



Prof. dr hab. Paweł J. Kulesza  
Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego  
Pracownia Elektroanalizy Chemicznej  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
Tel: (22) 8220211 wew. 289  
Fax: (22) 8225996  
E-mail: pkulesza@chem.uw.edu.pl

24 kwietnia 2012 roku

## RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ PANI MGR AGATY KOWALCZYK

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Agaty Kowalczyk zatytułowana „Udoskonalenie warstwy modyfikującej elektrodę i detekcji procesu hybrydyzacji w biosensorach DNA” została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Zbigniewa Stojka w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrod Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Tematyka pracy obejmuje opis przygotowania i charakterystykę fizykochemiczną, a także optymalizację działania biosensorów opartych na hybrydyzacji DNA oraz dyskusję ich przydatności w obecności wybranych układów interferujących – toksykantów, substancji utleniających, wolnych rodników hydroksylowych, czy przeciwutleniaczy. Przedmiotem zainteresowań Autorki są konstrukcyjne aspekty działania biosensorów hybrydyzacji DNA obejmujące obok bardzo istotnych obserwacji preparatywnych (np. dyskusji wyboru odpowiedniej metody unieruchamiania nici DNA w warstwie sensorowej czy próbnika redoks), aspekty pomiarowe (dobór optymalnej techniki elektrochemicznej), wykorzystanie nanocząstek złota czy warstw pośredniczących w efektywnym przeniesieniu ładunku. Mając na względzie takie parametry jak czułość, selektywność i wykrywalność, Autorka zwróciła także uwagę na konieczność przygotowania warstw o odpowiednich grubościach, porowatości i stabilności. Podjęta w pracy problematyka jest z pewnością zgodna ze współczesnymi trendami w chemii analitycznej i bioelektrochemii, a w szczególności w badaniach nad konstrukcją biosensorów DNA. Należy podkreślić, że w ostatnich latach zainteresowanie elektrochemicznymi sensorami tego typu jest znaczne, zwłaszcza w kontekście ochrony środowiska, oznaczania patogenów, analityce medycznej oraz analizie żywności. Za cenne uważam też podjęcie próby porównania przydatności różnych materiałów elektrodowych oraz optymalizacji działania biosensorów DNA zaproponowanych do detekcji bakterii *Listeria Monocytogenes* i bakterii mlekowych ze szczepu *Lactococcus lactis*. Uzyskane wyniki są również bardzo ważne dla rozwoju metod bioanalitycznych.

Praca doktorska Pani Agaty Kowalczyk składa się z następujących rozdziałów: *Wstępu i Celu pracy*, poprzedzonych *Spisem treści* i *Alfabetycznym spisem skrótów i symboli*

*stosowanych w pracy; Części literaturowej* obejmującej między opis budowy i definicję biosensora, szeroką dyskusję biosensorów hybrydyzacji DNA z uwzględnieniem sposobów tworzenia i charakterystyki warstwy sensorowej, metod wizualizacji i czynników wpływających na proces hybrydyzacji DNA oraz opisu metod jej detekcji, w tym podejść elektrochemicznych, spektroskopowych i grawimetrycznych, a także działania toksykantów na strukturę DNA, zastosowań i opisu technik pomiarowych stosowanych w pracy; *Części eksperymentalnej* opisującej odczynniki stosowane podczas realizacji badań, procedury pomiarowe oraz takie zagadnienia jak wykorzystanie samoorganizujących się tioli do tworzenia warstw sensorowych, sposoby udoskonalenia tych warstw, a także dyskusję wpływu takich czynników jak błędne dopasowania zasad azotowych w podwójnej helisie DNA, obecności wybranych pestycydów, chromu na różnych stopniach utlenienia oraz wolnych rodników na prace biosensora DNA. Autorka dokonuje również zestawienia parametrów charakteryzujących konstruowane biosensory DNA, załącza streszczenia w języku polskim i angielskim, *Spis prac naukowych wykonanych w trakcie studiów doktoranckich* oraz *Bibliografię*. Praca obejmuje 251 stron, w tym szereg rysunków, schematów i tabel oraz 364 odnośniki literaturowe.

Po krótkim wprowadzeniu, Pani Agata Kowalczyk poprawnie definiuje obiekt i cele pracy oraz opisuje znaczenie naukowe i praktyczne podjętego tematu. Następnie Autorka dość starannie i przejrzyście wprowadza czytelnika w problematykę badań związanych z przygotowaniem, optymalizacją działania i zastosowaniami analitycznymi biosensorów hybrydyzacji DNA. W odczuciu recenzenta, ta literaturowa część pracy uwzględnia najważniejsze zagadnienia i najnowsze osiągnięcia w wyżej wymienionych dziedzinach. Dalej Pani Kowalczyk dokonuje opisu warunków eksperymentalnych (sposobu przygotowania substratów elektrodowych, elektrochemicznej detekcji procesu hybrydyzacji, w tym z użyciem próbników redoks oddziaływujących i nieoddziaływujących z DNA, wykorzystaniem nanocząstek złota, także w kontekście opracowania biosensora hybrydyzacji DNA znakowanego enzymem i mediatorem, a potem przechodzi do przedstawienia uzyskanych przez siebie wyników oraz do ich dyskusji. Tutaj można rozróżnić kilka nurtów tematycznych obejmujących zarówno konstrukcyjne aspekty biosensorów, jak i badania wpływu wybranych herbicydów, insektycydów oraz związków chromu na różnych stopniach utlenienia na działanie tych biosensorów. Zaproponowane materiały, warstwy, nanostruktury były poparte charakterystyką fizykochemiczną, w tym spektroskopową, mikroskopową i elektrochemiczną, w tym pomiarami impedancyjnymi.

Przedmiotem zainteresowań Autorki było przede wszystkim modyfikowanie i doskonalenie biosensorów opartych na procesie hybrydyzacji DNA. W swojej pracy Pani Agata Kowalczyk zwraca uwagę na potrzebę optymalizacji przygotowywania warstw pod kątem stabilności, bardzo dobrej powtarzalności działania i prostoty przygotowania. Ponadto Autorka ustosunkowuje się do konieczności kontroli gęstości upakowania nici DNA w warstwie sensorowej oraz podkreśla, iż warstwa zbyt gęsto upakowana utrudnia hybrydyzację DNA. W ramach dyskusji wyników Pani Kowalczyk wskazuje na takie istotne parametry badanych układów jak stabilność, powtarzalność, wykrywalność i odtwarzalność sygnału. W odczuciu recenzenta, niektóre zaproponowane przez Panią mgr Kowalczyk podejścia badawcze (przykładowo dotyczące przygotowywania warstw łączących w postaci koloidalnego złota) mają charakter modelowy oraz bardziej ogólny i wydaje się, że w przyszłości będą mogły być z powodzeniem wykorzystane do konstrukcji sensorów elektrochemicznych różnego rodzaju. W części końcowej pracy, Autorka zamieszcza ponad trzysta odnośników literaturowych, które - w odczuciu recenzenta - poprawnie cytuje w tekście rozprawy.

Przechodząc do merytorycznej oceny pracy, należy stwierdzić, że istotnym osiągnięciem pracy jest opracowanie nowych rozwiązań konstrukcyjnych pozwalających na uzyskanie udoskonalonych biosensorów opartych na procesie hybrydyzacji DNA do detekcji bakterii *Listeria Monocytogenes* i bakterii mlekowych ze szczepu *Lactococcus lactis* z wykorzystaniem elektrochemicznych i grawimetrycznych przetworników sygnału. Na wybranych przykładach układów, Pani Agnieszka Kowalczyk wykonuje systematyczne badania zmierzające do optymalizacji zaproponowanych biosensorów. Dość ciekawą i oryginalną koncepcją badań było zastosowanie warstw sensorowych różniących się pod względem jakości i gęstości upakowania fragmentów nici DNA o ściśle określonych sekwencjach zasad azotowych. Obok prac preparatywnych i analitycznych Autorka dokonała charakterystyki fizykochemicznej warstw stosując między innymi różne techniki pomiarowe, takie jak woltamperometria fali prostokątnej, elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna, mikroskopia sił atomowych (AFM), czy elektrochemiczna mikrowaga kwarcowa. Uzyskane przez Autorkę wyniki pozwalają wyciągnąć ważne wnioski odnośnie przydatności warstw pośredniczących, zastosowania próbników redoks unieruchomionych na powierzchni biosensora, czy celowości umiejscowienia błędnie dopasowanych zasad w łańcuchu DNA. Praca doktorska Pani Agaty Kowalczyk prezentuje znaczną ilość wyników poprzednio nieznanymi w literaturze naukowej. Ponadto Autorka dokonuje oceny krytycznej uzyskanych

przez siebie wyników na tle dostępnej literatury naukowej. Uważam, że praca jest opracowana bardzo starannie, a wyniki są opisane zwięzłym i precyzyjnym językiem. Stronę edytorską pracy oceniam również wysoko. Obecność nielicznych powtórzeń pewnych informacji można uzasadnić tym, że ułatwiają one zrozumienie tekstu pracy. Recenzent nie ma wątpliwości, że pomiary zostały przeprowadzone starannie, a uzyskane wyniki są przekonujące. Podobne stwierdzenie odnosi się do wniosków.

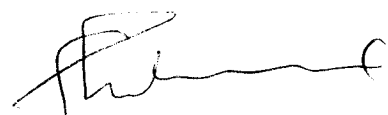
Podjęte przez Panią mgr Kowalczyk badania z pogranicza chemii materiałów i biomateriałów, fizykochemii powierzchni oraz chemii analitycznej i elektrochemii zmierzające do rozwinięcia metodologii wytwarzania biosensorów hybrydyzacji DNA i lepszego zrozumienia działania różnych materiałów elektrodowych i doboru metody detekcji procesu hybrydyzacji układach są bardzo ważne zarówno z punktu widzenia poznawczego jak i też ze względu na konieczność poszukiwania nowych koncepcji unieruchomienia pojedynczych nici DNA, wizualizacji procesu hybrydyzacji, a także przetwarzania sygnału chemicznego w mierzalny sygnał detekcji. Praca doktorska Pani Kowalczyk stanowi kontynuację wcześniejszych pionierskich badań prowadzonych przez Pana prof. dr hab. Zbigniewa Stojka i Panią dr Annę Nowicką w zakresie projektowania, udoskonalania i lepszego zrozumienia działania sensorów, warstw elektrodowych i układów bioelektroanalitycznych.

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

- (1) Podczas dyskusji zachowania się próbnika redoks typu antrachinonu pojawia się na stronie 89 trochę nieprecyzyjne stwierdzenie dotyczące „transportu elektronu odbywającego się przez dziury elektronowe...” .
- (2) Czy rozważano inne powierzchniowe układy modyfikujące niż 1,6-heksanoditiol (str. 126)? Czy długość łańcucha alkanotiolowego jest w tym przypadku optymalna? Co było układem stabilizującym nanocząstki złota w roztworze „koloidalnego złota”?
- (3) Uwaga ogólna: przy niższych stężeniach (mikromolowych) chromiany(VI) stają się w znacznym stopniu monomeryczne nawet w środowisku kwaśnym.
- (4) W trakcie obrony pracy oczekiwałbym dokonania bardziej jednoznacznej oceny takich parametrów pracy biosensorów jak powtarzalność i trwałość układów. Odnoszę wrażenie, iż wyniki w tym kontekście zaprezentowane w pracy mają charakter wstępny.

Pomimo moich powyższych uwag krytycznych, które mają oczywiście charakter dyskusyjny, chciałbym wyrazić moje uznanie dla wkładu pracy doktorantki, podkreślić wysokie znaczenie naukowe uzyskanych wyników i ocenić recenzowaną przeze mnie pracę doktorską bardzo pozytywnie. Jednocześnie stwierdzam, że praca Pani mgr Agaty Kowalczyk w pełni spełnia kryteria ustawowe stawiane rozprawom doktorskim w zakresie nauk chemicznych. Wnoszę o dopuszczenie doktorantki do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Ponadto proponuję Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego rozważenie możliwości wyróżnienia pracy doktorskiej Pani mgr Kowalczyk. Wniosek o wyróżnienie rozprawy uzasadniam wysoką jakością merytoryczną pracy, a w szczególności tym, że rozprawa zawiera bardzo dobrze (tzn. zwięźle, krytycznie, ale z uwzględnieniem licznych i ważnych pozycji literaturowych) opracowaną część literaturową oraz istotne elementy nowości naukowej w dziedzinie wytwarzania, charakterystyki i optymalizacji biosensorów hybrydyzacji DNA. Ponadto Autorka odwołuje się do współczesnych osiągnięć w dziedzinie chemii materiałów i bioelektrochemii, prezentuje i porównuje wyniki uzyskane dla różnych układów, co pozwala wyciągnąć odpowiednie wnioski, a także opisuje bardzo istotne procedury i wyniki o znaczeniu praktycznym dotyczące efektywnego unieruchomienia pojedynczych nici DNA, detekcji procesu hybrydyzacji DNA oraz ewentualnego zastosowania znaczników elektrochemicznych. Uzyskane wyniki mają istotne znaczenie przy projektowaniu selektywnych sensorów do oznaczania specyficznych sekwencji DNA, w tym charakterystycznych dla wybranych mikroorganizmów, co może mieć istotne znaczenie w analizie żywności modyfikowanej genetycznie, ochronie środowiska, czy epidemiologii.



*Paweł Kulesza*