



Warszawa, 4 lipca 2022

Prof. dr hab. Barbara Pałys
Wydział Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Mgr Inż. Kamili Spychalskiej zatytułowanej
Konstruowanie układów biosensorowych modyfikowanych strukturami półprzewodnikowymi

Praca doktorska mgr inż. Kamili Spychalskiej została wykonana pod kierunkiem pani profesor Joanny Cabaj na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, której osiągnięcia w badaniach materiałów półprzewodnikowych i ich zastosowań do konstrukcji sensorów są znane w środowisku naukowym.

Tematyka publikacji, których współautorką jest pani mgr inż. Spychalska obejmuje nowe metody analityczne służące do oznaczania substancji biologicznych. W rozprawie przedstawionej do recenzji autorka opisuje szczegółowo biosensory elektrochemiczne do oznaczania estrogenów, w szczególności 17- β -estradiolu (E2), chociaż jej dorobek publikacyjny jest szerszy i obejmuje między innymi sensory optyczne do oznaczania E2 i sensory elektrochemiczne do oznaczania innych związków biologicznych. Rozprawa koncentruje się na sensorach elektrochemicznych składających się z warstwy półprzewodzącej na elektrodzie platynowej oraz unieruchomionych na tego rodzaju warstwie elementów receptorowych. Do opisanych warstw półprzewodzących należą pochodne ditienosilolu z podstawnikami tiofenowymi lub etylenodioksytiofenowymi, pochodna benzotiadiazolu z podstawnikami tiofeno-etylenodioksytiofenowymi oraz pochodna pirydyny z dwoma podstawnikami bitiofenowymi i podstawnikiem alkilotiofenowym. Jako elementy receptorowe zostały zastosowane przeciwciała Anty-E2-Ab lub enzymy: peroksydaza chrzanowa (HRP), tyrozynaza (TYR) lub lakaza (LAC). Dzięki takiemu wyborowi układów rozprawa stanowi spójną całość pod względem merytorycznym. Celem głównym pracy doktorskiej było porównanie możliwości zastosowania wymienionych związków do oznaczania E2.

Rozprawa została podzielona na części zawierające kolejno: wprowadzenie i cele badawcze pracy, część teoretyczną, część badawczą, wyniki i dyskusję, wnioski oraz podsumowanie. Podział pracy jest to typowy dla opracowań naukowych w naukach eksperymentalnych. Praca zawiera wykaz skrótów, schematów i tabel, co bardzo ułatwia czytanie. Pod względem formalnym praca



jest bez zarzutu. Jest napisana bardzo starannie. Błędy edytorskie są nieliczne. Praca jest bardzo dobrze przygotowana także pod względem graficznym. Zawiera wyraźne, dobrze przemyślane schematy ułatwiające zrozumienie tekstu. Język pracy jest poprawny. Bardzo dobrze oceniam stosowanie przez autorkę polskich odpowiedników wyrażenia angielskich, jeśli jest to możliwe. Na przykład stosuje wyrażenie „polimery sprzężone”, a nie „conjugated polymers”. Nieco gorzej oceniam stosowanie zabiegów stylistycznych w teście, które mogą budzić wątpliwości u czytelnika. Przykładowo na stronie 96 autorka pisze o „strumieniu elektronów” zamiast o wartości prądu. Na stronie 114 autorka stosuje wyrażenie „białko”, żeby uniknąć powtórzenia słowa „enzym”. W tym wypadku należałoby jednak zrezygnować z elegancji na rzecz ścisłego wyrażania się, gdyż czytelnik mógłby „białko” zrozumieć, jako apoenzym. Chcę podkreślić, że wymienione drobne nieścisłości nie wpływają na odbiór całości tekstu. Autorka dołożyła starań, żeby tekst był ścisły, a jednocześnie zrozumiały dla szerokiego grona czytelników.

Wstęp teoretyczny autorka rozpoczyna od definicji biosensorów oraz opisu parametrów analitycznych opisujących ich działanie, następnie wprowadza czytelnika do zastosowań biosensorów w medycynie, przemyśle spożywczym, ochronie środowiska i rolnictwie. Następnie opisuje szczegółowe elementy składowe biosensorów, takie jak receptory w tym przeciwciała, mikroorganizmy, komórki i tkanki, kwasy nukleinowe i aptamery wraz z metodami ich unieruchamiania oraz polimery przewodzące, które stanowią matryce do unieruchamiania elementów receptorowych. Kilka stron poświęca także związkom endokrynnie czynnym, do których należą analizowane przez nią estrogeny. W części teoretycznej autorka cytuje około 180 prac, co świadczy o szerokiej znajomości literatury. Sięga zarówno po prace oryginalne, jak przeglądowe. Podaje przykłady biosensorów elektrochemicznych zaczerpnięte z najnowszej literatury. Wybór prac cytowanych jest odpowiedni, chociaż do opisu oksydoreduktaz można było sięgnąć po prace grupy Lo Gortona, Daniela Leech'a i niektórych polskich autorów np. Jerzego Rogalskiego. Część teoretyczna bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę biosensorów i przedstawia wiedzę niezbędną do dyskusji wyników własnych. Jedynie w niektórych fragmentach części teoretycznej pojawiają się niejasności. Przykładowo wątpliwości budzi stwierdzenie, że biocujniki pierwszej generacji wymagają wysokiego potencjału wskaźnika redoks (strona 17), co jest niezrozumiałe, gdyż w biosensorach pierwszej generacji nie ma wskaźnika redoks. Możliwe, że chodziło o elektroaktywny produkt reakcji enzymatycznej – jak H_2O_2 w czujnikach zawierających oksydazę glukozową. Rzeczywiście tego rodzaju czujniki mogą być podatne na interferencje, jak autorka pisze wcześniej w rozdziale 2.1.1.



Z kolei opisując mechanizm katalityczny lakazy autorka pisze: „Mechanizm katalityczny lakazy rozpoczyna się od oddania elektronu przez atom miedzi T1, po którym następuje wewnętrzny transfer elektronów ze zredukowanego T1 do miedzi T1 i T3.” Zdanie to zawiera sprzeczność, bo skoro centrum T1 oddaje elektron, to znaczy, że jest utlenione, a nie zredukowane. Mam nadzieję, że autorka omówi ten fragment tekstu w czasie obrony pracy.

Wymienione niejasności są nieliczne biorąc pod uwagę objętość części teoretycznej, która jak wspomniano wyżej jest bardzo dobrym wprowadzeniem do opisu badań własnych autorki.

Część badawczą rozpoczyna krótkie przypomnienie celu rozprawy, który autorka dzieli na zadania badawcze:

- projekt, synteza oraz charakterystyka nowych polimerów – pochodnych benzotiadiazolu, pirydyny i ditienosilolu;
- dobór związków do modyfikacji elektrod;
- modyfikacja elektrod – opracowanie warunków otrzymywania warstw polimerowych;
- unieruchamianie receptorów – przeciwciał i enzymów na warstwach polimerowych;
- zaprojektowanie nowych sensorów na E2 z wykorzystaniem wniosków z poprzednich zadań badawczych.

Uzasadniając wybór związków do modyfikacji elektrod autorka pisze o zdolności cząsteczek amfifilowych do samoorganizacji na powierzchni elektrod, która była potwierdzona metodami elektrochemicznymi. Zastanawia mnie, czy autorka prowadziła lub zamierzała prowadzić badania samoorganizacji i uporządkowania badanych warstw metodami spektroskopowymi, takimi jak PM-IRRAS. Wśród opisanych eksperymentów na szczególną uwagę zasługują dokładne badania właściwości elementów składających się na proponowane przez nią sensory. Doktorantka badała aktywności stosowanych przez nią enzymów w funkcji temperatury oraz pH roztworu. Tego rodzaju badania nie zawsze są zamieszczane w pracach elektrochemicznych, dlatego inicjatywa autorki jest cenna. Badała także właściwości elektrochemiczne zarówno E2 jak warstw polimerowych, stosując woltamperometrię cykliczną i woltamperometrię pulsowo – różnicową. Wyniki pozwoliły na optymalny wybór metody elektrochemicznej zastosowanej w projektowaniu sensora. Wybrane monomery polimeryzowane przez autorkę pracy nie są standardowymi związkami stosowanymi do otrzymywania warstw przewodzących, dlatego wyniki stanowią ważną nowość naukową. Odpowiedzi woltamperometryczne w czasie osadzania polimerów oraz dalsze badania elektrochemiczne potwierdzają otrzymanie stabilnych warstw. Ciekawą cechą woltamperogramów monomerów



ditienosilolowych jest występowanie kilku par redoks, co widać na schematach 28 i 29. Nasuwa się pytanie, jakim procesom odpowiadają te pary redoks zdaniem autorki? Czy możliwe jest, że niektóre z tych par odpowiadają oligomerom? Jeśli tak, to czy tworzą się one spontanicznie w roztworze, czy są raczej produktami ubocznymi reakcji elektrodowej. Mam nadzieję, że w czasie obrony będzie możliwa dyskusja na ten temat.

Kontynuując wątek nietypowych woltamperogramów, chciałam zwrócić uwagę na schemat 32, który porównuje odpowiedzi woltamperometryczne elektrody platynowej bez żadnych warstw oraz elektrody platynowej pokrytej warstwą jednego z badanych polimerów. Woltamperogram wyraźnie pokazuje większe wartości prądu w przypadku warstwy polimerowej, co jest pozytywnym wynikiem. Jednak kształt woltamperogramu dla czystej elektrody platynowej jest nietypowy. Pik redukcji ma wyraźnie dwie składowe. Czy w przypadku zmniejszenia zakresu potencjału, na przykład kończąc cyklowanie przy +0.9V zamiast +1.1V, nie zaobserwowalibyśmy woltamperogramu przypominającego ten ze Schematu 10, czyli z pojedynczym pikiem redukcji?

Wśród oryginalnych pomysłów przedstawionych w rozprawie szczególnie interesujące jest zastosowanie roztworu cysteiny do modyfikacji filmu polimerowego w celu wprowadzenia wolnych grup aminowych (strony 82-83). W literaturze cysteina jest zwykle wykorzystywana do modyfikacji powierzchni złota. Eksperyment opisany w rozprawie jest bardzo ciekawym pomysłem. Stanowi kolejną ważną nowość naukową.

Bardzo ciekawy efekt ilustruje Schemat 39. Schemat ten porównuje woltamperogramy polimeru – pochodnej benzotiadiazolu bez i z unieruchomioną peroksydazą chrzanową. Wzrost wartości prądu po unieruchomieniu enzymu autorka zinterpretowała, jako poprawę przepływu elektronów pomiędzy polimerem, a powierzchnią elektrody, co jest słuszne moim zdaniem. Można rozwinąć tę interpretację mając na uwadze, że zakres potencjałów, gdzie obserwowana jest para redoks odpowiada utlenieniu natywnej formy peroksydazy chrzanowej do tak zwanego związku II i reakcji odwrotnej (E. Ferapontova, *Electroanalysis*, 2004, 16, 1101-1109). Wzrost prądu można zinterpretować, jako efekt bezpośredniego przeniesienia elektronu pomiędzy enzymem i polimerem, czyli DET, który zdaniem samej autorki jest bardzo pożądanym w sensorach enzymatycznych. Podobne zjawisko zaobserwowano między innymi dla układu nanorurek polianilinowych i peroksydazy chrzanowej (A. Jabłońska et al., *J. Phys. Chem. C*, 2015, 119, 12514-12522).

Na podstawie lektury części badawczej rozprawy można stwierdzić, że podstawowy cel badań, którym było otrzymanie elektrochemicznego czujnika na estradiol (E2) lub estratriol (E3)



został osiągnięty. Autorka porównuje warstwy pochodnych ditenosilolu, benzotiadiazolu i pirydyny z unieruchomionymi przeciwciałami Anty-E2-Ab, peroksydazą chrzanową, tyrozynazą lub lakazą. Dodatkowo badała sensor złożony z grafenowych kropek kwantowych i tyrozynazy oraz warstwy polianiliny z odciskiem molekularnym (MIP). Jak pokazuje Tabela 6 wszystkie z badanych układów są czułe na estrogeny. Wśród przedstawionych sensorów grafenowe kropki kwantowe z tyrozynazą przedstawiają się najslabiej. Pozostałe układy mają obiecujące parametry analityczne. Sensory te łączą niskie limity detekcji rzędu 10^{-8} - 10^{-6} M z względnie szerokimi zakresami liniowej odpowiedzi (Tabele 14 i 15). Autorka pokazała, że badane układy charakteryzują się bardzo dobrą selektywnością w obecności związków o podobnej strukturze lub podobnych właściwościach redoks (Schematy 49, 54, 59 i 64).

W podsumowaniu chciałam zwrócić uwagę na najważniejsze elementy nowości naukowej przedstawione w rozprawie:

- synteza nowych polimerów półprzewodzących we współpracy z dr inż. Agnieszką Świst i dr inż. Dorotą Zajęc z Katedry Inżynierii i Modelowania Materiałów Zaawansowanych Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej,

- opis właściwości fizykochemicznych nowych polimerów;
- modyfikacja warstwy polimerowej za pomocą cysteiny w celu umożliwienia kowalencyjnego unieruchamiania enzymów lub przeciwciał,
- optymalizacja warunków unieruchamiania enzymów przez dobór odpowiedniej temperatury oraz pH,
- opracowanie kilku sensorów elektrochemicznych na estradiol o bardzo dobrych parametrach analitycznych (patenty i publikacje).

Sensory zaprezentowane w pracy mogą znaleźć w wielu dziedzinach, między innymi w badaniach środowiskowych lub diagnostyce medycznej. Materiał badawczy przedstawiony w rozprawie został w znacznej części opublikowany w czasopismach z listy filadelfijskiej. Pani mgr inż. Kamila Spsychalska jest współautorką 9 artykułów naukowych w tym dwóch przeglądowych, 3 przyznanych patentów oraz 4 zgłoszeń patentowych. Brała udział w licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych. Została nagrodzona za najlepsze wystąpienie ustne oraz za najlepszy poster na dwóch konferencjach międzynarodowych. Otrzymała szereg wyróżnień, w tym nagrodę dziekana i wyróżnienie rektora Politechniki Wrocławskiej. Jej artykuły naukowe są zauważane w środowisku, o czym świadczy znacząca liczba cytowań – powyżej 100 z



współczynnikiem Hirscha równym 4, co jest bardzo dobrym wynikiem na tym etapie kariery naukowej.

Biorąc pod uwagę bardzo dobry poziom naukowy pracy, ważne elementy nowości naukowej oraz dorobek publikacyjny i patentowy doktorantki stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia z nawiązką wymagania odnośnie prac doktorskich, które są określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz. 882 i 1311) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669), dlatego wnoszę o dopuszczenie magister inżynier Kamili Spychalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Zwracam się również z prośbą do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne w Politechnice Wrocławskiej o rozważanie wyróżnienia rozprawy pani mgr inż. Kamili Spychalskiej.

Z poważaniem,

Barbara Pałys