkowski R. Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem-loop based electrochemical DNA sensor parameters, *Sensors Actuators, B Chem.*, 2022;354:131086.
- [H2] Marchlewicz K, Ostrowska I, Oszwałdowski S, Zasada A, Ziółkowski R, Malinowska E. Molecular diagnostic of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strain by DNA sensor potentially suitable for electrochemical point-of-care diagnostic. *Talanta*. 2021;227.
- [H3] Ziółkowski R, Jarczewska M, Gorski Ł, Malinowska E. From small molecules toward whole cells detection: Application of electrochemical aptasensors in modern medical diagnostics. *Sensors (Switzerland)*. 2021;21(3):1-49.
- [H4] Ziółkowski R, Oszwałdowski S, Kopyra KK, Zacharczuk K, Zasada AA, Malinowska E. Toward Fluorimetric-Paired-Emitter-Detector-Diode test for *Bacillus anthracis* DNA based on graphene oxide. *Microchem J*. 2020;154.
- [H5] Ziółkowski R, Kaczmarek A, Kośnik I, Malinowska E. Reduced nonspecific protein adsorption by application of diethyldithiocarbamate in receptor layer of diphtheria toxoid electrochemical immunosensor. *Bioelectrochemistry*. 2020;132.
- [H6] Ziółkowski R, Uścińska A, Mazurkiewicz-Pawlicka M, Małolepszy A, Malinowska E. Directly-thiolated graphene based electrochemical sensor for Hg(II) ion. *Electrochim Acta*. 2019;305:329-337.
- [H7] Ziółkowski R, Jarczewska M, Drozd M, Zasada AA, Malinowska E. Studies on the development of electrochemical immunosensor for detection of diphtheria toxoid. *J Electrochem Soc*. 2019;166(6):B472-B481.
- [H8] Ziółkowski R, Oszwałdowski S, Zacharczuk K, Zasada AA, Malinowska E. Electrochemical detection of *bacillus anthracis* protective antigen gene using DNA biosensor based on stem-loop probe. *J Electrochem Soc*. 2018;165(5):B187-B195.
- [H9] Ziółkowski R, Gorski Ł, Malinowska E. Carboxylated graphene as a sensing material for electrochemical uranyl ion detection. *Sensors Actuators, B Chem*. 2017;238:540-547.
- [H10] Jarczewska M, Sheelam SR, Ziółkowski R, Gorski Ł. A label-free electrochemical DNA aptasensor for the detection of dopamine. *J Electrochem Soc*. 2016;163(3):B26-B31.

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) artykułów stanowiących cykl wynosi 49,537, natomiast łączna liczba cytowań – 94. W dziewięciu z wyżej wymienionych 10 artykułów wieloautorskich, Habilitant jest autorem korespondencyjnym, i jednocześnie w 7 z nich - pierwszym autorem. Jeden z artykułów jest artykułem przeglądowym, pozostałe to publikacje oryginalne prezentujące wyniki badań własnych. Wkład Habilitanta w ww. publikacje jest znaczący, oceniony procentowo od 80% do 35%, zgodnie z wymaganymi oświadczeniami współautorów. Należy podkreślić, iż we wszystkich oświadczeniach dotyczące wkładu w powstanie artykułów występuje informacja, iż Habilitant jest autorem, w jednym przypadku współautorem, koncepcji badań.

Tematyka, którą zajmuje się Habilitant, jest nowoczesna, spójna i ukierunkowana na opracowanie różnego typu elektrochemicznych układów (bio)czujnikowych do oznaczeń wybranych analitów, włączając nowe biomarkery stosowane w diagnostyce zakażeń bakteryjnych. Występuje rozdzielnosc zakresu tematyki badań prowadzonych w ramach

rozprawy doktorskiej i po uzyskaniu stopnia doktora. Habilitant trafnie zdefiniował kilka wyzwań związanych z opracowaniem elektrochemicznych bioczuźników opartych na (i) DNA, w tym wykorzystujących aptamery DNA (aptaczuźniki) do oznaczeń wybranych analitów, np. dopaminy - neuroprzekaźnika [H10] i wykrywania określonych genów (genoczuźniki), np. genu *pogA* bakterii *Bacillus Anthracis* [H8, H4] i genu *tox* bakterii *Corynebacterium diphtheriae* [H2] oraz (ii) przeciwciałach (immunoczuźniki) do oznaczeń toksoidu błoniczego - dezaktywowanego, toksycznego białka, które w formie aktywnej występuje w zakażeniu bakterią maczugowca błonicy [H7, H5]. Wyzwania te dotyczą poprawy parametrów metrologicznych apta-, geno- oraz immunoczuźników, którą uzyskano głównie dzięki zastosowaniu nanomateriałów lub nowych niereceptorowych składników warstwy czulej, w tym nanocząstek i nanosfer Au oraz grafenu i jego grafenu [H10, H7, H5, H4, H1]. Dodatkowym, raczej nie aspektem osiągnięcia jest wprowadzenie funkcjonalizowanego grafenu jako warstwy receptorowej do oznaczeń jonów rtęci i uranowych (Hg^{2+} i UO_2^{2+}) [H6, H9].

Tego rodzaju narzędzia analityczne są szczególnie poszukiwane ze względu na łatwość ich wykorzystania w badaniach przesiewowych, w warunkach poza laboratorium analitycznym.

Habilitant zaplanował całościową identyfikację zakażeń bakteryjnych, która obejmuje określenie szczepu bakterii oraz ocenę zjadliwości. W przypadkach analizowanych gram-dodatnich tlenowych bakterii laseczki wąglika (*Bacillus anthracis*) i maczugowca błonicy (*Corynebacterium diphtheriae*) identyfikowane były sekwencje markerowe (1) fragment genu *pogA*, o długości 107 nukleotydów, będącego markerem możliwej infekcji laseczką wąglika i jego potencjalnej zjadliwości [H8, H4] oraz (2) kodującej fragment genu toksyny błoniczej maczugowca błonicy, *tox*, o długości 82 nukleotydów [H2]. W przypadku maczugowca błonicy przeprowadzono również ocenę zjadliwości szczepu poprzez potwierdzenie obecności produkowanego patogenu białkowego - toksoidu błoniczego (białka dezaktywowanego) z wykorzystaniem immunoczuźników [H5, H7].

Dr Ziółkowski prezentuje systematyczne i skrupulatne podejście do planowania i prowadzenia badań, co pozwoliło uzyskać szereg nowych informacji, do których można zaliczyć:

(i) identyfikację czynników zaburzających rozpoznawanie jednoniciowego DNA na powierzchni przewodzącej bioczuźnika – szczególnie istotne w przypadku genoczuźników, w tym:

- optymalizację warunków pomiaru z wykorzystaniem czuźników opartych na DNA, w tym dobór stężenia jonów magnezu i rozpuszczalnika organicznego (w tym DMSO) w buforze pomiarowym, dobór czasu i temperatury hybrydyzacji;
- zaprojektowanie długoniciowych aptamerów o strukturze tzw. spinki do detekcji produktów asymetrycznego PCR;

(ii) wprowadzenie odpowiednich modyfikacji powierzchni i nanomateriałów o wysokiej aktywności elektrochemicznej, stosowanych jako czynniki rozwijające powierzchnię, kompensujące zmniejszanie wymiarów geometrycznych czuźników, w celu poprawy parametrów elektrochemicznych bioczuźników, w tym

- ocena wpływu składników niereceptorowych na odpowiedź (bio)czuźników w szczególności czynników blokujących (wypełniaczy), z uwzględnieniem ładunku elektrycznego unieruchamianych cząsteczek i ich orientacji przestrzennej względem powierzchni, m.in. pochodne tiolowe alkanoli posiadających częściowy ładunek ujemny (6-merkapto-1-

heksanol, MCH i 2-merkaptotanol, MCE) i częściowy ładunek dodatni (cysteamina, CHC), cząsteczki obojętne o strukturze rezonansowej (dietyloditiokarbaminian sodu, DEDTC) oraz związki aromatyczne, wykazujące zróżnicowane ukierunkowanie przestrzenne w stosunku do płaszczyzny elektrody (prostopadłe – fenyloetylotiol, 2-PhET i poziome, 1,3-benzenoditiol, BDT);

- wprowadzenie nowego środka blokującego elektrody – dietyloditiokarbaminianu posiadające dwie struktury rezonansowe, zmniejszającego niespecyficzną adsorpcję białek na powierzchni czujnika oraz zapewniającego większe przewodnictwo elektryczne w odniesieniu do warstw receptorowych z innymi wypełniaczami;
- wyjaśnienie niespecyficznego odpowiedzi genoczujującego aptamerem w postaci struktury spinki do włosów przy użyciu ww. nowego środka blokującego elektrody DEDTC;
- przygotowanie pochodnych grafenu i ich wykorzystanie jako warstw receptorowych w elektrochemicznych czujnikach opartych na DNA do oznaczeń jonów Hg^{2+} i UO_2^{2+} ;
- badania oddziaływań π - π między jednoniciowymi sekwencjami DNA i grafenem w celu zastosowania grafenu we fluorescencyjnych testach DNA z detekcją elektrochemiczną - genoczujujących do wykrywania genu *pogA* laseczki wąglika, w których wykorzystano zjawisko indukowanego wygaszania fluorescencji w wyniku adsorpcji fluorochromu na powierzchni grafenu; w tym przypadku podczas hybrydyzacji z komplementarną nicią DNA zachodzi z jednoczesną desorpcją sond DNA z powierzchni grafenu, co powoduje wzbudzenie fluorescencji.

Do grupy osiągnięć można zaliczyć również propozycję pełnej elektrochemicznej diagnostyki błonicy. Niewątpliwym atutem jest przeprowadzenie badań w próbkach rzeczywistych, które zostały uzyskane we współpracy z Narodowym Instytutem Zdrowia Publicznego.

Ponieważ artykuły stanowiące osiągnięcie naukowe Habilitanta są z okresu od 2016-2022 roku, dobrze byłoby aby w autoreferacie przegląd literatury był uzupełniony najnowszą literaturą przedmiotu oraz aby pojawiła się dyskusja wyników badań. Ogólny przegląd stanu badań dotyczący zastosowania aptaczujujących w diagnostyce medycznej został zamieszczony w artykule [H3]. Jednak przegląd ten nie wyczerpuje dyskusji wyników, która jest w skazana w tego rodzaju opracowaniach.

Należy dodać, że metodyka badawcza, którą posługuje się dr R. Ziółkowski jest bardzo rozbudowana, zaczynając od metod elektrochemicznych znacznikowych, metod bezznacznikowych, w tym metoda elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej, mikrowaga kwarcowa, czy też immunotesty i metody związane z projektowaniem aptamerów, modyfikacji powierzchni, syntezy nanomateriałów.

Podsumowując, podejście Habilitanta do badań w ww. zakresie jest całościowe, analizując badania przedstawione w cyklu publikacji można prześledzić sposób myślenia, planowania eksperymentów i jego rozwój naukowy. Kolejne działania podejmowane w poszczególnych etapach badań, które nie zostały wyraźnie wskazane w autoreferacie, są dobrze ukierunkowane i świadczą o dojrzałości naukowej pozwalającej na właściwą analizę wyników badań, ich ocenę i wnioski, potwierdzając samodzielność badawczą Habilitanta.

Badania prowadzone przez Habilitanta mają wpływ na rozwój geno- i immunoczujujących elektrochemicznych do diagnostyki zakażeń bakteryjnych, które ze względu na prostotę mogą być wykorzystane w bioanalitycznych układach diagnostycznych typu point-of-care.

Uwagi ogólne

Tytuł osiągnięcia *Projektowanie i parametry pracy elektrochemicznych (bio)sensorów oraz przykłady ich wykorzystania, ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki zakażeń bakteryjnych* niezbyt dobrze odzwierciedla zawartość merytoryczną osiągnięcia, nie zwraca bowiem uwagi na główne aspekty naukowe badań przeprowadzonych przez Habilitanta.

Organizacja autoreferatu jest mało przejrzysta ze względu na omawianie poszczególnych artykułów cyklu w wykazie podanych w porządku chronologicznym, lepsze byłoby wprowadzenie w postaci syntetycznego ujęcia kierunków i wyników badań całościowo pokazujące sposób planowania eksperymentów i uzyskanych wyników.

W autoreferacie pojawiają się niedociągnięcia językowe w postaci skrótów myślowych, używania żargonu lub języka potocznego oraz nieprecyzyjne sformułowania, np.:

- str. 14: żargon - „intensywności uzyskiwanego sygnału analitycznego”
- str. 15: „zmniejszenie oporu elektrody i *sprawniejsza wymiana* elektronów”, „...stanowią miejsca wprowadzania elektronów w naniesioną warstwę nanomateriału”;
- str. 18: skrót myślowy - „obliczone zagęszczenie sond”;
- str. 21: „intensywność emisji fluorescencji” zamiast natężenie promieniowania fluorescencyjnego;
- str. 40: „elektrochemicznej impedancji spektroskopowej” zamiast elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej;
- str. 51: „udowodnienie możliwości” zamiast wykazanie możliwości bądź wskazanie możliwości – zależnie od kontekstu.

3. OCENA DOROBKU NAUKOWEGO HABILITANTA

Dorobek Habilitanta po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje:

- 9 artykułów, niebędących podstawą postępowania, opublikowanych w czasopismach recenzowanych indeksowanych w bazie w Journal Citation Reports (JCR) niebędących podstawą postępowania oraz 6 artykułów w czasopismach recenzowanych spoza bazy JCR;
- 46 referatów opublikowanych w materiałach konferencyjnych, w tym 19 – referatów prezentowanych przez Habilitanta i 17 - których Habilitant jest pierwszym autorem.
- współautorstwo 3 rozdziałów w monografiach naukowych, wydanych przez wydawnictwa naukowe PWN i Springer, w latach 2020 i 2022.

Natomiast przed uzyskaniem stopnia doktora, Habilitant opublikował 6 artykułów w czasopismach indeksowanych w bazie JCR i 2 artykuły w czasopismach recenzowanych spoza listy JCR. Sumaryczny współczynnik wpływu czasopism, w których zostały opublikowane artykuły Habilitanta wynosi 99,558 (IF z roku publikacji), w tym po uzyskaniu stopnia doktora – 81,046. Całkowita liczba cytowań, podana przez Habilitanta we wniosku, wynosi 300 (bez autocytowań - 271), indeks Hirsha – 10.

Podsumowując, dorobek publikacyjny dra R. Ziółkowskiego jest bardzo dobry, a parametry bibliometryczne Habilitanta, w tym liczba cytowań, świadczą o zauważalności jego publikacji w międzynarodowym środowisku naukowym.

Aktywność projektowa Habilitanta jest duża. Habilitant brał udział w 10 projektach badawczych (4 projekty finansowane przez NCBiR, 4 - NCN, 1 - FNP i 1 – MNiSW), w 2 z siedmiu zakończonych projektów pełnił rolę kierownika. Natomiast w 2 z trzech projektów będących w trakcie realizacji, finansowanych przez NCBiR w programach Techmatstrateg, POIR (współpraca z sektorem gospodarczym) i Tango, jest kierownikiem zadań.

Dr Ziółkowski od czasu uzyskania stopnia doktora jest związany z uczelnią macierzystą - Politechniką Warszawską, pracując na stanowiskach naukowo-technicznych (specjalista) i naukowo-dydaktycznych (asystent i adiunkt) w Międzywydziałowym Centrum Biotechnologii PW (2005-2008), następnie Zakładzie Mikrobioanalitik (2008-2014) i Katedrze Biotechnologii Medycznej (od roku 2014) Wydziału Chemicznego PW.

Habilitant nie odbył stażu podoktorskiego, niemniej jednak nawiązał współpracę z ośrodkami w Polsce, np. Narodowym Instytutem Zdrowia Publicznego, które zaowocowały 6 wspólnymi publikacjami i 2 projektami, w tym projekt NCN OPUS (rola wykonawcy) i NCBiR Lider (rola kierownika projektu). W ramach współpracy z Max Planck Institute of Colloids and Interfaces (Poczdam, Niemcy) powstała ciekawa publikacja dotycząca układów dostarczania DNA opartych na lipidach kationowych.

Po uzyskaniu stopnia doktora, Habilitant uzyskał 3 nagrody (z ogólnej liczby – 6), w tym dwie nagrody zespołowe I stopnia JM Rektora Politechniki Warszawskiej (w latach 2016 i 2018) i nagrodę II stopnia Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny im. L. Rajchmana (w roku 2021).

Ze względu na fakt, iż prowadzone badania mają charakter użyteczny, w dalszej pracy badawczej Habilitanta warto byłoby zwrócić uwagę na, brakującą w dorobku, część związaną z ochroną własności intelektualnej powstających opracowań, z drugiej strony z pewnością istnieje możliwość sprzedaży *know-how* - formy komercjalizacji wyników badań preferowanej przez wiele firm.

4. OCENA AKTYWNOŚCI DYDAKTYCZNEJ, POPULARYZATORSKIEJ I ORGANIZACYJNEJ

Dorobek dydaktyczny dr. R. Ziółkowskiego obejmuje: (1) prowadzenie wykładów i zajęć laboratoryjnych z 12 przedmiotów, m.in. takich jak: Analityczne metody instrumentalne, Analityczna kontrola procesów, Chemia analityczna, Projektowanie metod bioanalitycznych, Analytical methods in biotechnology oraz (2) promotorstwo lub opieka naukowa nad ponad 30 pracami dyplomowymi inżynierskimi i magisterskimi realizowanymi w Politechnice Warszawskiej. Dr Robert Ziółkowski jest również promotorem pomocniczym dwóch rozpraw doktorskich, obronionej na Wydziale Mechatroniki PW w roku 2019 oraz obecnego uczestnika II roku Szkoły Doktorskiej nr 1.

Należy również podkreślić, iż Habilitant jest aktywny w zakresie recenzowania prac naukowych, przygotowując ponad 50 recenzji dla 9 czasopism naukowych indeksowanych w bazie JCR, związanych z tematyką biocząłników, cząłników chemicznych, mikroukładów analitycznych, modyfikacji powierzchni, elektrochemią, chemią analityczną.

Dr Ziółkowski jest również aktywny w obszarze popularyzacji i organizacji nauki, biorąc udział w prezentacjach podczas Targów branżowych EuroLab, organizując kursy dla studentów Politechniki Warszawskiej, uczniów szkół podstawowych i gimnazjalnych, i praktyki zawodowe

dla uczniów szkół ponadpodstawowych. Habilitant był również członkiem komisji rekrutacyjnej Wydziału Chemicznego PW (od roku 2021) i członkiem komisji prowadzącej egzaminy inżynierskie Wydziału Chemicznego PW od roku 2017. Od roku 2020 jest członkiem Rady Wydziału Chemicznego PW oraz bierze również udział w organizacji konferencji Biotechnologia (2014).

5. WNIOSEK KOŃCOWY

Wyniki badań dr. inż. Roberta Ziółkowskiego mają duże znaczenie dla rozwoju mikronarzędzi i metod bioanalitycznych z potencjałem do zastosowań w diagnostyce medycznej, zatem stanowią znaczący wkład w rozwój dyscypliny naukowej nauki chemiczne.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawione osiągnięcie habilitacyjne, dorobek naukowy, organizacyjny i dydaktyczny dr. inż. Roberta Ziółkowskiego spełnia warunki stawiane osiągnięciom naukowym w postępowaniach o nadanie stopnia doktora habilitowanego, opisanym w Ustawie *”Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”* z dnia 20 lipca 2018 r. i wnoszę o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

