



Wydział Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego
Prof. dr hab. Renata Bilewicz

18 -10-2016, Warszawa.

Recenzja rozprawy doktorskiej
Magister Kamili Doroty Maleckiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Kamili Doroty Maleckiej p.t. „Opracowanie i charakterystyka elektrochemicznych genoczuJNIKÓW przeznaczonych do wykrywania wirusa ptasiej grypy typu H5N1” została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Radeckiego w Zakładzie Biosensorów Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie i przedstawiona Radzie Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku.

Czujniki chemiczne odgrywają coraz większą rolę w analizie medycznej oraz ochronie środowiska, zastępując bardziej skomplikowane metody takie jak PCR czy ELISA, szczególnie wtedy, gdy można tą metodą uniknąć wstępnego czasochłonnego przygotowania próbek, lub gdy analizy trzeba wykonywać poza laboratorium. Celem pracy doktorskiej mgr Kamili Doroty Maleckiej było opracowanie genoczuJNIKA elektrochemicznego do wykrywania sekwencji DNA i RNA specyficznych dla wirusa ptasiej grypy typu H5N1. Czujniki działające na zasadzie kanału jonowego lub warstwy elektroaktywnej są od wielu lat przedmiotem zainteresowania w zespole prof. Radeckiego, jednakże wykrywanie tymi metodami materiału genetycznego wirusa jest nowością w literaturze poświęconej identyfikacji wirusa i jest tym bardziej godne uwagi, że nie wymaga złożonych modyfikacji czy znakowania sond DNA.

Praca składa się ze streszczenia, wykazu symboli, wstępu, po którym sformułowano cel pracy. W części literaturowej (65 stron) , Autorka omówiła bioczuJNIKI oparte o kwasy nukleinowe i metody osadzania tych kwasów na podłożach elektrodowych. Następnie podała typowe metody oznaczania wirusów ptasiej grypy. W rozdziale 3 przedstawiła dwa typy bioczuJNIKÓW elektrochemicznych działające na zasadzie kanału jonowego lub

w oparciu o warstwy elektrochemicznie aktywne. W rozdziale 4 Autorka omówiła swój układ pomiarowy i metody elektrochemiczne stosowane w pracy. Na 17 stronach podała odczynniki, aparaturę i opisała sposoby przygotowania genoczuJNIKÓW, a następnie na 39 stronach Autorka przedstawiła wyniki swoich badań. Podsumowanie i wnioski kończą pracę, po czym podano spisy rysunków, tabel, wykaz publikacji i wystąPIEŃ konferencyjnych oraz bibliografię zawierającą 320 odnośników.

W części literaturowej, zwraca uwagę starannie przeprowadzona klasyfikacja bioczuJNIKÓW ze względu na sposób detekcji i czynnik rozpoznający oraz na zasadę działania przetwornika. Szczególną uwagę słusznie Autorka poświęca metodom osadzania kwasów nukleinowych na podłożach, gdyż wybór metody ma kluczowe znaczenie dla czułości i selektywności genoczuJNIKA. Opisowi sposobów osadzania towarzyszą przejrzyste i staranne schematy, a przegląd literatury jest wyczerpujący, sięga początków tej dziedziny i kończy się na najnowszych pracach. Może tylko brakuje opartych na trochę innej zasadzie metod opisanych w pracach Kevina Plaxco i nowszych Eleny Ferapontovej.

Pomocna w analizie różnych sposobów unieruchamiania kwasów nukleinowych jest tabela 1 oraz tabela 2, w której zebrano metody detekcji w bioczuJNIKACH elektrochemicznych. Interesująco, przynajmniej dla mnie, osoby dalekiej od badań wirusów, opisała Doktorantka cechy wirusów ptasiej grypy i metody ich wykrywania – z podziałem na etiologiczne, serologiczne i molekularne. Mnogość skrótów trochę utrudnia odbiór tej części – szczęście, że jest tablica z większością skrótów na początku pracy.

W rozdziale 3 Doktorantka skupiła się na czujnikach elektrochemicznych stosowanych w pracy doktorskiej. Należą do nich, wprowadzone przez Umezawę, czujniki typu kanału jonowego gdzie detekcja oparta jest o konkurencję pomiędzy analitem i elektroaktywnym znacznikiem o dostęp do elektrody przez kanał. Autorka dzieli je na wewnątrz- i międzycząsteczkowe – pewnie nie zawsze daje się to rozróżnić. W przypadku genoczuJNIKA będzie to zwykle odpychające oddziaływanie elektrostatyczne silniejsze w przypadku, gdy nastąpiła hybrydyzacja i zwiększył się ładunek ujemny na elektrodzie.

W rozdziale na temat czujników opartych o warstwy redoks – aktywne nie ma nic o genoczuJNIKACH. Nie wyjaśniono czym się różni I oraz I_p , ani co oznacza e do potęgi Γ , a

samo Γ to nie jest stopień pokrycia elektrody tylko stężenie powierzchniowe lub nadmiar powierzchniowy. Stopień pokrycia to stosunek Γ/Γ_0 gdzie Γ_0 to maksymalne stężenie powierzchniowe i często stosunek ten wyraża się w %.

W części poświęconej opisowi stosowanych metod elektrochemicznych warto było omówić nie tylko prosty proces dyfuzyjny, ale przede wszystkim proces i równania dla procesów z roztworu ale przebiegających na częściowo i całkowicie zablokowanych elektrodach, bo tego dotyczy praca. W przypadku czujników opartych o warstwy elektro-aktywne wielkość sygnału redukcji lub utleniania związku unieruchomionego na elektrodzie jest sygnałem analitycznym. W równaniu 2 nie wyjaśniono czym się różni I od I_p , co oznacza e do potęgi Γ , a Γ jest stężeniem powierzchniowym lub nadmiarem powierzchniowym, ale nie stopniem pokrycia, jak napisała Doktorantka. Stopień pokrycia to stosunek Γ/Γ_{max} gdzie Γ_{max} to maksymalne stężenie substancji elektroaktywnej na powierzchni elektrody. Często podaje się ten stosunek w %. Szkoda, że Autorka nie podała w tym miejscu, jak rozumie w tym przypadku pojęcie genocujnika opartego o warstwy elektroaktywne- tzn. na jakiej zasadzie wykrywana może być hybrydyzacja. Równanie 3 jest błędne (albo n^2F^2 albo nF , ale nie ma między nimi równości)

Opis w następnym rozdziale dotyczy technik pomiarowych stosowanych w pracy: woltamperometrii cyklicznej z opisem procesu odwracalnego kontrolowanego dyfuzją oraz woltamperometrii fali prostokątnej. Pojęcie prądu dodatniego i ujemnego na rysunku 21 nie jest zbyt udane – ale rzeczywiście trudno przetłumaczyć słowa forward, backward i net current jak nazwali to Osteryoungowie. Trzecią metodą elektrochemiczną stosowaną w pracy jest spektroskopia impedancyjna, która posłużyła potem Autorce do śledzenia zmian pojemnościowych układu i oporu przeniesienia ładunku.

Część eksperymentalna zaczyna się opisem odczynników, materiału biologicznego i stosowanej aparatury. Nie wyjaśniono dlaczego procedury elektrod złotych obu typów różnią się o etap przemieszczania potencjału w 0.5M roztworze KOH. Procedury modyfikacji i pomiarowe opisano bardzo szczegółowo i gdyby nie bardzo duża liczba skrótów (czasem zupełnie niepotrzebnych, ale wyjaśnionych w tabeli skrótów) opis przygotowania elektrod uznać należy za klarowny. W takim przypadku odpowiednie schematy są znacznie bardziej przydatne, niż szczegółowe opisy. Na stronie 78 Autorka

podaje, że odpowiedzi prądowe czujnika wyrażone są jako $(I_n - I_0)/I_0$ gdzie I_n jest wartością w obecności analitu. Jeżeli I_n oznacza prąd pikowy żelazocyjanków to I_n powinno być mniejsze niż I_0 , jeżeli w ogóle można spodziewać się różnicy przy dość gęsto rozmieszczonych kanałach. Przy tej okazji warto zaznaczyć, że nie omówiono teorii AST w części poświęconej metodzie chronowoltamperometrii, a dyfuzja do częściowo pokrytej elektrody jest podstawą wyciągania wniosków w pomiarach prądowych. Ograniczono się tylko do woltamperometrii w przypadku odwracalnego procesu i liniowej dyfuzji do dużej niepokrytej elektrody i to nie jest wystarczające mając na uwadze treść części z opisem badań. Może to nie teoria transportu przez kanały, a teoria blokowania i wzrostu oporu przeniesienia elektronu byłaby tu bardziej przydatna. Zgodnie z oczekiwaniem (prace Rubinsteina) zmiany odwracalności można było zauważyć z rozsunięcia pików woltametrycznych (ale nie wiem dlaczego ta zależność od logarytmu ze stężenia analitu miałaby być liniowa – Rys. 27 (jak wygląda równanie, na podstawie którego można się tego spodziewać?). Prądy pikowe zmieniać się powinny niewiele zgodnie z przewidywaniem ze pola dyfuzyjnego od procesów na sąsiednich kanałach nakładają się, a transport żelazocyjanków nadal następuje na drodze dyfuzji liniowej. Warto to przedyskutować na obronie w świetle prac Rubinsteina i Savéanta (AST). Jeżeli mechanizm jest zgodny z teorią kanałów w warstwie (lub defektów) to liniowych zmian prądu od stężenia możemy się spodziewać tylko bo osiągnięciu warunków sferycznej dyfuzji – czyli wtedy gdy krzywa woltamperometryczna ma kształt fali i odległości kanałów od siebie są kilkaset razy większe od rozmiaru kanału. Zmiana prądu wynika więc z innego powodu: ze wzrostu oporności warstwy i to potwierdzają wyniki uzyskane metodą EIS. Ciekawe byłoby porównanie wyników z uzyskanymi dla dodatnio naładowanego próbnika: $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. Wspomina się ten jon w pracy w Tabeli 4 ale wyników z jego użyciem nie znalazłam. Te same uwagi dotyczą blokowania analitem w przypadku zastosowania metody OSWV. Autorka powinna była dokładnie opisać w części literaturowej na podstawie jakiej pracy teoretycznej spodziewa się liniowej zmiany net current (prądu wypadkowego) od log ze stężenia. Moim zdaniem spadek wynika tylko z odchylenia od procesu odwracalnego a więc trudno się spodziewać liniowej zmiany od stężenia analitu (rys. 33). Jeżeli Autorka podkreśla taką liniowość to należy poprzeć się odpowiednimi równaniami. W szczególności dziwić może liniowość przesunięcia $E_n - E_0/E_0$ od C_{analitu} .

Na osi y pokazano, że procentowe wartości są ujemne? En jest przecież dodatnie, a Eo mniej dodatnie to En-Eo jest dodatnie i podzielone przez Eo jest nadal dodatnie to skąd wartość ujemna i w dodatku ujemny procent. (rysunek 35) Chyba, że czegoś tu nie zrozumiałam. Blokowanie elektrody analitem powinno zwiększać opór przeniesienia elektronu pomiędzy próbnikiem a elektrodą i zmiany oporności powinny być lepszym miernikiem stężenia analitu. W konsekwencji, korzystne będzie zastosowanie metody impedancyjnej do wykrywania specyficznych sekwencji DNA wirusa ptasiej grypy, niż interpretacja zmian prądu czy potencjału piku woltamperometrycznego. I rzeczywiście, taki genoczuJNIK opisano w rozdziale 10.3 - R, zmienia się liniowo ze stężeniem analitu w badanym zakresie stężeń a granice wykrywalności są imponujące.

W rozdziale 11 opisano inne podejście – przez znakowanie warstwy kompleksem fenantrolinowym żelaza (III). Schemat na rysunku 50 klarownie pokazuje sposób konstruowania warstwy elektroaktywnej na elektrodzie. Dość duży kompleks wybrany jako marker warstwy powoduje, że sygnały odpowiadające redukcji /utleniania kompleksu są małe i słabo wykształcone na tle dużego prądu pojemnościowego elektrody. Dłuższy „rozcieńczalnik” centrów elektroaktywnych mógłby lepiej wyblokować nieelektroaktywną część elektrody i obniżając prądy pojemnościowe lepiej pokazać, małą w końcu, populację grup elektroaktywnych. Takie podejście stosował np. Rubinstein w słynnej pracy z utlenianiem kwasu askorbinowego. Autorce udało się jednak uchwycić liniowość zależności prądu piku od szybkości zmiany potencjału, potwierdzając unieruchomienie cząsteczek kompleksu na elektrodzie. Oczywiście po przyłączeniu do warstwy sondy piki redoks kompleksu są jeszcze słabiej widoczne. Wprowadzenie kompleksu fenantrolinowego żelaza w tym układzie nie dało więc, dobrego bezpośredniego sygnału analitycznego, chociaż takie próby w przypadku błękitu metylenowego i innych grup elektroaktywnych były udane i są stosowane przez inne zespoły np. Ferapontowej.

Obecność sondy prowadzi jednak do wzrostu oporu przeniesienia ładunku przez warstwę, co pokazują odchylenia od odwracalności procesów elektrodowych układu $[Fe(CN)_6]^{3-} / [Fe(CN)_6]^{4-}$. Dziwi tylko znowu, że wzrost nieodwracalności procesu prowadzi do liniowej zależności spadku prądu piku od wzrastającego stężenia analitu. Rozumiem, że zakotwiczony kompleks fenantrolinowy żelaza nie odgrywa tu żadnej roli, a jest tylko łącznikiem do wiązania sondy.

Doktorantka skonstruowała kilka genoczuJNIKÓW różniących się podłożem elektrodowym, budową warstwy sensorowej i sposobem wykrywania sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy. H5N1. Zauważyła, że odpowiedzi czujników były selektywne – niekomplementarne sekwencje dawały dużo słabsze odpowiedzi. Z wnikliwych badań Autorki wynika, że najbardziej obiecujące są jednak czujniki działające na zasadzie pomiaru oporu przeniesienia elektronu metodą spektroskopii impedancyjnej z wykorzystaniem układu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ jako próbnika oporności warstwy.

Dwie drobne uwagi:

1. Nie podoba mi się sformułowanie: rozstaw pików (str. 119)
2. Cyklowoltamogramy – lepiej może pozostać przy woltamperogramach cyklicznych.

Podsumowując pracę doktorską pani mgr Kamili Doroty Maleckiej uważam, że jest to wartościowy wkład w dziedzinie konstrukcji nowych typów genoczuJNIKÓW. Autorka jest teraz wytrawnym syntetykiem i konstruktorem układów supramolekularnych na elektrodach. Praca doktorska jest porządnie przygotowana, błędów edytorskich jest bardzo mało i czyta się ją z zainteresowaniem. Pani mgr Kamila Dorota Malecka jest współautorką 7 publikacji w bardzo dobrych czasopismach naukowych, w tym 5 dotyczy tematyki doktoratu. Jest też współautorką zgłoszenia patentowego na temat sposobu wytwarzania warstwy elektroaktywnej na powierzchni elektrody złotej.

W oparciu o przeprowadzoną analizę rozprawy stwierdzam, że praca mgr Kamili Doroty Maleckiej spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Renata Bilewicz