

Prof. dr hab. Sławomira Skrzypek
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Wydział Chemii UŁ,
Łódź, ul. Tamka 12
e-mail: skrzypek@uni.lodz.pl

Łódź 27.07.2020 r.

RECENZJA

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

Praca doktorska magistra Jakuba Sęka została zrealizowana w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrod Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, pod kierunkiem dr hab. Anny M. Nowickiej. Recenzowana rozprawa dotyczy badań mających na celu otrzymanie czujników elektrochemicznych służących do detekcji istotnych dla życia człowieka biomolekuł takich jak ceruloplazmina, białko C-reaktywne, glukoza. W wymienionych czujnikach elementem wspólnym jest zastosowanie mediatora przeniesienia ładunku – ferrocenu i jego pochodnych – mającego na celu zwiększenie szybkości i efektywności przeniesienia ładunku pomiędzy biomolekułą a powierzchnią pracującej elektrody.

Tematyka pracy doktorskiej realizowanej przez mgr Jakuba Sęka jest bardzo ważna i wpisuje się nurt zainteresowań wielu dziedzin głównie związanych z medycyną, ale również biotechnologią, czy też przemysłem spożywczym. Na przykładzie bioczujnika glukozy można stwierdzić, że istnieje ciągłe zapotrzebowanie na nowe rozwiązania umożliwiające oznaczanie biomolekuł mające na celu obniżenie granicy wykrywalności, zwiększenie zakresu liniowości, zmniejszenie interferencji związanych z matrycą próbki, miniaturyzację, zmniejszenie kosztów itp. Obecnie jednym z najbardziej popularnych sposobów oznaczania glukozy są procedury wykorzystujące właśnie sensory. Świadczy o tym chociażby rosnąca z roku na rok liczba artykułów naukowych poświęconych tej tematyce.

Biosensory są proste w użyciu i bardzo dokładne w przypadku wykrycia analitów. Ze względu na diagnostykę laboratoryjną, zgodnie z raportem „Global Biosensors Market - By Type, Component, Industry, Regions - Market Size, Demand Forecasts, Industry Trends and Updates (2016-2022)” rynek biosensorów został wyceniony w 2016 roku na 15,96 mld USD i szacuje się, że w roku 2022 osiągnie przychody rzędu 27,06 mld USD.

Przedstawiona do recenzji w klasycznym układzie na 203 stronach praca składa się z części literaturowej (63 strony) oraz części eksperymentalnej (93 strony). Przed częścią teoretyczną Autor zamieścił cel pracy w którym przedstawił także cele szczegółowe. Podsumowaniem części doświadczalnej są przejrzyste wnioski końcowe. Bardzo dobrze napisane zwięzłe streszczenie informuje o najważniejszych osiągnięciach pracy. Rozprawa zawiera spis odnośników do cytowanej literatury obejmujący aż 442 pozycji, w pracy można znaleźć kilkadziesiąt rysunków i tabel. Poglądowe, kolorowe rysunki zostały wykonane bardzo starannie, co ułatwia czytanie i zrozumienie pracy. Przydatny też jest alfabetyczny spis skrótów stosowanych w pracy, przedstawiony na str.21.

Część literaturowa jest ściśle związana z tematyką prowadzonych badań eksperymentalnych. Autor w kompetentny sposób scharakteryzował biologicznie czynne objekty badań takie jak ceruloplazmina,

białko C-reaktywne, opisał glukozę jako źródło energii dla komórek. Następnie skupił się na elektroaktywności biocząsteczek, sposobie transportu elektronów pomiędzy białkiem, a powierzchnią elektrody: bezpośrednim przeniesieniem elektronu i przeniesieniem elektronu z udziałem mediatora. W tego typu pracach w części literaturowej zwyczajowo przedstawiane są metody oznaczania badanych substancji. W pracy doktorskiej Pana magistra Sęka, ze względu na przeprowadzone oznaczenia ceruloplazminy, białka C-reaktywnego, glukozy znajdujemy odniesienia do diagnostyki laboratoryjnej białek i węglowodanów. Na koniec części teoretycznej Doktorant przedstawił najważniejsze informacje o metodach pomiarowych zastosowanych w niniejszej rozprawie: woltamperometrii cyklicznej, pulsowej różnicowej, prostokątnej, chronoamperometrii, spektroskopii impedancyjnej, a także elektrochemicznej mikrowadze kwarcowej. Drobnym mankamentem, ze względu na stosowanie pola magnetycznego w woltamperometrycznym oznaczaniu ceruloplazminy wydaje się brak krótkiego rozdziału opisującego podstawowe prawa magnetochemii. Z obowiązku recenzenta muszę też zwrócić uwagę na używanie wyrażenia „wykształcony sygnał” w przypadku rejestrowanych sygnałów woltamperometrycznych. Moim zdaniem sygnały woltamperometryczne są raczej ukształtowane, niż „wykształcone”. Reasumując uważam, że podane w części teoretycznej informacje są bardzo przydatne, umiejętnie przybliżają czytelnikowi problematykę rozprawy doktorskiej i stanowią dobre wprowadzenie do jej części eksperymentalnej. Ponadto można stwierdzić, że odpowiednio zebrana bibliografia dowodzi bardzo dobrej znajomości przedmiotu badań. Nie mam również zastrzeżeń do logiki i sposobu narracji wprowadzenia do rozprawy. Redakcja pracy jest bardzo staranna i dobrze się ją czyta.

W części doświadczalnej można wyróżnić cztery główne zadania, które stanowią podstawę przedstawionej rozprawy doktorskiej. Zadanie pierwsze dotyczyło woltamperometrycznej detekcji ceruloplazminy z wykorzystaniem nanokoniugatów nanocząstka magnetyczna-ferrocen w roli mediatora redoks. W rozdziale tym przedstawiono syntezę i charakterystykę magnetyczną nanokoniugatów (nanocząstka magnetyczna typu „rdzeń-powłoka” – ferrocen), a następnie charakterystykę elektrochemiczną elektrod modyfikowanych warstwą analitycznie aktywną (GC/Fe@C-Fc). Nanocząstki typu rdzeń-powłoka (nanokapsuły węglowe z żelaznym rdzeniem) charakteryzują się wysoką stabilnością, biokompatybilnością i co ważne - relatywnie niską tendencją do procesu agregacji, co wydaje się bardzo istotne przy przygotowaniu tego typu czujników. Konsekwencją obecności nanocząstek magnetycznych w zastosowanych koniugatach jest możliwość zastosowania pola magnetycznego, które wzmocniło transport substancji paramagnetycznych tak jak np. ceruloplazminy do powierzchni elektrody. Synteza i wykorzystanie w/w nanokoniugatów wydaje mi się nie tylko oryginalnym rozwiązaniem, ale przede wszystkim bardzo ciekawym z punktu widzenia elektroanalizy. Zastosowane kapsuły węglowe charakteryzowały się właściwościami magnetycznymi i stanowiły pewnego rodzaju filtr, który w pierwszej kolejności ściągał do powierzchni elektrody paramagnetyczny analit odpychając diamagnetyczne interferenty próbki rzeczywistej. W rozdziale mgr Sęk przedstawił analityczną charakterystykę czujników do mediowanej detekcji ceruloplazminy różniących się między sobą łącznikami węglowymi (łańcuchowy i pierścieniowy) w nanokoniugacie. Doktorant stwierdził, że nanokoniugat z łańcuchowym łącznikiem charakteryzował się lepszymi parametrami analitycznymi co wynikało z większej labilności próbniaka redoks w takim układzie. Tak zmodyfikowaną elektrodę wykorzystał do oznaczenia ceruloplazminy w osoczu krwi szczura, uzyskując wyniki (34 ± 8 mg dL⁻¹) potwierdzone metoda referencyjną – komercyjnie dostępnym testem na zawartość ceruloplazminy (34 ± 1 mg dL⁻¹). Opracowana metoda oznaczenia ceruloplazminy została zwalidowana. W tabeli 8 Autor przedstawił parametry analityczne wybranych czujników z mediowaną detekcją ceruloplazminy i w tym zestawieniu (prace z 2013 i 2014 roku zespołu

profesora Pingarrona) uzyskane przez Doktoranta czujniki charakteryzują się znacznie niższymi wartościami granicy wykrywalności. Co jednak ciekawe, zakresy analityczne (jeśli chodzi o rząd wielkości) są porównywalne i wynoszą aż do 10^4 (praca z mediatorem 1-NPP zakres 10 – 100000 $\mu\text{g dL}^{-1}$, opisywane czujniki - zakres 0.001 - 10 $\mu\text{g dL}^{-1}$).

Zadanie drugie dotyczyło skonstruowania czujnika do voltamperometrycznej detekcji nieaktywnego elektrochemicznie białka C-reaktywnego z wykorzystaniem procesu okluzji próbnika redoks. Tym razem w konstrukcji warstwy analitycznie aktywnej Doktorant z sukcesem wykorzystał kationowy polimer, polietylenoiminę (PEI) domieszkowaną ferrocenem, który stanowił platformę do kowalencyjnego wprowadzenia cząsteczek przeciwciała charakterystycznych do poszukiwanego antygeny – białka CRP. W oparciu o wyniki elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej mgr Sęk dokonał wyboru najlepszego modyfikatora powierzchni elektrody z węgla szklanego spośród domieszkowanych ferrocenem polimerów PEI o różnej masie, zoptymalizował warunki elektroosadzania filmu polietylenoiminy domieszkowanej ferrocenem badając między innymi zależność natężenia prądu elektrootleniania ferrocenu oraz różnicy położeni sygnałów elektrootleniania i elektroredukcji w funkcji liczby cykli volt amperometrycznych użytych podczas etapu elektroosadzania. Zasada działania immunoczuJNIKA do detekcji białka C-reaktywnego opiera się na wysoce specyficznym oddziaływaniu antygeny (analitu) z przeciwciałem, tak więc Autor po wytworzeniu filmu polimeru (PEI-Fc) na elektrodzie i aktywowaniu grup aminowych nakładał następnie na zmodyfikowaną powierzchnię kroplę roztworu przeciwciała. Po wyeliminowaniu procesu niespecyficznego adsorpcji białka C-reaktywnego poprzez zanurzenie do roztworu surowiczej albuminy wołowej, tak otrzymany czujnik zastosował do voltamperometrycznego (DPV) oznaczenia i/lub oznaczenia metodą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej w/w białka w zakresie od 1 do 5 10^4 ng mL^{-1} . Należy zauważyć, że Doktorant trafnie założył, że obecność wolnych grup aminowych pozwalających na kowalencyjne wiązanie cząsteczki przeciwciała za pośrednictwem grup karboksylowych powinna gwarantować ich pionowe ułożenie mające znaczenie dla selektywności, czy wręcz specyficzności opracowywanego czujnika. Orientację cząsteczek przeciwciała w warstwie rozpoznającej Doktorant potwierdził wyznaczając grubość warstwy przeciwciała na podstawie pomiarów wykonanych przy użyciu elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej z dyssypacją energii. Moim zdaniem takie podejście do zagadnienia świadczy o szerokiej wiedzy Doktoranta na temat konstrukcji immunosensorów, a także o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego. W dalszej części pracy Autor zbadał selektywność i stabilność opracowanego przez siebie immunoczuJNIKA uzyskując dobre rezultaty. Zastosował go ponadto do oznaczenia białka C-reaktywnego w próbkach krwi szczura. Uzyskane wyniki potwierdził za pomocą standardowych testów CRP.

Kolejne dwa rozdziały dotyczą badań opracowania sensorów do oznaczania glukozy. W pierwszym przypadku do konstrukcji biosensora mgr Sęk wykorzystał bioplatfomy oparte na zredukowanym tlenku grafenu domieszkowanym niepodstawionym ferrocenem lub dikarboksylową pochodną ferrocenu. Stwierdził, że bez względu na sposób wprowadzenia jednostek ferrocenowych na powierzchnię grafenu związana z taką bioplatformą oksydaza glukozy charakteryzowała się wysoką aktywnością wobec glukozy, co pozwoliło uzyskać granice jej wykrywalności na poziomie 30 nM. Jest to rzeczywiście bardzo dobry wynik. W pracy Doktorant przedstawił dobrze udokumentowaną w oparciu o widma FTIR, Ramana, zdjęcia SEM i STEM charakterystykę materiałów grafenowych.

W drugim przypadku Doktorant opracował czujniki do voltamperometrycznego oznaczania glukozy z wykorzystaniem pochodnych kwasu fenyloboronowego. Tym razem mgr Sęk zastosował jako warstwy receptorowe dendrymery poliamidoaminowe drugiej i trzeciej generacji domieszkowane pochodną

fenyloboronową bądź polietylenoiminę domieszkowaną pochodną tego kwasu. W oznaczeniu glukozy Doktorant wykorzystał fakt silniejszego powinowactwa związków fenyloboronowych do glukozy w przeciwieństwie do użytego mediatora redoks – pochodnej ferrocenu (2-((ferrocenylometylo)-amino)propano-1,3-diol). Doktorant opracował metody oznaczania glukozy z wykorzystaniem w/w czujników, przedstawił wartości parametrów analitycznych tych metody (zakres pracy czujników, granica wykrywalności względne odchylenie standardowe). Ponadto zbadał wpływ interferentów (fruktoza, kwas askorbinowy, kwas moczowy) na rejestrowane sygnały, przeprowadził analizę próbek rzeczywistych. Przedstawione wyżej rozwiązania są nowe jeśli chodzi o warstwy receptorowe i wnoszą ciekawe propozycje do ważnego obszaru sensorów glukozy.

Wszystkie przedstawione badania zawarte w przedłożonej do oceny pracy wykonano i opisano poprawnie. Część eksperymentalna jest bardzo obszerna i wymagała od Doktoranta bardzo dobrej znajomości technik elektrochemicznych i spektroskopowych.

Recenzentowi trudno było określić, którą część pracy można zaliczyć do najciekawszych osiągnięć naukowych i praktycznych Pana mgr Jakuba Sęka. Wiele badań jakie przedstawił w swojej pracy doktorskiej znalazły odzwierciedlenie w 3-publikacjach w bardzo wysoko punktowanym czasopiśmie z listy filadelfijskiej Biosensors and Bioelectronics I_f 2019 = 10.257, 5-o letni I_f = 8,669 i w rozdziale polskojęzycznej monografii. Publikacje wyników w tak dobrym czasopiśmie jak Biosensors and Bioelectronics potwierdzają oryginalność rozwiązań w opracowanych, elektrochemicznych czujnikach. Doktorant nie podaje czy przedstawiał wyniki badań na konferencjach krajowych i zagranicznych. Jest natomiast współautorem kolejnych 4 publikacji.

Podsumowując część eksperymentalną chciałabym podkreślić, że przeprowadzone przez Doktoranta badania wymagały specjalistycznej i szerokiej wiedzy. Doktorantowi udało zakończyć swoją pracę niewątpliwymi osiągnięciami. Świadczy to o bardzo dobrych podstawach naukowych, wszechstronności i nowoczesnym podejściu Doktoranta do postawionego problemu naukowego.

Po przeczytaniu pracy pojawia się jednak kilka uwag krytycznych czy pytań odnośnie sposobu prezentacji czy dyskusji wyników, które z pewnością mogą być wyjaśnione w trakcie publicznej obrony pracy.

- 1) Jak Doktorant definiuje określenie „detekcja”, a jak „oznaczenie” związku chemicznego? Tytuły rozdziałów mówią o voltamperometrycznej detekcji związku, ale już dany rozdział dotyczy *de facto* oznaczenia i finalnie podawany jest zakres stężeń w którym ten związek może być oznaczony za pomocą opracowanego czujnika.
- 2) Na str. 95 i na str. 101 Autor podaje, że nanokoniugaty mają właściwości paramagnetyczne, a na str.96, pisze, że „charakteryzują się słabymi właściwościami ferromagnetycznymi”. Z kolei z magnetycznych pętli histerezy nanokoniugatów wynika (Rys.33), że nanokoniugaty są ferromagnetyczne. Jakie właściwości mają więc wykorzystane nanokoniugaty?
- 3) Na str.101 Autor pisze, „Z literatury wiadomo, że pole magnetyczne generuje dwa rodzaje sił magnetycznych: siłę magnetohydrodynamiczną, nazywaną również siłą Lorentza oraz siłę gradientu pola magnetycznego, zwaną siłą Kelvina” [A.Bund, H. H. Kuehnlein; *J. Pys. Chem.* 109 (2005) 19845] Chciałabym się nie zgodzić z Panem Doktorantem, siłę magnetohydrodynamiczną nie nazywamy siłą Lorentza, ani w fizyce ani w magnetochemii, ani w teorii magnetyzmu i elektromagnetyzmu (R.P. Feynman, R.B. Leighton, M. Sands, *Feynmana wykłady z fizyki*, PWN, 2014, M. Pękała,

Eksperymentalne metody magnetochemii, Wyd. UW, Warszawa, 2013. H. Rawa, *Podstawy elektromagnetyzmu*, Wyd. P W, 2005). Zjawiska magnetohydrodynamiczne, które powstają na skutek działania siły Lorentza, zachodzą w cieczy, plazmie i trzeba uwzględniać dodatkowo np. gęstość, lepkość, stężenie, przewodnictwo elektryczne i nie da się opisać ich jednym równaniem. Do ich rozwiązania potrzebny jest układ równań. Ponadto, na str. 98 Autor pisze: „pole magnetyczne, które wzmacnia transport substancji paramagnetycznych np. ceruloplazminę do powierzchni elektrody”. Zasadniczo pole magnetyczne nie może wzmacniać transportu substancji, może najwyżej transport przyspieszać, opóźniać, ukierunkowywać.

- 4) Przy oznaczaniu ceruloplazminy lepsze wyniki uzyskuje się w obecności zewnętrznego źródła pola magnetycznego (niższa granica wykrywalności). Czym Doktorant tłumaczy rzeczywistą poprawę charakterystyki czujnika? W badaniach wykorzystywano magnesy neodymowe. Jakiego kształtu był stosowany magnes neodymowy, jak rozchodziły się linie pola magnetycznego i jak działały siły magnetyczne na badany obiekt? Cytowana wcześniej literatura N. Leventis, N. Chandrasekaran, A. Dass, X. Gao; *ECS Trans.* 13 (2008) 25 (na marginesie numer voluminu tego artykułu to 16, a nie 25), A. Bund, H. H. Kuehnlein; *J. Phys. Chem.* 109 (2005) 19845 dotyczy badań przy udziale elektromagnesu. Wiadomo, że powstające linie indukcji magnetycznej są różne w różnych źródłach pola.
- 5) W opracowywaniu metody oznaczania ceruloplazminy Doktorant wykorzystywał magnesy neodymowe o indukcji magnetycznej $B = 40$ mT. Czy zastosowanie zewnętrznego źródła pola magnetycznego o większej wartości indukcji magnetycznej (B) wpłynęłoby znacząco na wyniki oznaczenia ceruloplazminy?
- 6) Prezentując wyniki charakterystyki analitycznej czujników w przypadku obu zastosowanych koniugatów Doktorant podaje, że ceruloplazminę można oznaczyć w zakresie stężeń od 0.05 do $10 \mu\text{g L}^{-1}$ i od 0.01 do $10 \mu\text{g L}^{-1}$ odpowiednio w nieobecności i obecności pola magnetycznego, zaś wyznaczone granice wykrywalności dla obu koniugatów są wyższe niż najniższe stężenie z zakresu oznaczalności. Jak można wytłumaczyć zaistniałą sytuację? Jak w trakcie pomiarów danej serii były regenerowane w/w czujniki?
- 7) Na wielu wykresach, w tym na wykresach przedstawiających zależność natężenia prądu badanego sygnału lub różnicy prądów od stężenia badanego związku przedstawiane są słupki błędów. Jakie były parametry statystycznej oceny wyników (n , P , α)? Podobny brak zauważam przy podawaniu przedziału ufności podczas określania stężeń badanych analitów (np. str.109, str.111, str.137, str. 163). Jest to szczególnie ważne w sytuacji kiedy czułość sensora jest bardzo wysoka (np. w przypadku ceruloplazminy możliwość jej oznaczania w bardzo szerokim zakresie stężeń od $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ do $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (zmiana stężenia 10.000 razy), podczas gdy wartości prądu utlenienia zmienia się jedynie od około 2 do 15 μA (rys.38).
- 8) W przypadku oznaczania białka C-reaktywnego Doktorant przedstawia krzywą kalibracji zależności różnicy wartości oporu przeniesienia ładunku immunoczuJNIKA po i przed jego oddziaływaniem z białkiem C-reaktywnym od stężenia białka (Rys.58). Tak więc w przypadku nieobecności białka ($c=0$), wartość różnicy oporu też powinna wynosić „0”. Skąd więc obecność „ślepej próby” na wykresie? Tu także wyznaczona granica wykrywalności związku (2.5 ng mL^{-1}) jest wyższa niż zakres liniowej odpowiedzi czujnika (od 1.0 do $5.0 \cdot 10^{-4} \text{ ng mL}^{-1}$).

- 9) Funkcjonalność biocujników do detekcji glukozy z wykorzystaniem zredukowanego tlenku grafenu domieszkowanego ferrocenem została sprawdzona na dwóch próbkach rzeczywistych tj., w osoczu krwi szczura i w soku pomarańczowym. Jaka metodę referencyjną Doktorant zastosował w tym oznaczeniu?
- 10) Nie jestem przekonana, że „dokładność pomiaru można zbadać metodą odzysku” w sytuacji kiedy badana próbka już zawiera analit (oznaczenie glukozy we krwi szczurzej, str. 162). Doktorant dodawał znaną ilość glukozy (znane stężenie) do rozcieńczonego osocza o nieznanym stężeniu glukozy. Proszę o dyskusję w trakcie obrony pracy.
- 11) W rozdziale dotyczącym voltamperometrycznej detekcji glukozy w oparciu o fenyloboronowe receptory Doktorant przedstawił wyniki oznaczania glukozy w próbce napoju. Wykryte stężenie glukozy wynosiło: $1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ (czujnik z polimerem kationowym) i $1.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ (czujnik z dendrymerem). Stężenie glukozy podane przez producenta wynosiło 0.14 mM (str 183). Jak Doktorant skomentuje tak duże różnice w oznaczeniu?

Pomimo moich powyższych uwag krytycznych które mają oczywiście charakter dyskusyjny chciałabym wyrazić moje uznanie dla wkładu pracy Doktoranta, podkreślić wysokie znaczenie naukowe uzyskanych wyników i ocenić recenzowaną przeze mnie pracę doktorską bardzo dobrze. Przedstawioną pracę cechuje wysoki poziom naukowy, praca wykazuje oryginalność rozwiązań, posiada wyraźny element nowości naukowej i spełnia wszelkie wymagania Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 17 marca 2003 r.(wraz z późniejszymi zmianami) stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Jakuba Sęka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sławomira Skrzypek