

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Łucji Rodzik-Czałki pt.:

Nanostrukturalne fluorescencyjne materiały hybrydowe do konstrukcji biosensorów

1. Dobór tematu i zakres pracy

Rozwijające się w dynamicznym tempie nowoczesne technologie, jak również współczesna diagnostyka medyczna związana z monitoringiem procesów biochemicznych, w tym rozpoznaniem chorób na zróżnicowanym etapie, wprowadzeniem odpowiedniej terapii, konieczność prowadzenia analizy *in vivo* i *in situ*, wymagają doskonalenia metod analitycznych. Niezbędne stało się uruchomienie systemów pomiarowych, pozwalających oznaczać jeden lub więcej parametrów fizykochemicznych selektywnie, szybko i z dużą dokładnością. Wydaje się, iż ze względu na unikatowe właściwości światła to właśnie sensory optyczne mogą spełniać wymienione wysokie wymagania stawianym przez współczesną biotechnologię i biomedycynę.

Zarówno zatem w przedstawionej mi pracy doktorskiej poszukiwanie nowych optycznych układów sensorowych, jak również zastosowanie kropek kwantowych jako fluoroforów wpisuje się doskonale w najnowsze nurty badawcze. Bowiem kropki kwantowe będące alternatywą dla fluoroforów organicznych stosowanych w biosensorach i sensorach optycznych wykazują interesujące właściwości optyczne na skutek efektu uwięzienia kwantowego. Jako fluorofory posiadają szereg zalet: charakteryzują się szerokim pasmem wzbudzenia, wąskim pasmem emisji z dużym przesunięciem stokesowskim, dużą wydajnością kwantową emisji, możliwością modyfikacji istotnej swojej powierzchni, stosunkowo długim czasem życia fluorescencji oraz odpornością na fotowysbielanie.

Zaproponowane w pracy: synteza kropek kwantowych, ich modyfikacja z użyciem zasad azotowych: tyminy oraz guaniny, cały wachlarz badań podstawowych przeprowadzony w celu określenia właściwości fizykochemicznych powstałych konjugatów, zawierają w sobie również aspekt aplikacyjny. Możliwość selektywnego oznaczania przy pomocy takiego układu komplementarnej zasady azotowej i nukleozydu, których podwyższone stężenie może stanowić o toczącym się w organizmie ludzkim procesie chorobowym.

Przedmiotem prowadzonych badań była synteza i charakterystyka właściwości konjugatów: CdTe-tymina, CdTe-guanina, AuNPs-cytozyna (nanocząstki złota z cytozyną) oraz układu konjugat CdTe-guanina ze zmodyfikowanymi nanocząsteczkami złota pod kątem zastosowania ich jako fluorescencyjnych sensorów do selektywnego oznaczania zasad azotowych i nukleozydów.

Zakres pracy obejmował:

- syntezę kropek kwantowych CdTe oraz ich stabilizację przy pomocy kwasu tioglikolowego,
- syntezę konjugatów: CdTe-tymina, CdTe-guanina,
- modyfikację nanocząsteczek złota AuNPs przy pomocy cytozyny,
- badania dotyczące scharakteryzowania otrzymanych układów, tj. ustalono skład i budowę w wyniku przeprowadzonej analizy elementarnej oraz spektroskopii FTIR, skład chemiczny powierzchni techniką spektroskopii fotoelektronów (XPS), strukturę krystaliczną przy pomocy dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD), dla CdTe-tymina wyznaczono wartości średnic hydrodynamicznych (D_h) i współczynniki dyspersji (DI), obrazowanie oraz

morfologię otrzymanych materiałów przy pomocy transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) i techniką mikroskopii sił atomowych (AFM),

- badania fluorescencyjne dotyczące działania biosensorów bazujących na kropkach kwantowych i zasadzie azotowej tyminie lub guaninie,
- badania układu sensorowego: konjugat CdTe-guanina i nanocząsteczki złota AuNPs-cytozyna wykorzystujące zjawisko rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia (FRET), ze szczególnym uwzględnieniem selektywności ich działania podczas oznaczania wybranych zasad azotowych, również w warunkach symulowanego sztucznego moczu.

Zakres pracy należy uznać za niezwykle szeroki. Doktorantka postawiła sobie ambitne cele naukowe, mając świadomość, iż kropki kwantowe należą do „kapryśnych fluoroformów” biorąc pod uwagę ich właściwości w zależności od warunków syntezy, sposobu modyfikacji, itd. W tym kontekście proponowany zakres badań stawiał przed Doktorantką prawdziwe wyzwanie i wysokie wymagania, którym w mojej opinii Pani Łucja sprostała.

2. Przegląd literatury

W części teoretycznej Autorka przedstawiła w sposób przejrzysty a jednocześnie bardzo syntetyczny, co traktuję tu jako zaletę, wszystkie poruszane w swojej pracy zagadnienia.

Klasycznie została opracowana część dotycząca zjawiska fluorescencji. Oddzielny rozdział Doktorantka poświęciła informacjom na temat syntezy, budowy oraz właściwości fluoroformów nowej generacji – kropek kwantowych. Dokonała przeglądu istniejącego stanu wiedzy pod kątem interesujących ją zagadnień oraz dokonała odpowiednich wyborów, co biorąc pod uwagę olbrzymią ilość doniesień na temat właśnie kropek kwantowych, jest zadaniem niełatwym.

Zarówno sposób prezentacji, jak również dobór literatury źródłowej dowodzą bardzo dobrego merytorycznego przygotowania Doktorantki do podjęcia prac nad rozwiązaniem problemów stawianych w rozprawie.

3. Dobór materiałów i metod badawczych

Zarówno materiały, jak i stosowane metody badawcze zostały dobrane bardzo starannie w zależności od etapu przeprowadzonych prac. Otrzymane przez Autorkę pracy wszystkie związki i konjugaty zostały szczegółowo scharakteryzowane przy użyciu wymienionych wcześniej technik analitycznych. Ważne, iż Doktorantka w sposób wyczerpujący komentuje wyniki tych analiz.

Badania spektrofotometryczne i spektrofluorymetryczne zastosowano w istotnej części pracy, dotyczącej oceny efektywności działania powstałych układów sensorowych, czyli skuteczności oddziaływania konjugatów z zasadami azotowymi komplementarnymi i niekomplementarnymi oraz nukleozydami. Znajomość technik fluorescencyjnych pozwoliła Doktorantce zaprojektować i otrzymać układ sensorowy wykorzystujący zjawisko FRET.

4. Ocena merytoryczna rozprawy

Doktorantka na początku pracy postawiła główną tezę: „Możliwym jest zaprojektowanie i otrzymanie nowego biosensora opartego na odpowiednio sfunkcjonalizowanych kropkach kwantowych pozwalającego na czułą i selektywną detekcję zasad azotowych/nukleozydów”. W związku z tym sformułowała główny cel badawczy do osiągnięcia, dotyczący otrzymania i scharakteryzowania konjugatów opartych na kropkach kwantowych tellurku kadmu i zasadach purynowych/pirymidynowych potencjalnie przydatnych jako nowe biosensory do selektywnej detekcji zasad azotowych i nukleozydów. Cel ten został sformułowany w sposób jasny i konkretny.

Jednocześnie świadczy on o bardzo dobrym rozeznaniu literaturowym Doktorantki, dotyczącym projektowania i otrzymywania biosensorów. Bowiem właśnie liczne doniesienia literaturowe związane z selektywną detekcją związków biologicznie ważnych, np. glukozy, mocznika, czy nukleozydów są odpowiedzią na rosnące zapotrzebowanie biomedycyny na szybką i selektywną analizę płynów fizjologicznych w organizmie ludzkim, pod kątem obecności związków toksycznych, czy markerów groźnych chorób.

Stwierdzono, iż pojawienie się w moczu nadmiernego stężenia zasad azotowych lub ich pochodnych może stanowić istotny marker w diagnostyce wielu chorób. Stąd też próbę opracowania selektywnego oznaczania tego typu związków uważam za bardzo zasadną.

Zaproponowane w pracy rozwiązanie zostało starannie przemyślane i oparte na znanym powszechnie, istniejącym oddziaływaniu komplementarnych zasad azotowych: tymina-adenina oraz guanina-cytosyna, lub odpowiednich nukleozydów, zgodnie z modelem Watsona-Cricka. Stąd, jeżeli powierzchnię fluoroforu – kropki kwantowej zmodyfikowano przy pomocy tyminy to selektywność oznaczenia przy pomocy takiego układu wynikała z jego wyłącznego oddziaływania w roztworze z zasadą komplementarną adeniną. I podobnie, konjugat kropka kwantowa-guanina selektywnie oddziaływał jedynie tylko z cytozyną lub jej pochodnymi. W obydwu przypadkach element detekcyjny sensora stanowiła kropka kwantowa, której intensywność emisji fluorescencji ulegała zmianie w wyniku tego oddziaływania.

Kolejne etapy przeprowadzonych badań logicznie wynikały z sekwencji postawionych celów bardziej szczegółowych i były konsekwentnie realizowane. Chcę w tym miejscu podkreślić, iż pomysł otrzymania nowych biosensorów mógł być zrealizowany jedynie przy założeniu, iż Doktorantka potrafiła połączyć i wykorzystać swoją wiedzę z różnych dziedzin: biologii, chemii, fotochemii czy biomedycyny. Swoboda i spójność w realizacji tego interdyscyplinarnego tematu najlepiej świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki i jego realizację wysoko oceniam.

Na uwagę zasługuje również bardzo zróżnicowany charakter wykonywanych przez Doktorantkę kolejnych etapów badań: od syntezy kropek kwantowych i chemicznej modyfikacji ich powierzchni, przez obszerną analizę budowy i właściwości otrzymanych materiałów przy pomocy wymienionych już wcześniej technik analitycznych, umiejętność zinterpretowania otrzymanych wyników, aż po cykl badań fluorescencyjnych mających na celu sprawdzenie powstałych układów sensorowych, również w warunkach modelowej cieczy fizjologicznej, symulowanego sztucznego moczu. Natomiast każdy z tych etapów Autorka wykonuje z tą samą dokładnością i skrupulatnością a następnie opisuje najistotniejsze rezultaty w charakterystyczny dla siebie syntetyczny sposób.

Do interesujących i ważnych rezultatów rozprawy należy zaliczyć obszar badań poświęcony układowi sensorowemu FRET do oznaczeń wolnej guaniny w roztworze, w tym w symulowanym sztucznym moczu, na bazie kropek kwantowych z przyłączoną gualiną oraz nanocząstek złota (AuNPs) z przyłączoną cytozyną. Nanocząstki złota są stosowane jako akceptor energii ze względu na wysoki współczynnik ekstynkcji oraz szeroki zakres absorpcji w zakresie widzialnym. Z kropkami kwantowymi stanowią parę donor-akceptor, która używana jest jako nanosensor w analizach biochemicznych. Obecność w roztworze wymienionych konjugatów: kropek i nanocząstek złota była rejestrowana w postaci wygaszenia emisji fluorescencji kropek kwantowych z guaniną. Przeinkubowanie konjugatu akceptora energii z wolną guaniną w roztworze ograniczało jego oddziaływanie z konjugatem donora energii. W efekcie eliminowany był proces przeniesienia energii, co skutkowało wzrostem fluorescencji kropki kwantowej, będącym jednocześnie miarą stężenia guaniny w roztworze.

W celu sprawdzenia selektywności układu podobne eksperymenty przeprowadzano w obecności niekomplementarnych zasad azotowych, których to obecność nie miała wpływu na intensywność rejestrowanej fluorescencji.

Streszczenie tej części pracy w kilku zdaniach w rzeczywistości wymagało od Doktorantki przeprowadzenia wielu istotnych szczegółowych badań, chociażby dotyczących wyznaczenia średnicy konjugatów kropki kwantowej i nanocząstek złota a następnie sprawdzenia odległości ich wzajemnego oddziaływania, zgodnie z odległością Förstera dla istnienia FRET. Wyznaczone tego typu parametry stanowią ważny element poznawczy, istotny dla konstrukcji sensorów w oparciu o techniki fluorescencyjne, w tym z udziałem FRET.

Reasumując uważam, iż wszystkie postawione cele badawcze zostały przez Doktorantkę osiągnięte. Jednocześnie wyniki przeprowadzonych badań wnoszą wkład natury poznawczej do poszukiwań nowych układów sensorowych do oznaczania zasad azotowych, ich nukleozydów oraz modyfikowanych nukleozydów.

5. Pytania do Doktorantki

Wyniki przeprowadzonych badań są bardzo obiecujące. Ważne i interesujące jest, mając na uwadze szczególnie aspekt aplikacyjny:

1. Jaka była powtarzalność wyników dotyczących wielkości i właściwości otrzymywanych kropek kwantowych, także konjugatów?
2. Czy sprawdzano stabilność oraz fotostabilność syntetyzowanych kropek kwantowych?
3. Czy podjęto próby wyznaczenia czasów życia badanych konjugatów, który to parametr w sposób istotny charakteryzuje każdy fluorofor i jego wartość zmienia się podczas oddziaływań fluoroforu z mikrootoczeniem?

6. Ocena strony redakcyjnej pracy

Układ pracy jest przejrzysty. W dobrych proporcjach pozostają do siebie kolejne rozdziały rozprawy, tj. część literaturowa, stosowane techniki badawcze oraz dyskusja wyników. Praca jest napisana poprawnie stylistycznie. Posiada bardzo ładną szatę graficzną. Na szczególną uwagę zasługują zamieszczone w pracy bardzo starannie zaprezentowane schematy, ilustrujące zarówno główne etapy prowadzonych badań, jak również zaproponowane przez Doktorantkę mechanizmy detekcji komplementarnych zasad przy użyciu konjugatów. Sprawiają one, że mimo złożoności wielu etapów pracy dobrze się ją czyta.

Doktorantka nie ustrzegła się w tekście od tzw. „literówek”, które celowo nie wymieniam, gdyż pozostają one bez znaczenia dla merytorycznej wartości pracy.

7. Wniosek końcowy

Na podstawie argumentów przedstawionych w poprzednich rozdziałach recenzji uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa jest oryginalna. W pracy tej Autorka dowiodła, że potrafi prowadzić badania naukowe i posiada znaczny zasób erudycji niezbędnej współczesnemu badaczowi. Doktorantka rozprawy mimo złożoności i różnorodności badań osiągnęła zamierzone cele. Opracowanie wyników w formie rozprawy wskazuje na dojrzałość badawczą autorki oraz umiejętność analizy ich wyników, wyciągania wniosków.

Stwierdzam, że recenzowana praca nie tylko spełnia wszelkie wymogi rozprawy doktorskiej stawiane przez ustawę o tytułach i stopniach naukowych, ale jest pracą wyróżniającą. Stawiam więc wniosek do Wysockiej Rady o dopuszczenie Pani mgr Łucji Rodzik-Czałki do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz proponuję wyróżnienie pracy.

dr hab. inż. Ewa Miller

