



Politechnika Łódzka

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

dr hab. inż. Beata Brozek-Płuska, prof. uczelni
Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny
Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Nicińskiego
pt. " *Plasmonic nanostructures for bacteria and cancer cells analysis by Surface Enhanced Raman Spectroscopy* "
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Michoty-Kamińskiej, prof. Instytutu

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgra Krzysztofa Nicińskiego pt. "*Plasmonic nanostructures for bacteria and cancer cells analysis by Surface Enhanced Raman Spectroscopy*" została wykonana w zespole Nanostruktur plazmonicznych do analiz biospektroskopowych Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie kierowanym przez dr hab. Agnieszkę Michotę-Kamińską, prof. instytutu.

Rozprawa doskonale wpisuje się w tematykę prac badawczych realizowanych w Zespole, która dotyczy m.in. identyfikacji grzybów chorobotwórczych, detekcji bakterii chorobotwórczych z płynów fizjologicznych i żywności, bezpośredniej detekcji i analizy ilościowej immunomarkerów w płynach ustrojowych oraz detekcji krążących w krwi komórek nowotworowych z włączeniem analiz próbek klinicznych z zastosowaniem techniki Wzmocnionej Powierzchniowo Spektroskopii Ramana (SERS).

Badania prowadzone w grupie dr hab. A. Michoty-Kamińskiej, prof. instytutu charakteryzuje najwyższy poziom merytoryczny i innowacyjność potwierdzone licznymi pracami naukowymi w czasopismach międzynarodowych o najwyższym współczynniku oddziaływania (IF), a także patentami.

Nadrzędnym celem badań podjętych w ramach rozprawy doktorskiej było zaprojektowanie, scharakteryzowanie oraz przetestowanie podłoży do pomiarów techniką SERS umożliwiającą bezznacznikową analizę spektroskopową wybranych typów bakterii oraz komórek nowotworowych.

Cele szczegółowe obejmowały opracowanie protokołów pomiarowych zawierających informacje o optymalnych parametrach technicznych dla pomiarów bakterii i komórek nowotworowych, w tym próbek z hodowli komórkowych, próbek środowiskowych oraz próbek klinicznych, przetestowanie układu mikroprzepływowego w analizach płynów ustrojowych, przypisanie pasm obserwowanych w widmach SERS do poszczególnych typów drgań cząsteczek, analizę PCA otrzymanych wyników spektroskopowych, opracowanie optymalnych protokołów przygotowania próbek i ich nanoszenia na opracowane podłoża SERS.

Przedstawiona rozprawa doktorska ma postać opracowania w języku angielskim składającego się z 16 podrozdziałów. Część Literaturowa obejmuje 5 podrozdziałów i poprzedzona jest Abstraktem.

W rozdziale 6. Doktorant opisał cele podjętych badań. Rozdział 7. jest pierwszym w części eksperymentalnej, jest on również najobszerniejszą częścią rozprawy prezentującą wyniki badań przeprowadzonych przez Doktoranta. Rozdział 8. stanowi dyskusję i podsumowanie wykonanych badań. Rozdziały 9-14 przedstawiają zestawienia publikacji Doktoranta, patentów i zgłoszeń patentowych, tabel, rysunków, równań i skrótów stosowanych w dysertacji. Rozdział 15. stanowią załączniki, a 16. poświęcony jest zestawieniu odnośników literaturowych (264 pozycje).

W rozdziale nr 1 Doktorant wprowadził czytelnika w zagadnienia dotyczące zjawiska rozpraszania światła, historię odkrycia zjawiska SERS, zalety spektroskopii Ramana, w tym techniki SERS w analizie próbek nieorganicznych i organicznych ze szczególnym naciskiem na próbki



biologiczne, dokonał również porównania zalet, ale i ograniczeń techniki SERS w odniesieniu do tradycyjnych metod biologii molekularnej. Rozdział 2 został poświęcony szerszemu opisowi podstaw teoretycznych rozpraszania światła, w tym opisowi matematycznemu tego zjawiska. Doktorant skupił się również na opisie elementów aparatury stosowanej zwyczajowo w pomiarach ramanowskich. Oddzielne podrozdziały zostały poświęcone zastosowaniom spektroskopii Ramana włączając nawet te, dotyczące misji kosmicznych. Rozdział 3 został w całości poświęcony zagadnieniom dotyczącym SERS od podstaw teoretycznych przez opis komercyjnie dostępnych podłoży SERS do zastosowań praktycznych tej techniki ze szczególnym naciskiem na analizy próbek biologicznych. Jeden z podrozdziałów (3.4) Doktorant dedykował opisowi zastosowania SERS w identyfikacji mikroorganizmów i detekcji komórek nowotworowych, czyli układów jakie sam badał eksperymentalnie. Tabela 1 na str. 28. podsumowuje przypisanie poszczególnych częstości obserwowanych w widmach SERS mikroorganizmów, a Tabela 2 komórek nowotworowych do określonych grup funkcyjnych cząsteczek organicznych.

Rozdziały 4 i 5 stanowią obszerny opis technik mikroskopowych oraz analizy PCA stosowanych przez Doktoranta w charakterystyce próbek oraz analizie danych eksperymentalnych.

Rozdział 6 precyzuje cele pracy. Rozdział 7 zawiera zaś opisy aparatury stosowanej w badaniach eksperymentalnych, jak i opisy poszczególnych zadań badawczych. Każdy z podrozdziałów tej sekcji opisuje sposób wytwarzania podłoży SERS, ich charakterystykę mikroskopową oraz pomiary ramanowskie uzyskane z ich zastosowaniem; aspekty techniczne zawierają odpowiednie załączniki (rozdział 15). Rozdział 8 poświęcony jest podsumowaniu i dyskusji otrzymanych wyników eksperymentalnych.

Bardzo cennym w ocenie całokształtu przeprowadzonych badań jest analiza powtarzalności wyników oraz trwałości podłoży SERS towarzysząca charakterystyce ich właściwości w badaniach spektroskopowych. Doktorant przeanalizował również zależności jakości widm Ramana w funkcji użytej mocy lasera, czasu akwizycji danych oraz długości linii wzbudzenia. Doktorant wiele czasu poświęcił także na optymalizację warunków hodowli mikroorganizmów i przeanalizował wpływ różnych podłoży SERS na rejestrowane widma dla mikroorganizmów hodowanych na różnych pożywkach.

Układ formalny pracy nie budzi zastrzeżeń, rozprawa zawiera wszystkie elementy niezbędne do zapoznania się, tak recenzenta jaki i innych osób zainteresowanych podjętą tematyką, ze spektroskopową charakterystyką bakterii i komórek nowotworowych badanych techniką SERS.

Tematyka rozprawy doktorskiej należy do najbardziej aktualnych podejmowanych obecnie w kontekście możliwości stosowania technik spektroskopowych w diagnostyce zmian chorobowych oraz detekcji bakterii. Ważność podjętej tematyki uzasadnia także analiza przeprowadzona przez samego Doktoranta dotycząca możliwości praktycznych zastosowań SERS.

Przed przystąpieniem do szczegółowej analizy treści rozprawy na uznanie zasługuje również fakt, iż w trakcie badań eksperymentalnych Doktorant wykazał się nie tylko znajomością technik spektroskopowych, ale analiza została uzupełniona o pomiary mikroskopowe, w tym AFM i analizę chemometryczną, tak niezbędną w ocenie efektywności opracowanych protokołów pomiarowych, o szczególnym znaczeniu w badaniach próbek biologicznych.

Do najważniejszych osiągnięć Doktoranta należy zaliczyć:

- Opracowanie efektywnych, szybkich i nisko kosztowych protokołów pomiarowych dla oznaczania bakterii i komórek nowotworowych w sposób powtarzalny i jednoznaczny z zastosowaniem techniki SERS,
- Wytworzenie podłoży możliwych do wykorzystania w pomiarach SERS,
- Opracowanie podłoży SERS możliwych do wykorzystania w długim czasie, nawet rzędu miesięcy, o dużej odporności chemicznej i mechanicznej, o minimalnym wkładzie własnym w rejestrowane widma (wykorzystanym do kalibracji pomiarów),
- Opracowanie nanocząstek $\text{Fe}_2\text{O}_3@Ag$ charakteryzujących się dodatkowym efektem wzmocnienia sygnału,
- Opracowanie protokołów hodowli i przeprowadzania pomiarów SERS, przeanalizowano takie czynniki jak: czas hodowli, rodzaju medium, wybór linii



wzbudzenia, moc wiązki lasera, czas akwizycji, co ma kluczowe znaczenie w praktycznych zastosowaniach SERS,

- Wykonanie pomiarów SERS z wykorzystaniem 2 typów spektrometrów, w tym zminiaturyzowanego,
- Wykonanie pomiarów dla próbek w postaci hodowli, próbek środowiskowych jak i klinicznych,
- Połączenie analizy spektroskopowej i chemometrycznej SERS-PCA pozwalającej na jednoznaczną identyfikację badanych próbek.

Przedstawione w rozprawie wyniki badań należy uznać za imponujące, tak pod względem ich różnorodności, jakości badań eksperymentalnych, jak i ich opracowania.

Przedstawiona analiza skłania jednak do zadania kilku pytań oraz sformułowania kilku sugestii:

1. W ramach części literaturowej na str. 9 Doktorant przedstawia schemat ilustrujący zjawisko rozpraszania. Czy jest to schemat zaczerpnięty bezpośrednio z odnośnika [3] czy też stanowił on jedynie inspirację dla Autora? Niefortunnym jest umieszczenie napisów pod rysunkiem tak, że jest on częściowo zasłonięty tekstem. W opisie zjawiska rozpraszania Ramana brak doprecyzowania dotyczącego poziomów oscylacyjnych.
2. W ramach podrozdziału 2.2. Doktorant opisuje elementy składowe spektrometru Ramana. Dogodnym dla czytelnika byłoby, zdaniem recenzenta, umieszczenie schematu poglądowego (tym bardziej, że Doktorant uczynił to w ramach podrozdziału 7.1. str. 51).
3. Na stronie 20. akapit 1. zakończony jest zdaniem opisującym technikę top-down, niestety brak odnośników.
4. Dla czytelników mniej zaznajomionych z budową bakterii cennym byłoby rozwinięcie pojęcia „*envelope*” (str. 27., podrozdział 3.4).
5. Na stronie 27. dane dotyczące pozycji literaturowych są przytoczone w formie odmiennej niż w większości pracy doktorskiej (główny autor, rok publikacji, tytuł publikacji).
6. Podrozdział 7.1 powinien zostać poszerzony o opis sondy stosowanej w spektrometrze przenośnym.
7. Na str. 63. opis słowny danych dotyczących RSD mógłby być zastąpiony bardziej tradycyjną formą prezentowania danych o SD.
8. Proszę o informację o metodzie normalizacji stosowanej w analizie widm SERS.
9. Proszę o informację dotyczącą wstępnego opracowania danych analizowanych następnie metodą PCA.
10. Czy wykonano analizę chemometryczną danych spektroskopowych z zastosowaniem np. metody PLSDA by oszacować czułość i swoistość wybranej metody pomiarowej?

Wymienione powyżej uwagi i sugestie w żaden sposób nie umniejszają bardzo wysokiej ocenie merytorycznej, tak pracy doświadczalnej wykonanej przez Doktoranta, jak i przedstawionego w postaci rozprawy jej opracowania.

Doktorant wykonał bardzo obszerną pracę eksperymentalną, a rozprawa napisana jest w sposób potwierdzający jej dojrzałą koncepcję.

Dorobek Doktoranta obejmuje łącznie 13 publikacji. W 7 publikacjach bezpośrednio związanych z tematem rozprawy Pan mgr Krzysztof Niciński jest pierwszym autorem w 2. Wszystkie publikacje ukazały się w międzynarodowych czasopismach o wysokim IF. Doktorant jest także współautorem 4 patentów/zgłoszeń patentowych.

Ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny przedstawionej rozprawy, opracowanie ambitnego zadania badawczego oraz istotny, moim zdaniem wkład rozprawy w rozwój dyscypliny wnoszący o jej wyróżnienie.



Podsumowując stwierdzam, że rozprawa mgra Krzysztofa Nicińskiego spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" i wnoszę o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. inż. Beata Brożek-Pluska, prof. uczelni

