

Prof. dr hab. inż. Wojciech Wróblewski  
Zakład Mikrobioanalitiky  
Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska  
Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa  
tel./fax: 234 56 31  
e-mail: wuwu@ch.pw.edu.pl

Warszawa, 4 kwietnia 2016 r.

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Pawła Malinowskiego  
„Charakterystyka i zastosowanie wybranych materiałów polimerowych  
w bioczujnikach z detekcją elektrochemiczną lub spektroskopową”**

Sensory chemiczne i biosensory są urządzeniami analitycznymi intensywnie rozwijanymi z powodu dużego zapotrzebowania na proste i szybkie metody pomiarowe przydatne w analizie klinicznej i biologicznej, ochronie środowiska czy przemysłowej kontroli procesowej. Opracowanie selektywnych sensorów wymaga przede wszystkim ustalenia odpowiedniego składu warstwy receptorowej, decydującej o ich parametrach pracy. Dlatego prowadzone od lat badania w tej dziedzinie obejmują poszukiwanie selektywnych warstw z zastosowaniem nowych receptorów rozpoznających wybrane anality oraz materiałów polimerowych, zapewniających prawidłowe działanie czujników. Ważnym zagadnieniem jest także miniaturyzacja sensorów, ze względu na możliwość analizy próbek o małych objętościach, wymagania kompatybilności z miniaturowymi systemami analizy chemicznej oraz czynnikami ekonomicznymi decydującymi o minimalizacji kosztów wytworzenia samych sensorów, jak i obniżeniu kosztów jednostkowej analizy.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Pawła Malinowskiego „Charakterystyka i zastosowanie wybranych materiałów polimerowych w bioczujnikach z detekcją elektrochemiczną lub spektroskopową”, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Maksymiuka, wpisuje się w przedstawione powyżej kierunki badawcze. Autor przedstawił wyniki przeprowadzonych badań nad opracowaniem warstw receptorowych oraz planarnych (bio)sensorów elektrochemicznych i optycznych z wykorzystaniem materiałów polimerowych (przewodzące warstwy polianiliny, mikrosfery poliakrylanowe) oraz kropek kwantowych. Realizacja założonych celów prac badawczych może być istotna z punktu widzenia konstrukcji prostych i tanich sensorów/biosensorów a zwłaszcza jednorazowych testów paskowych z detekcją elektrochemiczną lub optyczną. Problematyka rozprawy mieści się w obszarze badań nad nowoczesnymi (bio)sensorymi elektrochemicznymi, rozwijanym od wielu lat w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, z wynikami o znaczącej pozycji w literaturze światowej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została zredagowana w języku polskim, ma tradycyjny układ i składa się z 8 rozdziałów. Pierwsze rozdziały pracy, poprzedzone krótkim wstępem, przedstawiają przegląd literaturowy wprowadzający czytelnika w zagadnienia poruszane w dalszej części rozprawy. Kolejne rozdziały to część eksperymentalna – opis konstrukcji badanych układów oraz omówienie rezultatów badań własnych Autora, uzyskanych dla kolejnych warstw receptorowych sensorów elektrochemicznych i optycznych. Rozprawę kończy krótki rozdział podsumowujący otrzymane wyniki i przedstawiający ogólne wnioski. Praca obejmuje 205 stron maszynopisu z 115 rysunkami oraz 7 tabelami; w tekście znajdują się 232 odnośniki do literatury, zebrane na końcu rozprawy. Układ zarówno części literaturowej jak i eksperymentalnej jest logiczny, choć nie do końca przejrzysty (tytuły niektórych rozdziałów i podrozdziałów nie zawsze oddają dobrze ich zawartość); ponadto błędy edytorskie, stylistyczne czy skróty myślowe pogarszają czytelność pracy.

### **Szczegółowe omówienie rozprawy doktorskiej**

Rozprawę doktorską rozpoczyna krótki wstęp, w którym Doktorant przedstawił obszar swoich zainteresowań badawczych oraz zakres prac badawczych, które były realizowane w ramach przewodu. W części literaturowej (rozdziały 1-5), przedstawione zostały zagadnienia istotne z punktu widzenia prowadzonych badań. Doktorant omówił przede wszystkim podstawy działania czujników chemicznych (głównie bioczujników optycznych i elektrochemicznych) oraz scharakteryzował otrzymywanie, właściwości i zastosowanie polimerów przewodzących (polianiliny) w konstrukcji w sensorów potencjometrycznych. W kolejnym rozdziale scharakteryzowane zostały enzymy; ze względu na temat rozprawy, Autor skupił uwagę na dwóch, stosowanych dalej w pracach badawczych, enzymach: ureazie oraz fosfatazie alkalicznej. Dalej omówiono zwięzłe otrzymywanie i właściwości fizykochemiczne kolejnych materiałów (mikrosfery poliakrylanowe, kropki kwantowe) wykorzystanych przez Autora, jako matryce optycznie czułych warstw receptorowych.

Część doświadczalną pracy doktorskiej rozpoczyna rozdział 6 i 7, w których Doktorant zebrał stosowane odczynniki/aparaturę i omówił krótko techniki instrumentalne stosowane w badaniach (potencjometrię, voltamperometrię cykliczną i elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną oraz spektrofotometrię UV-Vis i spektrofluorymetrię). W kolejnym, obszernym rozdziale 8 przedstawione zostały wyniki badań własnych, poświęcone kolejnym etapom planowanych prac badawczych. W pierwszej kolejności Autor omówił procedurę wytwarzania sensorów planarnych typu *all-plastic* (umożliwiających pracę w trybie elektrochemicznym i optycznym) z wykorzystaniem polimeru przewodzącego – polianiliny – nanoszonej w prosty sposób w postaci zawiesiny na folię poliestrową. Porównane zostały przy tym właściwości elektrochemiczne i optyczne tak otrzymanych warstw z polianiliną elektropolimeryzowaną. Wyniki badań potwierdziły możliwość wykorzystania polianiliny, jako warstwy receptorowej

sensorów elektrochemicznych i optycznych czułych na: pH, amoniak oraz kationy metali (podkreślić należy, że w przypadku czujników potencjometrycznych, przewodząca warstwa polianiliny umożliwiła także wyprowadzenie sygnału elektrycznego). Zdecydowanie bardziej interesująca była modyfikacja planarnych elektrod polianilinowych dodatkową warstwą octanu celulozy zawierającą enzym – ureazę, pod kątem uzyskania bioczujników mocznika (pracujących w obydwu trybach). Po optymalizacji pojemności buforowej roztworu użytego w trakcie pomiarów, przygotowane biosensory wykazywały liniową zależność sygnału od logarytmu stężenia mocznika w zakresie fizjologicznego poziomu tego związku w osoczu krwi. Te właśnie wyniki w moim przekonaniu stanowią najważniejsze, oryginalne osiągnięcie Doktoranta.

Ważnym etapem prac badawczych było opracowanie warstw receptorowych polianiliny z unieruchomioną fizycznie fosfatazą alkaliczną (pułapkowaną w octanie celulozy), które wykazywały czułość na jony monofluorofosforanowe w szerokim zakresie stężeń. Czułość warstw polianilinowych na pH wykorzystano dalej w analizie aktywności fosfatazy alkalicznej w roztworze metodą potencjometryczną i spektrofotometryczną. W rozdziale 8 opisano także próbę zastosowania innych materiałów polimerowych – mikrosfer poliakrylanowych – jako warstw receptorowych czułych na mocznik (po dowiązaniu pochodnej fluoresceiny i ureazy). Uzyskane mikrosfery umożliwiały spektrofluorymetryczne oznaczanie mocznika w zakresie stężeń  $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  M (pomiar w płytkach 96-dołkowych). Należy również dodać, że w pracy doktorskiej zasygnalizowano modyfikację nanocząstek – kropek kwantowych CdSe/ZnS za pomocą ureazy (również pod kątem analizy ilościowej mocznika).

Rozprawę doktorską kończy rozdział poświęcony podsumowaniu uzyskanych wyników prac eksperymentalnych.

### ***Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej***

Przechodząc do oceny merytorycznej należy stwierdzić, że tematyka pracy doktorskiej jest ciekawa i ważna z punktu widzenia konstrukcji tanich i prostych biosensorów, które mogą być przydatne w analizie klinicznej i środowiskowej. Z uwagi jednak na obowiązek krytycznego podejścia do ocenianej pracy, chciałbym przedstawić poniżej uwagi ogólne i szczegółowe dotyczące poszczególnych części rozprawy.

Po pierwsze – dobór i układ zagadnień omówionych w części literaturowej uważam za trafny i czytelny. Autor przedstawił jednak w każdym rozdziale jedynie opis kilku wybranych przykładów: stosowanych materiałów, opracowanych warstw receptorowych oraz sensorów bez krytycznej dyskusji tj. podkreślenia wad/zalet, ograniczeń/problemów w proponowanych rozwiązaniach/podejściach. Ponadto, zabrakło mi podsumowania przeglądu literaturowego, które wskazywałoby na stan wiedzy w danej dziedzinie i które uzasadniałoby celowość podjętych prac badawczych w ramach przewodu. Mam także pewne zastrzeżenia do

samego wstępu, w którym Autor nie określił precyzyjnie celu rozprawy i nie sformułował, co stanowić będzie oryginalne podejście (nowość naukową) w rozwiązaniu danego problemu naukowego (tj. nowe materiały, tryb pomiaru potencjometryczny i spektroskopowy, czy może nowe architektury sensorów i ich porównanie). Uwagi szczegółowe do części literaturowej przedstawiłem poniżej:

1. Rozdział 1.4. – problematyka biosensorów ujęta dość wrywkowo i niespójnie (np. w części 1.4.2. Bioczujniki optyczne..., Autor opisuje działanie czujników optycznych),
2. Rozdział 2.4. – Autor przedstawił wykorzystanie polimerów przewodzących, jako warstw receptorowych sensorów potencjometrycznych zapominając o ważnej roli, jaką mogą pełnić w sensorach na stałym podłożu (*all-solid-state*), jako warstwy przejściowe (*solid-contact*),
3. Rozdział 3.2. – zabrakło doprecyzowania, jaka jest rola polimerów przewodzących (np. polipirolu, polianiliny) w opisanych konstrukcjach biosensorów (matryca membranowa, warstwa przewodząca czy warstwa receptorowa?),
4. Rozdział 3.3. – opisane zostały przykładowe metody oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej, brak natomiast wzmianki o zastosowaniu ALP w konstrukcji bioczujników,
5. Rozdział 4 – nomenklatura – mikrosfery polimerowe modyfikowane odpowiednimi chromoforami/fluoroforami nie stanowią sensorów chemicznych (chromojonofor nie jest także czujnikiem chemicznym); ponadto w części tej dość lakonicznie opisany jest sposób modyfikacji/uczulania mikrosfer a zupełnie brakuje informacji, czy mikrosfery polimerowe są stosowane w konstrukcji sensorów chemicznych.

Zaprezentowany w części doświadczalnej materiał (opis badań, dyskusja wyników i sformułowane wnioski) dają podstawę do stwierdzenia, że eksperymenty zostały właściwie przeprowadzone, co doprowadziło Autora do realizacji celów rozprawy. Jednak w niektórych przypadkach pomiary nie zostały dobrze zaplanowane a uzyskane wyniki nie są kompletne (np. parametry pracy (bio)czujników nie zostały w sposób systematyczny wyznaczone); w przypadku warstw receptorowych wykorzystujących kropki kwantowe, przedstawione eksperymenty są bardzo ograniczone i wręcz wrywkowe (z tego względu uważam, że ten wątek mógłby być pominięty w rozprawie, która ograniczałaby się wtedy do badań wyłącznie materiałów polimerowych). Poniżej, uwagi szczegółowe do części doświadczalnej:

1. Uważam, że termin „czujnik jednorazowego użytku” nie jest poprawny, gdyż czujniki z założenia są urządzeniami wielokrotnego użytku (proponuję w tym przypadku termin „jednorazowy test paskowy”),
2. Rozdział 8.1. – tak jak napisałem powyżej, wg mojej opinii kropki kwantowe CdSe/ZnS ze związanym powierzchniowo enzymem a także mikrosfery poliakrylanowe modyfiko-

- wane fluoresceiną i enzymem umieszczone w płytce 96-dołkowej nie są czujnikami (są to jedynie warstwy receptorowe),
3. Rozdział 8.2. – Autor założył porównanie właściwości elektrochemicznych i optycznych warstw zawiesiny polianiliny z typowymi warstwami polianiliny otrzymywanymi na drodze elektropolimeryzacji, tymczasem w rozdziale tym odnaleźć można jedynie krótki komentarz dotyczący porównania odpowiedzi prądowych,
  4. Rozdział 8.2.1. – z czego wynikają różnice w kształcie krzywych kalibracji na pH elektrod z węgla szklanego z naniesioną warstwą polianiliny (patrz rysunki 67 i 69)?,
  5. Rozdział 8.3 (str. 143-144) – nie zgadzam się z interpretacją wyników prezentowanych na rys. 77 tj. wyjaśnienia różnej czułości odpowiedzi czujników z warstwą PANI dla dwóch zakresów stężeń amoniaku (odpowieź sensora przy rozcieńczaniu  $\text{NH}_3$  sugeruje mechanizm stopniowego deprotonowania polimeru w całym zakresie stężeń); ponadto mylone są tutaj pojęcia „powtarzalność” i „odtworzalność” sensorów,
  6. Rozdział 8.5.1. – jaka jest powtarzalność oraz odtwarzalność opracowanych prostych biosensorów mocznika z warstwą polianiliny, stanowiących najważniejsze osiągnięcie w pracy?,
  7. Rozdział 8.5.2. i 8.5.3. – jaka jest zaleta spektrofluorymetrycznych metod oznaczania mocznika w płytkach 96-dołkowych z zastosowaniem mikrosfer poliakrylanowych modyfikowanych fluoresceiną i enzymem lub kropek kwantowych CdSe/ZnS ze związanym powierzchniowo enzymem, w stosunku do klasycznych metod analizy mocznika prowadzonych z enzymem w roztworze?
  8. Rozdział 8.6.2. – trudno jest na podstawie rysunków 110 i 111 wykreślić jakąkolwiek krzywą kalibracji czujnika (w czasie eksperymentu sygnał badanych czujników nie stabilizował się),
  9. Rozdział 8.7. i 8.8. – w analizie aktywności ALP wykorzystywany jest czujnik pH z warstwą polianiliny – jaka jest jednak zaleta takiej metody pomiarowej w porównaniu do podobnego eksperymentu, w którym detekcja zmian pH byłaby prowadzona za pomocą komercyjnej elektrody pH?; ponadto, w tytułach tych rozdziałów zastąpiłbym „zawartość ALP” wyrażeniem „aktywność ALP”.

W końcowym rozdziale rozprawy Autor przedstawił podsumowanie wyników prac badawczych prowadzonych w trakcie doktoratu. W części tej brakuje moim zdaniem nieco pogłębionej dyskusji i krytycznej analizy otrzymanych wyników, które umożliwiłyby np. sformułowanie wniosków wskazujących perspektywy dalszych badań aplikacyjnych w tym kierunku.

### **Podsumowanie recenzji**

Pomimo moich krytycznych uwag przedstawionych powyżej, pracę doktorską Pawła Malinowskiego oceniam pozytywnie. Na podkreślenie zasługują w szczególności wyniki badań potwierdzające możliwość konstrukcji elektrochemicznych/optycznych biosensorów na stałym podłożu (tzw. *all-plastic*) lub jednorazowych testów paskowych z zastosowaniem warstw polimeru przewodzącego – polianiliny. Zaletą takich urządzeń byłyby niewątpliwie niski koszt oraz bardzo prosta metoda ich wytwarzania przy zachowaniu zadowalających parametrów pracy.

Podsumowując uważam, że założenia prac badawczych zostały zrealizowane przez mgr Pawła Malinowskiego a jego praca doktorska stanowi w dużej części nowość naukową w dziedzinie projektowania warstw receptorowych biosensorów. Przedstawione wyniki badań o charakterze poznawczym i aplikacyjnym zostały opublikowane w postaci dwóch artykułów w czasopiśmie z listy filadelfijskiego Instytutu Informacji Naukowej. Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia kryteria określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 ze zm. w Dz. U. z 2005 r. Nr 164 poz. 1365) i wnoszę o jej przyjęcie i dopuszczenie do publicznej obrony.

*Wojciechowski*