



dr hab. Agnieszka Nosal - Wiercińska, prof. uczelni

Katedra Chemii Analitycznej

Instytut Nauk Chemicznych

Wydział Chemii

Pl. M. Curie – Skłodowskiej 3/518

20-031 Lublin

Tel. 81 537 56 27

Lublin, 23.07.2020

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Jakuba Piotra Sęka
pt. „Elektrochemiczna detekcja wybranych białek i cukrów z wykorzystaniem
układów mediowanych”

Praca została wykonana pod kierunkiem dr hab. Anny Marii Nowickiej jako promotora i przedstawiona Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Rozwój przemysłu, degradacja środowiska oraz specyficzny tryb życia człowieka doprowadził do pojawienia się nowego zjawiska, jakim są choroby cywilizacyjne. Wśród nich bardzo ważne miejsce zajmują choroby nowotworowe czy autoimmunologiczne, które niejednokrotnie są trudne do diagnozowania i leczenia.

Rozpoznanie choroby, w sensie procedury diagnostycznej, można traktować jako próbę klasyfikacji stanu chorobowego danej osoby i niekoniecznie musi ona obejmować wyjaśnienie jego etiologii. Wybór rodzaju badania oraz kolejność, dokonywane są przede wszystkim pod kątem: jak najszybszego ustalenia rozpoznania stanu klinicznego chorego, bezpieczeństwa badań, klinicznej przydatności badania, wiarygodności, czasu oczekiwania na wyniki i kosztu badania.

Podstawą analizy diagnostycznej jest charakterystyka ilościowa takich biomarkerów jak: białka, geny czy cukry. Sprawne wykrywanie ich oraz deskrypcja umożliwia wskazanie na ryzyko wystąpienia danej choroby, wczesną diagnozę oraz zastosowanie właściwego procesu terapeutycznego.

W świetle tego zasadne wydaje się odkrywanie nowych oraz udoskonalanie istniejących już narzędzi i procedur diagnostycznych.

Stosowanie różnorodnych czujników i procedur analitycznych pozwala w szybki i jednoznaczny sposób wykryć poszukiwaną substancję w analizowanej próbce, zarówno medycznej jak i środowiskowej. Bardzo dobrze w ten trend wpisują się techniki voltamperometryczne, które to cechuje: krótki czas pomiaru, niski koszt eksploatacji, brak konieczności wstępnej obróbki próbki oraz możliwość kontroli czułości.



dr hab. Agnieszka Nosal - Wiercińska, prof. uczelniKatedra Chemii Analitycznej
Instytut Nauk Chemicznych
Wydział Chemii
Pl. M. Curie – Skłodowskiej 3/518
20-031 Lublin
Tel. 81 537 56 27

Mimo to w analizie cząsteczek biologicznych stosowanie technik woltamperometrycznych jest dużym wyzwaniem, ze względu na np. możliwość niepożądanego adsorbpcji na elektrodzie czy też trudności wynikających z transportu elektronów pomiędzy biomolekułą a powierzchnią elektrody.

Mając to na uwadze Doktorant zrealizował badania, których celem było opracowanie procedur woltamperometrycznych detekcji wybranych białek (ceruloplazminy i białka C-reaktywnego) i glukozy z wykorzystaniem układów mediowanych. Skonstruowano czujniki bazujące na mediowanym transporcie elektronów do wykrywania wyżej wymienionych biomolekuł z wykorzystaniem nowo zsyntezowanych koniugatów ferrocenu. Ponadto wykazano funkcjonalność zaproponowanych narzędzi diagnostycznych na próbkach rzeczywistych takich jak osocze krwi czy napoje typu „soft drink”.

Przedłożona do recenzji dysertacja, licząca 203 strony, została napisana w układzie obejmującym: wstęp, cel pracy, część literaturową oraz eksperymentalną.

Wstęp uzasadnia wybór tematyki badawczej oraz wskazuje na jej istotne znaczenie.

W kolejnym rozdziale jasno postawiono *cel pracy* definiując jednocześnie niezbędne do realizacji tego celu szereg czynności badawczych.

Studia literaturowe przedstawione na 62 stronach oparto o 368 pozycje bibliograficzne. Zawierają one dokładną charakterystykę wybranych cząstek biologicznych tj. białek i węglowodanów, ich elektroaktywność, kliniczne metody oznaczania. W końcowych fragmentach tego działu wskazano na zastosowane techniki badawcze w pracy. Ta część pracy napisana jest w sposób logiczny i spójny, co świadczy o dobrym opanowaniu literatury przedmiotu przez Doktoranta.

Obszerną część pracy stanowi *część doświadczalna*. Autor scharakteryzował używane odczynniki, aparaturę badawczą oraz etap właściwego przygotowania powierzchni elektrody pracującej.

Kolejne, szczegółowo omawiane rozdziały, w których przeprowadzono ciekawą i szeroką dyskusję kończącą się podsumowaniem, oparto o najnowszą literaturę.



dr hab. Agnieszka Nosal - Wiercińska, prof. uczelniKatedra Chemii Analitycznej
Instytut Nauk Chemicznych
Wydział Chemii
Pl. M. Curie – Skłodowskiej 3/518
20-031 Lublin
Tel. 81 537 56 27

Przedstawiono dokładną charakterystykę analityczną czujnika do mediowanej detekcji ceruloplazminy wykorzystującego w roli warstwy analitycznie aktywnej nanokoniugat kapsuł węglowych z żelaznym rdzeniem i ferrocenu.

Następnie zaproponowano immunoczuJNIK jako wysoce selektywne i czułe narzędzie do elektrochemicznej detekcji nieaktywnego elektrochemicznie białka C-reaktywnego oparte na polietylenoiminie domieszkowanej ferrocenem.

Wskazano na zastosowanie odpowiednio przygotowanych i sfunkcjonowanych ferrocenem materiałów grafenowych jako bioplatformę do enzymatycznych czujników do elektrochemicznej detekcji glukozy.

Kolejny rozdział dotyczył charakterystyki i zasady działania czujników do voltamperometrycznej detekcji glukozy z wykorzystaniem pochodnych kwasu fenyloboronowego.

Ta część dysertacji pokazuje bardzo szeroki zakres badań eksperymentalnych, jak również bogate spektrum technik, które to umożliwiły przedstawienie nowych rozwiązań elektrochemicznych do detekcji tak istotnych dla życia człowieka biomolekuł.

Należy również zauważyć, że część badań dotycząca platform wykorzystywanych w konstrukcji warstw receptorowych opisanych czujników realizowana była we współpracy z dr. inż. Arturem Kasprzakiem z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej.

Wnioski końcowe wynikające z przeprowadzonych doświadczeń zostały poprawnie sformułowane i zamieszczone w oddzielnym rozdziale. Ich analiza dowiodła, że cel badań został w pełni zrealizowany.

Końcowe fragmenty pracy zawierają spis prac naukowych opublikowanych w trakcie studiów doktoranckich oraz bibliografię. Praca oparta jest na 442 pozycjach bibliograficznych, z których wiele pochodzi z ostatnich lat, co świadczy o dużej aktualności podjętych badań.

W mojej ocenie do najważniejszych osiągnięć recenzowanej rozprawy należy:

- skonstruowanie voltamperometrycznego czujnika do mediowanej detekcji ceruloplazminy, opartego na nanokoniugatach (nanokapsuła węglowa z żelaznym rdzeniem)-ferrocen, który charakteryzuje się odpowiednią selektywnością wobec ceruloplazminy, czułością oraz wiarygodnością wyników,



dr hab. Agnieszka Nosal - Wiercińska, prof. uczelniKatedra Chemii Analitycznej
Instytut Nauk Chemicznych
Wydział Chemii
Pl. M. Curie – Skłodowskiej 3/518
20-031 Lublin
Tel. 81 537 56 27

- skonstruowanie czujnika elektrochemicznego do detekcji białka C-reaktywnego opartego na wykorzystaniu zjawiska okluzji próbnika redoks w warstwie, w wyniku specyficznego oddziaływania antygeny z przeciwciałem,
- konstrukcja wysoce selektywnego czujnika do detekcji stężenia glukozy we krwi z wykorzystaniem zredukowanego tlenku grafenu (rGO) domieszkowanego niepodstawionym ferrocenem (rGO-Fc) i ferrocenem z dwiema grupami karboksylowymi (rGO-Fc(COOH)₂).

Niezależnie jednak od mojej pozytywnej oceny jakości zaprezentowanych badań, nasunęły mi się w czasie jej lektury drobne uwagi i pytania. Dotyczą one następujących zagadnień (w kolejności występowania):

- według Autora pracy „Procedura przygotowania warstwy analitycznie aktywnej czujnika do mediowanej detekcji ceruloplazminy była bardzo prosta i obejmowała tylko jeden etap”. Nie do końca zgadzam się z tym stwierdzeniem, ponieważ procedura wymagała syntezy nanokoniugatu, następnie naniesieniu jego wodnej zawiesiny na powierzchnię węgla szklanego, suszenia przez 12 godz. i jeszcze elektrochemicznego przygotowania elektrody (rejestracja CV w 0,02 M buforze fosforanowym z dodatkiem 0,15 M K₂SO₄ w zakresie potencjałów od 0 do 0,8 V, aż do uzyskania stabilnego woltamperogramu,
- sygnał prądowy nanokoniugatu Fe@C-Fc-1 pojawiał się przy większych wartościach potencjału, przy ok. 0,55 V w odniesieniu do sygnału prądowego nanokoniugatu Fe@C-Fc-2, który obserwowano przy potencjale ok. 0,35 V. Czym jest w takim razie spowodowany dodatkowy pik przy potencjale ok. 0,35 V (Rys. 38 A)?,
- czym spowodowana jest kilkakrotnie wyższa granica wykrywalności celulozoplazminy od pierwszego oznaczanego stężenia z krzywej kalibracyjnej? Podobna sytuacja jest w przypadku oznaczeń białka C-reaktywnego na podstawie pomiaru zmian oporności przeniesienia ładunku?,
- dlaczego w przypadku woltamperometrycznych oznaczeń glukozy Autor pracy nie zdecydował się na sprawdzenie funkcjonalności czujnika w analizie próbek krwi, w odróżnieniu do chronoamperometrycznych oznaczeń?,



dr hab. Agnieszka Nosal - Wiercińska, prof. uczelniKatedra Chemii Analitycznej
Instytut Nauk Chemicznych
Wydział Chemii
Pl. M. Curie – Skłodowskiej 3/518
20-031 Lublin
Tel. 81 537 56 27

- w pracy nie dostrzegłam badania wpływu parametrów techniki woltamperometrycznej na sygnały analityczne. Czy takie badania były prowadzone? Dodatkowo czy Autor badał wpływ rodzaju techniki na sygnał. Opis stosowanych parametrów powinien się znaleźć pod krzywymi woltamperometrycznymi,
- w pracy zabrakło mi (z wyjątkiem woltamperometrycznych oznaczeń glukozy) porównania parametrów analitycznych z danymi literaturowymi dla innych dotychczas stosowanych czujników. Na jakiej podstawie w tabeli 8 Autor dokonał wyboru woltamperometrycznych czujników ceruloplazminy ?,
- inne: zamiast kropek przy wartościach liczbowych powinny być przecinki; nie można mylić detekcji (wykrywania) z oznaczeniami ilościowymi; granica wykrywalności zamiast limit detekcji, natężenie prądu zamiast intensywność prądu; woltamperometria impulsowo-różnicowa zamiast pulsowo-różnicowa.

Powyższe uwagi, sugestie i zapytania nie umniejszają jednak wartości merytorycznej prezentowanych rezultatów oraz mojej bardzo pozytywnej oceny.

Dorobek Doktoranta obejmuje: 7 publikacji w czasopiśmie naukowych posiadających bardzo wysoki współczynnik wpływu IF, 1 rozdział w monografii oraz wiele prezentacji na konferencjach naukowych.

Podsumowując, uważam, że założony przez Pana mgr. Jakuba Piotra Sęka cel badań został zrealizowany, a otrzymane wyniki w znacznym stopniu poszerzają dotychczasowy stan wiedzy w dziedzinie elektrochemii. Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania mogą zostać wykorzystane w praktyce stanowiąc pewien rodzaj alternatywy do powszechnie znanych i stosowanych metod diagnostyki laboratoryjnej.

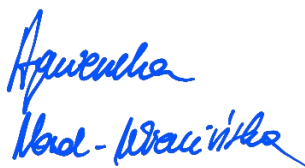
W podsumowaniu stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska Pana mgr. Jakuba Piotra Sęka w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami). Dlatego też wnioskuję do Wysokiej Rady



dr hab. Agnieszka Nosal - Wiercińska, prof. uczelni

Katedra Chemii Analitycznej
Instytut Nauk Chemicznych
Wydział Chemii
Pl. M. Curie – Skłodowskiej 3/518
20-031 Lublin
Tel. 81 537 56 27

Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o przyjęcie pracy i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Agnieszka Nosal – Wiercińska, prof. uczelni

