



Warszawa, 28.04.2021 r.

Prof. dr hab. Renata Bilewicz

Recenzja rozprawy doktorskiej

Magister Sylwii Baluty

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Sylwii Baluty p.t. „Wytwarzanie biosensorów warstwowych modyfikowanych strukturami o charakterze półprzewodnikowym” została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem dr hab. Joanny Cabaj, profesor uczelni.

Praca doktorska dotyczy wykorzystania enzymów jako elementów rozpoznania substancji o znaczeniu biologicznym oraz przygotowania platform sensorowych do szybkich oznaczeń związków decydujących o zdrowiu człowieka. Jest to tematyka aktualna i ważna w czasach intensywnego rozwoju metod diagnozowania chorób, zarówno w miejscach opieki nad pacjentem, jak i w domu. Grupą analitów będących przedmiotem badań w pracy doktorskiej są neuroprzebieżniki, substancje odpowiedzialne za podstawowe mechanizmy przekazywania sygnałów między komórkami. Zaburzenia ich poziomu w organizmie prowadzą do wielu schorzeń neurodegeneracyjnych. Wartościowych układów do kompleksowej analizy w tej dziedzinie oczekuje diagnostyka kliniczna i jest to ciągle poważne wyzwanie dla chemików analityków i konstruktorów urządzeń analitycznych. Zadania postawione doktorantce są więc ambitne i wymagały od niej poważnego zaangażowania w prace badawcze i konstrukcyjne.

W części wstępnej rozprawy, mgr Sylwia Baluta wprowadza czytelnika w tematykę badawczą pracy oraz jej etapy, prowadzące do otrzymania układu biosensorowego: modyfikację związkami półprzewodnikowymi podłoża, w celu związania mechanicznego i elektrycznego enzymów, unieruchomienie białek z grupy oksydoreduktaz, ocenę ich aktywności po osadzeniu na elektrodzie, a następnie testowanie przydatności sensora do oznaczania wybranych neuroprzebieżników w próbkach syntetycznych i płynach biologicznych.

Wprowadzenie literaturowe (34 strony) obejmuje przegląd podłoży wykorzystywanych w biosensorach i metod unieruchamiania biokatalizatorów, a także rodzajów detekcji w czujnikach enzymatycznych. Autorka tłumaczy parametry biosensorów, pojęcia takie jak ich selektywność, stabilność, czułość, liniowość, czas odpowiedzi, trwałość. Rezygnuje z definiowania powtarzalności



sensora i pojęcia jego „ekonomiczności”, choć może i te wyjaśnienia by się przydały. Autorka charakteryzuje także grupę neuroprzekazników, ich funkcje oraz właściwości red-oks.

W rozdziale 3 mgr Baluta podaje używane odczynniki i materiały oraz procedury przygotowania warstw sensorowych, a także stosowane techniki badawcze. Swoje badania przedstawia na 70 stronach, w 5 podrozdziałach, a na końcu pracy zamieszcza obszerny rozdział „Wnioski”, podzielony na 3 części („Charakterystyka warstw receptorowych”; „Charakterystyka biosensorów” i „Porównanie układów biosensorowych”) oraz Podsumowanie. Przedyskutowała w nich wartość i znaczenie otrzymanych wyników. Bogata „Bibliografia” obejmuje 385 publikacji naukowych. Autorka ma w dorobku 11 oryginalnych publikacji naukowych z listy filadelfijskiej i w 7 jest pierwszym autorem. Jest także współautorką 5 publikacji bez IF oraz jednej pracy monograficznej. Odkrycia i konstrukcje doktorantki były przedmiotem 5 patentów i 6 zgłoszeń patentowych. Jest to niewątpliwie znaczny dorobek naukowy.

W rozdziale „Przegląd Literatury” Autorka opisuje cele konstrukcji biosensorów, typowe podłoża i enzymy oraz sposoby wiązania materiału biologicznego z podłożem przewodzącym. Omawia rodzaje detekcji w biosensorach, koncentrując się na czujnikach elektrochemicznych i optycznych, a w rozdziale 2.1.1.5 zastanawia się nad przyszłością biosensorów w kontekście spersonalizowanej opieki zdrowotnej czy szybkich testów w punktach opieki i poza laboratorium diagnostycznym. Zwraca uwagę na rolę neuroprzekazników w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu ludzkiego i opisuje funkcje poszczególnych przedstawicieli tej grupy związków. Część literaturowa jest przedstawiona wyczerpująco i poparta licznymi odnośnikami literaturowymi.

W opisie materiałów podano oryginalne półprzewodniki: organiczne, zsyntezowane w zespole profesor Jadwigi Sołoducho oraz nanocząstki grafenowe wykonane i scharakteryzowane w zespole prof. Artura Podhorodeckiego. W opisie pochodzenia enzymów nie wskazano rodzaju peroksydazy chrzanowej użytej w badaniach, ani procedur oczyszczania zakupionych białek. Opis wykorzystywanych w pracy materiałów i metody modyfikacji elektrod jest szczegółowy i gdzie można zilustrowany schematami – pozwala to zrozumieć wszystkie procedury użyte w pracy oraz układy do badań optycznych i elektrochemicznych. Pomocne są schematy układów mikroprzepływowych. Liczba układów sensorowych użytych do detekcji wybranych neuroprzekazników jest imponująca, siedem układów „najlepszych” pod względem parametrów pracy wybrano do opisu w części „Wyniki i dyskusja”. Ten wybór nie jest dla mnie całkowicie jasny, ponieważ patrząc na publikacje, inne układy z tabeli 6 mogłyby być równie lub nawet, pod pewnymi względami, bardziej nowatorskie. Lepiej było może dla przejrzystości pracy ograniczyć się więc w opisie procedur tylko do tych materiałów, które zostały ujęte potem w części wynikowej pracy.



W rozdziale 4.1 Autorka przedstawiła optymalne warunki pracy stosowanych enzymów–oksydoreduktaz. Podano zakresy pH oraz temperatur odpowiadające ich najwyższej aktywności. Dziwi mnie trochę, że pomiarów aktywności enzymów nie planowano prowadzić w obszarze temperatur optymalnym dla danego białka, co umożliwiałoby porównanie z innymi pracami i enzymami nieunieruchomionymi na stałym podłożu. Takie porównania są zawsze bardzo interesujące i wartościowe w pracy.

W rozdziale 4.2 Autorka opisała związki stosowane do przygotowania elektrod warstwowych, ze szczególną uwagą traktując ciekawą grupę pochodnych krzemoorganicznych z fragmentami tiofenowymi. Monomery poddawano elektropolimeryzacji na podłożach ze złota lub platyny. Rosnące prądy pików w kolejnych cyklach chronowoltamperometrii cyklicznej dowodzą postępu reakcji, ale nie podano w jaki sposób określano „ilościową polimeryzację monomerów na elektrodach”. Nie podano też jakim reakcjom przypisuje się obecne na woltamogramach piki utleniania i dlaczego obraz jest odmienny dla polimeru 14 i 15. Przyczyna zastąpienia siarki selenem w związku 15 także nie została wyjaśniona. Czy to poprawiło właściwości warstwy?

Obrazy SEM i TEM uwidaczniają topografię warstw i porowatość powierzchni, sprzyjającą dalszej modyfikacji enzymami. Nie do końca rozumiem, dlaczego do unieruchamiania lakazy użyto układu z polimerem 14, a do peroksydazy chrzanowej polimeru 15, zamiast stosować ten sam enzym dla porównania dwu polimerów, lub dwu polimerów dla porównania efektywności jednego enzymu. Sposób przygotowania obu warstw bioreceptorowych budzi uznanie, gdyż zapewnia przewodnictwo warstw, z jednoczesną swobodę orientacji cząsteczek enzymu, a usieciowanie aldehydem glutarowym stabilizuje enzymy na elektrodzie.

W rozdziale 4.2.2 do tworzenia warstwy polimerowej wykorzystano monomery zawierające także tiofen, ale dodatkowo, grupę aromatyczną - pierścień pirydynowy nadający monomerowi lepsze właściwości elektronoakceptorowe. Proces elektropolimeryzacji prowadzono w tym przypadku przy mniej dodatnich potencjałach (do 1.4V) ale uzyskana warstwa wykazywała znaczną trwałość i ten polimer wykorzystano do tworzenia warstw sensorowych do oznaczania adrenaliny, z lakazą lub tyrozynazą jako biokatalizatorami.

Zupełnie innym materiałem półprzewodnikowym były grafenowe kropki kwantowe, którymi Autorka pokrywała elektrodę z węgla szklanego. Stabilność pokrycia lakazą takiego podłoża osiągnęto także przez sieciowanie enzymu aldehydem glutarowym. Widać, że ta metoda „poprawiania” właściwości elektrod z fizycznie adsorbowanymi enzymami, sprawdza się dla różnych podłoży elektrodowych i jest dobrą alternatywą dla nafionu, powszechnie używanego do stabilizowania warstw



z enzymami na elektrodach. Autorka uzyskała potwierdzenie przez konkretne pasma na widmach IR, że lakaza łączyła się przede wszystkim z kropkami kwantowymi obecnymi na elektrodzie.

W rozdziale 4.4 mgr Baluta opisała zastosowanie przygotowanych układów biosensorowych do oznaczania neuroprzekazników. W przedstawionym mechanizmie utleniania serotoniny w obecności lakazy produkt 8 nie jest pochodną chinonową tylko ketonową (brakuje drugiego tlenu). Dalsze reakcje chemiczne tego produktu z udziałem wody istotnie prowadzą do utworzenia pochodnej hydrochinonowej, która utlenia się dalej do pochodnej chinonowej, ale na schemacie 43 tego nie pokazano. Bezpośrednie przeniesienie elektronu między elektrodą pokrytą lakazą i serotoniną prowadzi do wykształcenia się fali utleniania serotoniny o wysokości rosnącej wraz ze stężeniem analitu. Nie zinterpretowano jednak sygnału redukcji przy potencjale $-0.1V$ – odpowiada on właśnie redukcji chinonowej formy utworzonej w wyniku ostatecznej reakcji katalitycznej. Autorka wykorzystowała liniową zależność pomiędzy stężeniem neurotransmitera i natężeniem prądu utleniania jako metodę oznaczania serotoniny, uzyskując lepszą granicę detekcji i szybszy proces utleniania niż na elektrodach węglowych pokrytych nanowłóknami węglowymi, a w dodatku dobrą czułość zaprojektowanego biosensora.

Do oznaczania dopaminy Autorka wykorzystowała peroksydazę chrzanową, a nie lakazę dla której też mogłaby być substratem. Uzyskała znaczące podwyższenie prądu utleniania w porównaniu z utlenianiem dopaminy na niepokrytej elektrodzie złotej i dogodne warunki analizy, szczególnie przy zastosowaniu różnicowej pulsowej woltometrii. Sensor miał wyraźną przewagę nad innymi opisanymi w literaturze, co pokazano w tabeli 8. Nie przeszkadzały typowe interferenty w oznaczaniu dopaminy: kwas askorbinowy i moczowy. Wydaje się jednak, że różnica w stężeniach dopaminy i askorbinianów w prawdziwych płynach ustrojowych jest wyższa, niż w pokazanych oznaczeniach w roztworach syntetycznych.

Do lakazy, mgr Baluta powróciła, opracowując nową metodę oznaczania adrenaliny przy użyciu elektrod dekorowanych grafenowymi kropkami kwantowymi. Niestety, nie widać na krzywej dla samej elektrody pokrytej lakazą, bezmediatorowego procesu przeniesienia elektronu pomiędzy lakazą a elektrodą. Zastosowanie równania Randlesa – Ševčika do wyznaczenia współczynnika dyfuzji w procesie elektrodowym bardzo odbiegającym od odwracalności (schemat 56) i w dodatku uznanym za elektrokatalityczny budzi mój sprzeciw. Natomiast analityczne wykorzystanie sensora opisano bardzo profesjonalnie i wydaje się ono obiecujące jako element urządzeń diagnostycznych.

Inną ciekawą propozycją w pracy są biosensory optyczne, również wykorzystujące matryce tetrafenylosilanowe, co Autorka przedstawiła na przykładzie oznaczania dopaminy. Fluorescencyjnym



markerem do wykrywania analitu były opisane wcześniej grafenowe kropki kwantowe, dla których obserwowano wygaszanie fluorescencji w wyniku adsorpcji spolimeryzowanych produktów utleniania dopaminy. To jest oryginalne podejście, a pokrycie nanokropek polimerem dopachinonowym stwierdzano nie tylko poprzez wygaszanie fluorescencji, ale także metodą AFM, gdyż powierzchnia kropek ulegała po pokryciu powiększeniu. Przejrzyscie opisano przepływowy model czujnika optycznego, stosowane bioelektrody i metody wyznaczania stężenia analitu z wykorzystaniem równania Sterna – Volmera. Problem może tu wiązać się z oznaczaniem większych stężeń analitu i widać to na Schemacie 69, chociaż tego w pracy Autorka nie dyskutowała. Określiła optymalne warunki oznaczenia i dolną granicę detekcji oraz selektywność.

Zasada działania innego, zaprojektowanego w pracy, optycznego biosensorowego układu do oznaczania adrenaliny polegała na wykorzystaniu tworzenia się barwnego kompleksu z jonami żelaza. Diodę LED używano do naświetlenia kompleksu i wywołania fluorescencji. Intensywność fluorescencji jest dla układów enzymatycznych zwykle niższa i sensor oparty na samym barwniku z żelazem wydaje się bardziej korzystny – ma lepsze granice detekcji. Czujniki enzymatyczne zapewniają jednak według Autorki lepszą selektywność. Autorka wykazała ich przydatność na wielu przykładach, porównując też proponowane w pracy układy z innymi biosensorymi dostępnymi w literaturze. Podkreślając zalety nie uchylała się od uwag krytycznych, co należy specjalnie podkreślić.

Moje drobne uwagi krytyczne dotyczą głównie błędów językowych, czy w nazewnictwie: Nazwiska Randlesa – Ševčika zapisane są z trzema błędami w wielu miejscach pracy, a w opisie równania 2 nie podano w jakich jednostkach otrzymuje się prąd pikowy (i ogólnie nie musi to być prąd redukcji więc „c” nie jest w zapisie konieczne).

Trochę jest w pracy zdań niezbyt udanych z punktu widzenia języka polskiego np. na stronie 88: „...prąd generowany jest przez transfer pomiędzy analitem a powierzchnią elektrody...”

lub „transfer elektronów między cząsteczką docelową, a kolektorem prądu”.

Potencjał utleniania półfalowego to prawdopodobnie potencjał półfali utleniania (str.96).

„Wyznaczono parametr współczynnika dyfuzji” to po prostu chyba wyznaczenie wartości współczynnika dyfuzji.

„CV-skany” to też raczej slang i lepiej pisać „woltamogramy” lub „woltamperogramy cykliczne”

Podsumowując, mgr. Sylwia Baluta dokonała rzetelnego przeglądu różnych materiałów półprzewodzących (8 typów) i metodą elektrochemiczną polimeryzowała je na podłożach elektrodowych. Wiążąc z nimi odpowiednie enzymy przygotowała szereg biosensorów



elektrochemicznych i optycznych, rozszerzając możliwości detekcji ważnej medycznie grupy związków. Wykonała bardzo obszerną pracę eksperymentalną, stanowiącą wartościowy wkład w dziedzinie projektowania materiałów sensorowych i platform analitycznych zawierających oksydoreduktazy jako biokatalizatory. W oparciu o przeprowadzoną analizę rozprawy stwierdzam, że spełnia ona wszystkie wymagania stawiane przez Ustawę o Tytule i Stopniach Naukowych z dnia 14 marca 2003r. (Dz U. z 2003, Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodach doktorskich z dnia 26 września 2016r., a także zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pani mgr Sylwii Baluty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Renata Bilewicz