

**Uniwersytet Gdański
Wydział Chemii
Katedra Chemii Analitycznej
Pracownia Elektroanalizy i Biosensorów
ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk**

Gdańsk, 06.01.2026 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Elżbiety Jarosińskiej pt. „Opracowanie elektrochemicznych macierzy czujnikowych do monitorowania hodowli komórkowych”

Praca doktorska została wykonana w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Andersa Martina Jönssona-Niedziółki oraz promotor pomocniczej dr inż. Emilii Witkowskiej-Nery w Warszawskiej Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i BioMedycznych Warsaw-4-PhD w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk.

Recenzowana praca doktorska składa się z 200 stron. Została napisana w sposób klasyczny, jednak warto wspomnieć, że układ rozprawy jest nietypowy. Po streszczeniu i wykazie używanych skrótów, a także spisie treści, praca składa się z sześciu rozdziałów. W recenzowanej pracy nie wprowadzono formalnego rozdzielenia części literaturowej od części doświadczalnej, jednak przyjęte rozwiązanie zostało jasno opisane we wstępie do pracy i nie wpływa na ogólną ocenę rozprawy. W rozprawie doktorskiej nie wyodrębniono również oddzielnego rozdziału stanowiącego cel pracy. Pierwszy rozdział stanowi wstęp teoretyczny, natomiast cztery kolejne rozdziały zawierają opis przeprowadzonych badań. Każdy z rozdziałów części eksperymentalnej obejmuje następujące podrozdziały: wprowadzenie, materiały i metody, metody badań, wyniki i dyskusję oraz wnioski. W każdym wprowadzeniu znajduje się dodatkowo krótki przegląd literaturowy. W rozdziale piątym tytuł podrozdziału „wnioski” został rozszerzony do „Podsumowanie i wnioski”. W rozprawie zamieszczono również spis rysunków i tabel, łącznie 93 rysunki oraz 2 tabele, których numeracja jest bezpośrednio powiązana z treścią poszczególnych rozdziałów. Łącznie zacytowano 298 pozycji literaturowych.

Wyniki, które przedstawiono w ocenianej dysertacji opublikowano w jednej pracy *ACS Omega*. Dodatkowy dorobek doktorantki obejmuje dwie publikacje ściśle powiązane tematycznie z zakresem recenzowanej rozprawy. Jedna opublikowana została w czasopiśmie *Lab on a Chip*,

natomiast druga znajduje się w materiałach konferencyjnych *Proceedings, European Workshop on Optical Fibre Sensors*. Ponadto, autorka jest również współautorką dwóch innych publikacji w czasopiśmie *Electrochimica Acta* oraz *ChemElectroChem*. Warto również odnotować, że w spisie dorobku naukowego dysertacji znajduje się rozdział w książce *Electronic Tongues: Fundamentals and recent advances*. Niestety szczegóły dotyczące tego rozdziału nie zostały ujęte w spisie dorobku naukowego doktorantki, na co warto zwrócić uwagę, aby w pełni oddać zakres osiągnięć autorki.

Wartym podkreślenia jest również, że oceniana praca doktorska powstała w ramach projektu NCBiR LIDER/38/01381/L-9/17/NCBR/2018. Dodatkowo autorka zrealizowała badania opisane w rozdziale piątym i częściowo w rozdziale czwartym w Instytucie Chemii Technicznej Uniwersytetu Leibniz w Hanowerze w Niemczech, w ramach programu Erasmus+. W trakcie studiów doktorantka odbyła także staż badawczy na Uniwersytecie Presbiteriana Mackenzie w São Paulo w ramach programu STER, NAWA, gdzie otrzymała elektrody LIG opisane w rozdziale 2.

Aktualnie w dobie miniaturyzacji i poszukiwania nowych sensorów elektrochemicznych, opracowanie efektywnych rozwiązań stanowi istotne wyzwanie dla wielu laboratoriów badawczych. Temat rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Elżbiety Jarosińskiej obejmował wykonanie, charakterystykę i zbadanie działania czujników elektrochemicznych, przeznaczonych do pomiaru tlenu i glukozy. Dodatkowo autorka zaplanowała monitorowanie zmian elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną do analizy parametrów metabolicznych w statycznych hodowlach komórkowych. Doktorantka przeprowadziła też badania uzyskania warstw przeciwpoporostowych, umożliwiające prowadzenie analiz elektrochemicznych, zachowując stabilność sygnału w czasie hodowli komórkowych. Podjęta tematyka badawcza pracy doktorskiej stanowi istotne wyzwanie naukowe w zastosowaniu metod elektrochemicznych w badaniach opartych na hodowlach komórkowych.

We wstępie pracy doktorskiej autorka określiła cel pracy, którym było opracowanie macierzy elektrodowej do jednoczesnego pomiaru stężenia tlenu i glukozy w trójwymiarowych hodowlach komórkowych na rusztowaniach hydrożelowych. Dodatkowo autorka dodała, że w dysertacji opracowano otrzymanie warstwy przeciwpoporostowej umożliwiającą prowadzenie długoterminowych pomiarów w pożywcze hodowlanej. Warto podkreślić, że w dysertacji nie wydzielono osobnego rozdziału, w którym w sposób szczegółowy przedstawiono cele i hipotezy badawcze. Niemniej jednak autorka, na początku każdego rozdziału eksperymentalnego, w podrozdziale „Wyniki i dyskusja” jasno określiła cele podejmowanych zadań.

W części literaturowej doktorantka przedstawiła opis metod hodowli komórkowych porównując hodowlę dwu i trójwymiarowe. Autorka omówiła metody wykorzystujące naturalną zdolność komórek do agregacji i podejścia oparte na zastosowaniu rusztowań. Ponadto autorka zaprezentowała zagadnienia związane z regulacjami prawnymi dotyczącymi trójwymiarowych hodowli komórkowych. W tej części pracy zostały przedstawione metody oceny procesów biologicznych na poziomie komórkowym. Scharakteryzowano również czujniki stosowane do analizy aktywności metabolicznej komórek w hodowlach komórkowych, z uwzględnieniem zarówno metod optycznych i elektrochemicznych. W opisie metod elektrochemicznych Pani mgr inż. Elżbieta Jarośnińska przedstawiła zasady działania podstawowych technik elektrochemicznych, z których większość została wykorzystana w realizowanych badaniach. Doktorantka opisała metody woltamperometryczne, z uwzględnieniem woltamperometrii cyklicznej, a także techniki pulsowe, takie jak różnicowa woltamperometria pulsowa oraz woltamperometria fali prostokątnej. Przedstawiono również inne metody elektrochemiczne, w tym chronoamperometrię, potencjometrię oraz elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną.

Analiza powyższego rozdziału pozwala stwierdzić, że został on bardzo dobrze zaprojektowany i opisany w sposób merytoryczny, stanowiąc podstawę do dalszych prac eksperymentalnych. Warto podkreślić, że autorka wykazuje rozległą wiedzę w zakresie omawianych zagadnień, czego potwierdzeniem jest liczba użytych odnośników literaturowych obejmujących 148 pozycji. W tej części pracy nie odnotowano istotnych uchybień redakcyjnych, jedynie w nielicznych odnośnikach pojawiają się drobne nieścisłości, które nie wpływają na ogólną ocenę dysertacji.

Drugi rozdział rozprawy doktorskiej poświęcony jest części eksperymentalnej. Doktorantka przedstawiła wyniki badań dotyczących charakterystyki odpowiedzi elektrodowej oraz procesu redukcji tlenu przeprowadzonych z wykorzystaniem różnych elektrod. W pomiarach zastosowano komercyjne elektrody złote modyfikowane makrocyklicznymi kompleksami pochodnych porfiryn kobaltu, żelaza i manganu (CoTPP, CoTMPP, FeTMPPCl i MnTPPCL), których nazewnictwo zostało przedstawione w tym rozdziale w spisie odczynników. Ponadto wykorzystano elektrody złote modyfikowane polimerami przewodzącymi, takimi jak polianilina (PANI), politiofen (PTh) i polipirol (PPy), a także makrocyklicznymi pochodnymi porfiryn. Opisano także badania dla modyfikowanych elektrod wytworzonych za pomocą procesu napyłania w warunkach wysokiej próżni modyfikowane polipirole i makrocyklicznym kompleksem żelaza PPy/FeTMPPCl. Uwzględniono też elektrody wytwarzane metodą druku 3D otrzymanych z następujących filamentów: Proto-Pasta, FiloAlfa i Print-me które

analizowano zarówno w postaci niemodyfikowanej, jak i po modyfikacji nanocząstkami złota, a następnie warstwami PPy oraz FeTMPPCl. Autorka podjęła również próbę wykorzystania elektrod grafenowych indukowanych laserowo (LIG) oraz elektrod wytwarzanych w procesie fotolitografii. Ze względu na trudności napotkane na etapie ich otrzymywania nie przedstawiono wyników dotyczących ich zastosowania w badaniach procesu redukcji tlenu. Autorka udowodniła, że modyfikacje elektrod polimerami przewodzącymi i kompleksami makrocyklicznymi, miały jedynie niewielki wpływ na reakcję redukcji tlenu w porównaniu z elektrodami złotymi uzyskanymi w procesie napyłania. Doktorantka udowodniła też, że elektrody wytwarzane metodą druku 3D wymagają dalszej optymalizacji i nie nadają się do pomiarów hodowlań komórkowych. W tej części pracy autorka wykorzystowała 39 odnośników literaturowych, wszystkie zostały poprawnie zacytowane. Wyniki przedstawione w tym rozdziale świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu doktorantki do pracy laboratoryjnej oraz samodzielności w prowadzeniu prac badawczych.

W trzecim rozdziale Pani mgr inż. Elżbieta Jarosińska przedstawiła wyniki badań poszukiwania warstw przeciwporostowych zapewniających stabilność pomiarów w hodowlań komórkowych. W tym celu doktorantka wykorzystwała różne elektrody: elektrody z węgla szklanego (GC), elektrody ołówkowe (GPE), elektrody drukowane metodą sitodruku (SPE) oraz cienkowarstwowe elektrody na bazie ITO. Jako modelowy związek warstwy katalizatora wybrano syryngaldazynę. W sumie przebadano jedenaście związków o potencjalnych właściwościach przeciwporostowych uwzględniając: Nafion®, poli-*o*-fenylenodiaminę, PVC, PLLA, PEDGE, poliHEMA, TMOS, TMA/TMOS, BSA, PLL-PEG oraz nanodiamant. W badaniach zastosowano ludzką linię komórkową raka szyjki macicy HeLa. Uzyskane wyniki pozwoliły zidentyfikować trzy najbardziej obiecujące związki o działaniu przeciwporostowym: kwas poli-L-mlekowy (PLLA), tetrametoksylan (TMOS) oraz poli(L-lizyna)-g-poli(etyleno glikol) (PLL-PEG). Autorka wykazała, że w przypadku modyfikacji TMOS sygnał pochodzący od syryngaldazyny jest najdłużej utrzymywany, nawet przez 6 tygodni. W tej części pracy autorka wykorzystowała 62 odnośniki literaturowe. Jedynie w odnośniku nr 59 może występować nieścisłość. Autorka w tym rozdziale wykazała, że potrafi samodzielnie rozwiązywać postawione problemy naukowe, przeprowadzając liczne pomiary elektrochemiczne.

W czwartym autorka przedstawiła wyniki badań wykorzystując macierz elektrodową, zawierającą elektrody złote napyłane metodą próżniową, użyte w dwuwymiarowych hodowlań komórkowych. Autorka opracowała metodykę pomiarową umożliwiającą detekcję tlenu, ocenę adhezji komórek do podłoża oraz detekcję glukozy w hodowlań komórek linii raka wątroby HepG2.

W tym rozdziale Pani mgr inż. Elżbieta Jarosińska przedstawiła także wyniki badań inkubacji z roztworem DMSO o stężeniu 1% i 10 % oraz acetaminofenonu (acetaminofenu) w zakresie stężeń od 1mM do 50 mM. W trakcie realizacji pomiarów autorka zoptymalizowała warunki eksperymentalne prowadzenia badań w hodowlach komórkowych, zapobiegając również pojawianiu się zakażeń grzybiczych poprzez zastosowanie Amfoterycyny B jako antybiotyku. Dodatkowo analizowała sygnały pochodzące od elektrod umieszczonych na różnych wysokościach w trakcie analizy tlenu w hodowli komórek HepG2.

Uzyskane wyniki badań przez doktorantkę potwierdzają skuteczność zastosowanej macierzy elektrodowej do monitorowania hodowli komórkowych użycia tlenu i adhezji komórek do powierzchni. Autorka wykazała, że zastosowana macierz elektrodowa nie pozwala na numeryczne określenie żywotności komórek. Jednocześnie stwierdziła, że zastosowany układ pomiarowy uniemożliwia prowadzenie równoczesnej analizy mikroskopowej bez przerywania pomiarów. Dowiodła też, że otwarcie inkubatora prowadzi do zaburzenia równowagi tlenowej, a powrót sygnału do stanu wyjściowego trwa około 5 godzin. Dodatkowo, ze względu na niską powtarzalność wyników doktorantka negatywnie oceniła opracowane przez siebie biocujniki glukozy w obrębie jednej macierzy zarówno i pomiędzy macierzami wynikającą z niewłaściwego doboru potencjału.

W tej części pracy autorka odwołała się do 42 pozycji literaturowych. *Recenzent po analizie tego rozdziału chciałby zadać pytanie: Czy w całej dysertacji poprawnie użyto nazwę acetaminofenon? Jeśli autorka używała związek, którego popularną nazwą jest paracetamol, to poprawną nazwą tego związku jest acetaminofen.* Niemniej jednak należy podkreślić, że autorka w tej części pracy przeprowadziła bardzo dużo pomiarów, co świadczy o jej samodzielności w rozwiązywaniu postawionego problemu naukowego.

W ostatnim rozdziale doktorantka opisała wyniki prac wykorzystując macierz elektrodową użytą do monitorowania trójwymiarowych hodowli komórkowych z wykorzystaniem matrycy hydrożelowej w postaci metakrylanu żelatyny (GelMa). Autorka dysertacji zrealizowała prace badawcze na dwóch liniach komórkowych: ludzkich komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej zróżnicowane w chondrocyty (huCho) oraz HepG2. Doktorantka za pomocą optycznych czujników przeprowadziła pomiary stężenia tlenu w trójwymiarowych hodowlach komórkowych, dobierając odpowiednie stężenie żelu GelMa. Wykazała, że zastosowanie optycznych czujników umożliwia pomiar tlenu w całej objętości, jednak wadą badanego układu jest konieczność użycia mikroskopu, który wpływa na temperaturę hodowli. Autorka przeprowadziła również ocenę proliferacji komórek HepG2

na rusztowaniach hydrożelowych GelMa oraz zbadała wpływ acetaminofenonu (acetaminofenu) na te komórki w 2D i 3D hodowlach potwierdzając jego toksyczny wpływ. Wykorzystując opracowaną macierz elektrodową oraz badania elektrochemiczne, autorka przeprowadziła pomiary redukcji tlenu oraz oceniła wpływ acetaminofenonu (acetaminofenu) w trójwymiarowej hodowli komórkowej komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa w różnych warunkach. Na podstawie otrzymanych wyników autorka stwierdziła, że układ pomiarowy nie jest odpowiednia i wymaga modyfikacji. Zbyt duża średnica komory hodowlanej powoduje szybsze rozpuszczanie się hydrożelowych konstruktów, wpływając na warstwę dyfuzyjną i uzyskiwane wyniki pomiarowe.

W rozdziale piątym autorka odwołała się do 16 źródeł literaturowych. Przeprowadziła szereg zaawansowanych badań eksperymentalnych, analizując macierz elektrodową do monitorowania trójwymiarowych hodowli komórkowych z matrycą hydrożelową. Autorka przedstawiła wady i zalety badanego układu pomiarowego, co świadczy o jej dojrzałości naukowej. Dodatkowo, w podsumowaniu i wnioskach zaproponowała rozwiązania, które mogłyby w przyszłości poprawić działanie badanego układu pomiarowego.

W rozdziale szóstym doktorantka w sposób krótki i przejrzysty podsumowała najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań i zaproponowała sposoby usprawnienia badanego układu pomiarowego.

Oceniana rozprawa doktorska pod względem edycyjnym napisana jest bardzo dobrze, nie zauważyłem również błędów redakcyjnych, struktura pracy jest przejrzysta. Wszystkie rysunki i tabele są poprawnie podpisane.

Z obowiązku recenzenta oraz ciekawości naukowej podczas recenzji powyższej rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka uwag oraz zapytań do doktorantki.

1. Wykaz używanych skrótów jest bardzo obszerny, jednak niektóre skróty odnoszące się do linii komórkowych, takie jak HepG2, HeLa czy huCHO, pojawiają się wcześniej w tekście. Umieszczenie ich w wykazie skrótów mogłoby ułatwić czytelnikowi zrozumienie pracy.
2. W spisie używanych odczynników autorka wymienia hydroxymetylferrocene, odpowiadający związkowi $\text{Fc}(\text{MeOH})$. Niezależnie od braku nazwy w polskim, na stronie 95 autorka podaje, że pomiary charakterystyki elektrod GPE zostały wykonane metodą woltamperometrii cyklicznej w roztworze $\text{Fc}(\text{MeOH})$. Wyniki tych pomiarów nie zostały zaprezentowane w pracy (nie ma takiej konieczności). Jednocześnie większość rysunków przedstawiających woltamperogramy cykliczne podpisana jest z użyciem 1,1'-ferrocenedimetanolu $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$. Chciałbym zapytać, czy pominięcie

$\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ w spisie odczynników jest pomyłką oraz jaką procedurę autorka stosowała przy rozpuszczaniu zastosowanych próbników redoks.

3. Czy użyte do badań elektrody otrzymane z filamentów Proto-Pasta, FiloAlfa i Print-me przed pomiarami były aktywowane? Jeśli tak, to jaką metodą?
4. Jakimi nanocząstkami złota autorka modyfikowała elektrody drukowane metodą 3D do przedstawionych pomiarów?
5. Czy autorka podjęła próby wykorzystania opracowanej warstwy przeciwpornostowej TMOS w badaniach pomiarów w dwu i trójwymiarowych hodowlach komórkowych, stosując elektrody złote wytworzone w procesie napyłania w warunkach wysokiej próżni?
6. Proszę o doprecyzowanie kryteriów doboru warunków pomiarów z zastosowaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej w eksperymentach opisanych w rozdziałach 4 i 5.
7. Na stronie 126 autorka podaje wartości czułości elektrod. Bardzo proszę o przedstawienie procedury, według której czułość ta została obliczona?
8. Czy autorka rozważała lub przeprowadzała alternatywną metodę modyfikacji elektrod złotych z zastosowaniem oksydazy glukozowej po wcześniejszej modyfikacji elektrody?

Podsumowując, na podstawie recenzowanej rozprawy doktorskiej autorka osiągnęła cel opracowania macierzy elektrodowej, umożliwiającej analizę stężenia wybranych analitów, w tym tlenu oraz analizę impedancji w dwuwymiarowych i trójwymiarowych hodowlach komórkowych hydrożelowymi rusztowaniami, co stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego. Oceniana dysertacja charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym, a jej wyniki zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Autorka prowadziła również badania w różnych ośrodkach badawczych, co świadczy o jej samodzielności. Oceniana praca doktorska zawiera wyniki badawcze, które mogą stanowić podwaliny do dalszego rozwoju połączenia metod elektrochemicznych z biologicznymi w celu monitorowania hodowli komórkowych.

Na podstawie powyższej recenzji pracy doktorskiej stwierdzam, że rozprawa Pani mgr inż. Elżbiety Jarosińskiej spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r., poz.1571 ze zm.) i wnioskuję o przyjęcie rozprawy doktorskiej i jej dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk chemicznych.

Paweł Niedziałkowski