

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**„ELEKTROCHEMICZNA DETEKcja WYBRANYCH BIAŁEK I CUKRÓW
Z WYKORZYSTANIEM UKŁADÓW MEDIOWANYCH”**

(“ELECTROCHEMICAL DETECTION OF SELECTED PROTEINS AND SUGARS USING MEDIATED SYSTEMS”)

Promotor: dr hab. Anna M. Nowicka

Od wielu lat obserwuje się gwałtowny rozwój medycyny, a w szczególności diagnostyki medycznej. Odkrywanie nowych oraz udoskonalanie już istniejących narzędzi diagnostycznych jest niezwykle pomocne we wczesnej diagnostyce i terapii licznych chorób i schorzeń. Podstawą analizy diagnostycznej jest charakterystyka ilościowa biomarkerów, którymi najczęściej są białka, geny, czy też cukry.

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy zagadnienia konstrukcji czujników elektrochemicznych do mediowanej detekcji istotnych z medycznego punktu widzenia biomolekuł. Badania nad mediowaną detekcją biocząsteczek są istotne ze względu na nowe możliwości, które pojawiają się wraz z wprowadzeniem mediatora redoks do układu. Tego typu cząsteczki mają głównie za zadanie zwiększyć szybkość i efektywność przeniesienia ładunku. Ważną zaletą układów mediowanych jest brak konieczności unieruchamiania biocząsteczek na podłożu przewodzącym, czego konsekwencją jest minimalizacja, a nawet eliminacja niepożądanego procesu denaturacji i deaktywacji. Zastosowanie próbnika redoks umożliwi ponad to detekcję cząsteczek, które nie są elektroaktywne. W rozprawie doktorskiej opisano czujniki bazujące na mediowanym transporcie elektronów do detekcji ceruloplazminy, białka C-reaktywnego oraz glukozy z wykorzystaniem nowo zsyntezowanych koniugatów ferrocenu. Ferrocen i jego pochodne ferrocenu charakteryzujące się biernością chemiczną, wysoką stabilnością, trwałością oraz bardzo dobrą rozpuszczalnością w szerokiej gamie rozpuszczalników. Procesy elektrodowe ferrocenu i jego pochodnych są odwracalne, jednoelektronowe i charakteryzują się dużą szybkością przeniesienia elektronu. Funkcjonalność zaproponowanych narzędzi diagnostycznych sprawdzono na próbkach rzeczywistych jak osocze krwi, czy też napoje typu „*soft drink*”.

W przygotowaniu warstwy analitycznie aktywnej do mediowanej detekcji ceruloplazminy wykorzystano koniugat (nanocząstka magnetyczna z żelaznym rdzeniem)-ferrocen. Paramagnetyczne właściwości samej ceruloplazminy, jak i stosowanego układu receptorowego pozwoliły na prowadzenie pomiarów w obecności zewnętrznego źródła pola magnetycznego, co w konsekwencji znacznie poprawiło parametry analityczne czujnika takie jak: selektywność, czas życia czujnika oraz umożliwiło prowadzenie oznaczeń na ultra-niskim poziomie ($0.07 \mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$) w próbkach rzeczywistych. Z kolei wykorzystanie zjawiska okluzji próbnika redoks pomiędzy cząsteczkami białka unieruchomionego na powierzchni elektrody na skutek specyficznego oddziaływania antygen – przeciwciała umożliwiło woltamperometryczną detekcję nieelektroaktywnego białka CRP, biomarkera stanów zapalnych. Okluzja próbnika redoks jest doskonałym parametrem diagnostycznym, jednakże muszą zostać spełnione dwa podstawowe kryteria: próbnik redoks musi być wprowadzony na powierzchnię elektrody za pośrednictwem labilnego łącznika o odpowiedniej długości, a jego proces elektrodowy powinien być szybki, odwracalny i jednoelektronowy.

Kolejnym czujnikiem przedstawionym w dysertacji był czujnik do monitorowania dyskretnych zmian stężenia glukozy, umożliwiający wczesną diagnostykę wielu chorób, jak również kontrolę poziomu cukrów w procesach technologicznych, np.: fermentacja. W tym przypadku zastosowano dwa różne podejścia, wykorzystując w roli receptora zredukowany tlenek grafenu domieszkowany różnymi pochodnymi ferrocenu oraz polimerowe pochodne kwasu fenyloboronowego. Zredukowany tlenek grafenu jest doskonałym podłożem do modyfikacji elektrod, gdyż ma odpowiednio wysoką trwałość, bardzo dobre właściwości przewodzące oraz rozbudowaną powierzchnię. Wykorzystując nowo zsyntezowane receptory rGO-Fc oraz oksydazę glukozową skonstruowano bioczujniki II generacji. Na podstawie przeprowadzonych badań udowodniono, że sposób wprowadzenia ferrocenu na powierzchnię rGO, jak również funkcjonalizacja próbnika redoks grupami karboksylowymi pozwoliła na zminimalizowanie ilości enzymu w warstwie receptorowej z zachowaniem jego maksymalnej aktywności. Zaproponowane czujniki do amperometrycznej detekcji glukozy umożliwiają oznaczanie tego cukru na bardzo niskim poziomie. Badania z wykorzystaniem koniugatu rGO-ferrocen dotyczyły nie tylko aspektów analitycznych, ale również określenia wpływu obecności ferrocenu na strukturę rGO oraz orientacji cząsteczek ferrocenu względem grafenu. Te elementy są ważnym wkładem w zrozumienie działania czujnika.

Podejście z wykorzystaniem polimerowych pochodnych kwasu fenyloboronowego umożliwiło detekcję glukozy w obecności fruktozy. Proces rozpoznania glukozy opierał się na różnicy w powinowactwie zastosowanych pochodnych kwasu fenyloboronowego

względem glukozy i próbnika redoks (Fc-1,3-diol). W wyniku kontaktu warstwy receptorowej (GC/R-Ph-B(OH)₂-Fc-1,3-diol) z roztworem glukozy pochodna ferrocenowa tworząca ester z kwasem fenyloboronowym ulegała podstawieniu przez glukozę. Zgodnie z najnowszą wiedzą, taki sposób oznaczania glukozy został zademonstrowany po raz pierwszy. Dodatkowo, czujnik charakteryzował się dużą czułością, selektywnością, niską granicą wykrywalności i łatwością konstrukcji.

Przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki stały się podstawą publikacji naukowych w międzynarodowych czasopismach o bardzo wysokim współczynniku oddziaływania (IF=10.52), tj. 3 × *Biosensors & Bioelectronics* oraz jedna praca wysłana do recenzji.