

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Badania wybranych kompleksów porfiryn do zastosowania w roli znaczników białek

Intensywny rozwój biosensorów i testów powinowactwa, wykorzystujących głównie na reakcje immunochemiczne, umożliwia oznaczenia wielu analitów w próbkach o złożonych matrycach z wysoką czułością i niskimi granicami detekcji. Ze względu na fakt, iż samo oddziaływanie pomiędzy receptorem a analitem nie prowadzi zazwyczaj do powstania mierzalnego sygnału analitycznego ciągle poszukiwane są nowe metody znakowania białek, które pozwalają taki sygnał uzyskać. W tym celu wykorzystywane są różnorodne związki, które najczęściej poddawane są kowalencyjnemu dowiązaniu do cząsteczek białek. Najczęściej stosowanymi znacznikami są enzymy oraz różnorodne związki redoks-aktywne lub wykazujące właściwości fluorescencyjne. Należy podkreślić, iż w większości przypadków użyty znacznik, ze względu na swoje specyficzne właściwości, dedykowany jest oznaczaniu przy wykorzystaniu jednej konkretnej techniki analitycznej.

Ciekawym rozwiązaniem jest zastosowanie takich znaczników, które mogą generować dwa lub więcej rodzaje sygnałów. Dzięki ich zastosowaniu znacznie maleje prawdopodobieństwo popełnienia błędów w wykonywanych oznaczeniach. Z tego powodu zaproponowane zostało zastosowanie porfiryn i metaloporfiryn w roli znaczników białek. Związki tej grupy są niezwykle obiecujące w przypadku oznaczania białek, ze względu na możliwość monitorowania ich obecności za pomocą różnych technik. Dzięki unikalnym właściwościom spektroskopowym (metalo)porfiryn, jak również zdolności do ulegania reakjom redoks, mogą być one charakteryzowane zarówno elektrochemicznie, jak i optycznie – przy użyciu widm absorpcji i emisji fluorescencji. Niektóre metaloporfiryny wykazują dodatkowo właściwości kataliliczne. Możliwość potwierdzenia uzyskanego

wyniku kilkoma technikami przy użyciu tej samej niemodyfikowanej próbki (konieczne może być jedynie jej rozcieńczenie) wpływa znacząco na zwiększenie wiarygodności analizy.

Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było sprawdzenie możliwości zastosowania (metalo)porfiryn w roli hybrydowych znaczników białek. W toku przeprowadzanych badań wybrano takie pochodne porfiryne, które mogą być wykryte i oznaczone przy użyciu trzech technik detekcji: spektrofotometrii UV-Vis, spektrofluorymetrii oraz elektrochemii. Wyselekcjonowane związki spełniające to kryterium były następnie badane pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako znaczników.

Przebadano dużą grupę porfiryn, zarówno wodnorozpuszczalnych jak i nierozpuszczalnych w wodzie, zawierających w swojej strukturze różne kationy metali i podstawniki pierścieni. Spośród badanych związków 5,10,15,20-tetrafenyloporfiryne (Tpp) oraz jej pochodne zawierające skompleksowane kationy manganu(III) (Mn-tpp) oraz cyny(IV) (Sn-tpp) wybrane zostały jako najbardziej obiecujące znaczniki i poddane dalszym analizom.

W pierwszym etapie badań charakteryzowane były właściwości redoks wybranych (metalo)porfiryn. Badania uwzględniały wpływ różnorodnych parametrów na sygnały elektrochemiczne. Spośród analizowanych elektrod pracujących wykonanych z różnych materiałów elektrodowych wybrano tę z węgla szklanego. Pod uwagę wzięto również środowisko analizy: rozpuszczalnik (dimetylosulfotlenek wybrany został jako najbardziej odpowiedni) oraz elektrolit podstawowy. W zależności od przeciwjonu zawartego w stosowanych solach tetrabutylamoniowych (porównywano borany, bromki, jodki oraz nadchlorany), obserwowane były różnice w charakterze otrzymywanych sygnałów, jako że jony te różnie oddziałują z pierścieniami porfiryn lub kationami metali obecnymi w strukturze metaloporfiryn.

W kolejnym etapie sprawdzano wpływ obecności białek - naśladujących składniki warstwy receptorowej lub czynniki blokujące powierzchnię wykorzystywane w konstrukcji biosensorów - na uzyskiwane sygnały. W roli białek modelowych zastosowano bydlęcą albuminę osocza (BSA),

albuminę z jaja kurzego (CEA) oraz króliczą immunoglobulinę G (IgG). Wpływ białka oceniano na podstawie przesunięć sygnałów prądowych wzdłuż osi potencjałów oraz zmian ich intensywności.

Równocześnie przeprowadzane były badania właściwości spektroskopowych wybranych związków (za pomocą spektrofotometrii UV-Vis oraz spektrofluorymetrii). Także w tym przypadku sprawdzano wpływ białek na uzyskiwane widma, uwzględniając przesunięcia maksimów absorpcji i fluorescencji oraz zmiany w intensywności sygnałów. Badania te pozwoliły wybrać analitycznie użyteczne sygnały porfiryn, które nie ulegają zmianom na skutek oddziaływań porfiryny z białkami.

Następnie porfiryny sprzęgane były z modelowymi białkami - BSA oraz IgG. W tym celu zastosowane zostały pochodne Tpp zawierające w swojej strukturze grupę karboksylową, co pozwoliło na utworzenie wiązania peptydowego pomiędzy porfiryną a grupami aminowymi w łańcuchach bocznych białka. Optymalizacji poddane zostały różnorodne parametry koniugacji, takie jak: zastosowany rozpuszczalnik, rodzaj i stężenie czynnika aktywującego, czas aktywacji grupy karboksylowej, czas reakcji koniugacji oraz stężenie białka. Powstanie koniugatów porfiry-na-białko potwierdzane było z zastosowaniem elektroforezy żelowej oraz chromatografii wykluczenia.

Zwieńczenie badań stanowiło skonstruowanie modelowego immunotestu wykorzystującego przeciwciała znakowane porfiryną. W tym celu zastosowano techniki optyczne, jako że okazały się one umożliwiać oznaczenie porfiryn z niższymi granicami oznaczalności oraz szerszym zakresem liniowej odpowiedzi niż techniki prądowe. Analizy przeprowadzono przy użyciu płytek wielodołkowych o powierzchni pokrytej króliczymi anti-IgG. IgG wyznakowane przy użyciu Tpp dowiązywane były następnie do powierzchni warstwy receptorowej poprzez oddziaływanie powinowactwa. Częsteczki porfiryнового znacznika oznaczano z zastosowaniem spektrofotometry oraz spektrofluorymetrii. Skonstruowane zostały testy o kompetycyjnym i niekompetycyjnym trybie detekcji.

Ponadto, skonstruowano modelowy immunotest z zastosowaniem przeciwciał znakowanych Mn-tpp. Potwierdzono zarówno możliwość bezpośredniego optycznego oznaczenia porfiryny na podstawie pasma Soreta, jak również detekcji pośredniej z wykorzystaniem właściwości katalitycznych porfiryny manganowej. W drugim przypadku oznaczano barwne produkty reakcji katali-

zowanej przez Mn-tp. Wybrano również optymalne substraty oraz warunki dla reakcji katalitycznej. Uzyskane wyniki dowiodły, iż wybrane porfiryne mogą być z powodzeniem dowiązywane do białek i wykorzystywane w roli ich znaczników w testach i sensorach powinowactwa.

DOCTORAL THESIS SUMMARY

Studies on the application of selected porphyrins' complexes in the role of proteins' labels

Detection of biomolecules plays currently a crucial role in a number of clinical and biochemical analyzes. The elaboration of methods enabling biomolecules' determination is also relevant in numerous applications in analytical chemistry, e.g. in immunoassays and protein-based affinity biosensors. The methods of proteins labeling which could allow for the generation of sufficiently large analytical signals are still being sought. The considerable diversity of labels demonstrates how great is the need to develop adequately sensitive and stable labels for molecules of biological origin. Nowadays, a wide variety of labeling compounds is employed - mainly enzymes and fluorescent or redox labels. However, in most of the cases, the label molecule, due to its specific properties, is dedicated for determination using one particular analytical technique.

For this reason, the application of selected porphyrins and metalloporphyrins in the role of proteins' labels was proposed. Their unique spectroscopic properties as well as the capacity to undergo redox reactions allows them to be characterized based on both the optical mode of detection (fluorescence and absorption spectra) and also determined using electrochemical techniques. The catalytic properties of some metalloporphyrins may be used as well. Such approach employing various detection techniques leads to the apparent improvement of the analysis reliability. The obtained analytical result may be easily confirmed with another detection technique using the same sample with porphyrin labels - the only necessary step would be the dilution of the sample.

The Ph.D. thesis aimed to verify the feasibility of applying (metallo)porphyrins as hybrid labels for proteins. The research was focused on the characterization of various porphyrin derivatives

using UV-Vis spectrophotometry, spectrofluorimetry and electrochemistry, followed by the selection of these compounds which may be detected on the basis of these three detection techniques.

A wide group of porphyrin compounds, both water-soluble and insoluble, containing various metal cations and ring substituents was examined. As a result, 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin (Tpp) and its derivatives containing complexed manganese(III) and tin(IV) cations were chosen as they proved to meet the required criteria.

First, in the framework of electrochemical studies a variety of parameters that may affect the nature of the generated signals was optimized. The examination of different materials of working electrode led to the selection of glassy carbon electrode. Considering various analysis conditions dimethyl sulfoxide was chosen as the most appropriate solvent. The selection of supporting electrolyte was also taken into account employing tetrabutylammonium salts with different counterions (i.e. borate, bromide, iodide and perchlorate), since it is well known that various ions may interact with porphyrin rings or metal cations contained in metalloporphyrin structures. Simultaneously, the studies were carried out using spectroscopic techniques - spectrophotometry UV-Vis and spectrofluorimetry.

For selected porphyrins' derivatives the efforts to examine the protein's impact on the derived signals were also undertaken. The considered proteins mimicked the receptors or surface blocking agent used in the construction of bioassays. In the role of model biomolecules bovine serum albumin (BSA), chicken egg albumin (CEA) and immunoglobulin G (IgG) were employed. In the case of electrochemical measurements, the attention was paid to shifts of received signals along the potential axis and changes in the signals' intensities. Similar observations were made for the proteins' influence on the absorption and fluorescence spectra of (metallo)porphyrins. These findings allowed for the selection of those porphyrins' signals which are not affected by the proteins' presence and therefore are analytically useful.

Second, the conjugation of selected porphyrins to model proteins - BSA and IgG was conducted. To this end, Tpp derivatives containing carboxyl groups in their rings were used, which allowed for

the formation of peptide bond between porphyrin and proteins' side chains of aminoacids. Various conjugation parameters, including: applied solvent, type of activating agent and its concentration, time of carboxyl group activation, time of conjugation or concentration of protein were tested. The formation of conjugates was subsequently confirmed using gel electrophoresis (SDS-PAGE) and size-exclusion chromatography (SEC).

Next, the conjugates with IgG were used for construction of model immunoassay with porphyrin-labeled antibodies. For this purpose the optical mode of detection was used, as it proved to ensure lower limits of detection and wider range of linear responses than electrochemical techniques. The analysis were conducted using the multi-well plates coated with anti-IgG. The IgG molecules were labeled with Tpp and after binding with the receptor layer of immobilized antibodies detected by spectrophotometric and spectrofluorimetric detection. The assay was constructed using both non-competitive and competitive format.

Finally, the immunoassay with Mn-tpp label was constructed. In this case, the porphyrin label was determined either directly - on the basis of the Soret band or indirectly - using catalytic properties of manganese porphyrin. The optimal substrates and conditions of the catalytic reaction were also established. The results reveal that selected porphyrins are capable of use as proteins' label, as they were proved to be successfully determined after conjugation with antibodies in model optical immunoassay.

DOROBEK NAUKOWY

1 Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

P-1 Manganese porphyrins - studies on their potential use for protein labeling.

Kamila Konopińska, Mariusz Pietrzak, Elżbieta Malinowska, *Microchemical Journal*,
2014, *115*, 1-5. (IF = 2,746)

P-2 Studies on potential use of tin(IV) porphyrin in a role of proteins' label.

Kamila Konopińska, Mariusz Pietrzak, Elżbieta Malinowska, *Analytical Biochemistry*,
2015, *470*, 41-47. (IF = 2,219)

P-3 Tetraphenylporphyrin as a protein label for triple detection analytical systems.

Kamila Konopińska, Mariusz Pietrzak, Radosław Mazur, Elżbieta Malinowska,
przyjęty do *Heliyon*, **2015**.

P-4 Analytical characterization of IgG – cTpp and IgG – Mn-cTpp conjugates.

Kamila Konopińska, Mariusz Pietrzak, Radosław Mazur, Elżbieta Malinowska,
przyjęty do *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2015**. (IF = 1,397)

2 Publikacje niebędące częścią rozprawy doktorskiej

P-5 Studies on the construction and operation of miniaturized potentiometric biosensors.

Kamila Konopińska, Mariusz Pietrzak, Elżbieta Malinowska, *Journal of Solid State Electrochemistry*, **2013**, *17(6)*, 1665-1675.

3 udział w grantach i projektach badawczych

- G-1** Mikro i nano-systemy w chemii i diagnostyce biomedycznej MNS-DIAG, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka; Oś priorytetowa 1, Działanie 1.3, projekt kluczowy, POIG.01.03.01-00014/08, wykonawca
- G-2** Wykorzystanie ogniw mikrobiologicznych do produkcji energii, wodoru i w miniaturowych systemach detekcji, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, NR15-0049-10/2011, 2011-2014, wykonawca
- G-3** Projektowanie i charakteryzacja warstw receptorowych sensorów i biosensorów, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego N204 125237, 2009-2012, wykonawca

4 Wystąpienia na konferencjach krajowych i międzynarodowych

Prezentacje ustne

- PU-1** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Application of tetraphenylporphyrin derivative as proteins' label in affinity biosensor', *11th International Students Conference 'Modern Analytical Chemistry'*, Czechy, Praga, 22-23 września 2015
- PU-2** K. Konopińska, M. Pietrzak, R. Mazur, E. Malinowska, 'Wykorzystanie wybranych porfiryn i metaloporfiryn jako znaczników białek', *58. Zjazd PTChem i SITPChem*, Gdańsk, 21-25 września 2015
- PU-3** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Porphyrins as novel proteins' labels for application in affinity biosensors', *International Meeting on Chemical Sensors (IMCS)*, Buenos Aires, Argentyna, 16-19 marca 2014
- PU-4** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Badania wpływu białek na elektrochemiczne oznaczanie wybranych (metalo)porfiryn', *Elektroanaliza w teorii i praktyce*, Kraków, 5-6 czerwca 2014

- PU-5** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Badania wybranych (metalo)porfiryn do zastosowania w roli hybrydowych znaczników białek', *57. Zjazd PTChem i SITPChem*, Częstochowa, 14-18 września 2014
- PU-6** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Studies on application of metalloporphyrins as potential protein labels', *Fourth Regional Symposium on Electrochemistry of South-East Europe*, Lublana, Słowenia, 26-30 maja 2013
- PU-7** K. Konopińska, Ł. Górski, E. Malinowska, 'Miniaturowy układ do szybkiego oznaczania biochemicznego zapotrzebowania na tlen', *56. Zjazd PTChem i SITPChem*, Siedlce, 16-20 września 2013
- PU-8** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Badania nad działaniem miniaturowych biosensorów potencjometrycznych', *55. Zjazd PTChem i SITPChem*, Białystok, 16-20 września 2012
- PU-9** K. Konopińska, E. Malinowska, 'Application of affinity interactions in biosensors', *Na pograniczu biologii i chemii*, Ustroń, 26-29 maja 2012
- PU-10** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Badania nad działaniem miniaturowych biosensorów potencjometrycznych', *Elektroanaliza w teorii i praktyce*, Kraków, 27-28 września 2012

Prezentacje posterowe

- PP-1** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Tetraphenylporphyrin as proteins' label for application in affinity assays', *Euroanalysis*, Bordeaux, Francja, 6-10 września 2015
- PP-2** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Application of chosen complexes of porphyrins for proteins' labeling', *XXIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society*, Malmo, Szwecja,

14-18 czerwca 2015

- PP-3** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Wybrane kompleksy tetrafenyloporfiryny jako potencjalne znaczniki białek', *Elektroanaliza w teorii i praktyce*, Kraków, 28-29 czerwca 2015
- PP-4** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Tetraphenylporphyrin's derivatives as protein's labels for affinity biosensors', *Matrafured - International Conference on Electrochemical Sensors*, Wyszehrad, Węgry, 15-20 czerwca 2014
- PP-5** M. Pietrzka, K. Kozak, K. Konopińska, E. Malinowska, 'Studies on application of (metallo)porphyrins on the role of hybrid protein's labels for affinity biosensors', *Matrafured - International Conference on Electrochemical Sensors*, Wyszehrad, Węgry, 15-20 czerwca 2014
- PP-6** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Manganese porphyrin - potential hybrid proteins' label for application in affinity biosensors', *International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP)*, Stambuł, Turcja, 22-27 czerwca 2014
- PP-7** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Badania wpływu białek na elektrochemiczne oznaczanie tetrafenyloporfiryny i jej wybranych kompleksów', 57. *Zjazd PTChem i SITPChem*, Częstochowa, 14-18 września 2014
- PP-8** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Porfiryne manganowa jako potencjalny hybrydowy znacznik białek do zastosowania w biosensorach powinowactwa', *Chemsession'14*, Warszawa, 16 maja 2014
- PP-9** K. Konopińska, P. Michalec, Ł. Górski, E. Malinowska, 'Enzymatic system for BOD determination', *Fourth Regional Symposium on Electrochemistry of South-East Europe*, Lublana, Słowenia, 26-30 maja 2013
- PP-10** K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Studies on selected porphyrins and metalloporphyrins application for protein labeling', *Euroanalysis*, Warszawa, 25-

29 sierpnia 2013

PP-11 K. Konopińska, P. Michalec, Ł. Górski, E. Malinowska, 'Enzymatic system for BOD determination', *Euroanalysis*, Warszawa, 25-29 sierpnia 2013

PP-12 K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Badania wpływu białek na elektrochemiczne i optyczne oznaczanie wybranych kompleksów porfiryn', *56. Zjazd PTChem i SITPChem*, Siedlce, 16-20 września 2013

PP-13 K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Studies on application of selected porphyrins and metalloporphyrins for protein labeling', *From MPD to KNOW - 1st Scientific Conference of PhD Students Faculty of Chemistry Warsaw University of Technology and Faculty of Chemistry University of Warsaw*, Rawa Mazowiecka, 27-29 września 2013

PP-14 K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, 'Badania metaloporfiryn jako potencjalnych znaczników białek', *Chemsession'13*, Warszawa, 17 maja 2013

PP-15 K. Konopińska, M. Pietrzak, E. Malinowska, "Wpływ warstw przejściowych na stabilność parametrów pracy miniaturowych biosensorów potencjometrycznych", *Chemsession'12*, Warszawa, 10 maja 2012

5 Wyróżnienia i nagrody

- nagroda zespołowa stopnia II przyznana przez Rektora Politechniki Warszawskiej za osiągnięcia naukowe w latach 2013-2014
- wyróżnienie za najlepszy poster podczas *57. Zjazdu PTChem i SITPChem*, Częstochowa, 14-18 września 2014
- wyróżnienie za najlepszy poster podczas *1. Konferencji Doktorantów Wydziałów Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego i Politechniki Warszawskiej*, Rawa Mazowiecka, 27-29 września 2013

- specjalne stypendium naukowe Warszawskiego Akademickiego Konsorcjum Chemicznego (WAKCh) w ramach programu KNOW na rok 2014/2015
- stypendium z dotacji projakościowej Politechniki Warszawskiej za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2014/2015
- stypendium dla najlepszych doktorantów w roku akademickim 2014/2015, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
- specjalne stypendium naukowe Warszawskiego Akademickiego Konsorcjum Chemicznego (WAKCh) w ramach programu KNOW na rok 2013/2014
- stypendium z dotacji projakościowej Politechniki Warszawskiej za osiągnięcia naukowe w roku akademicki 2013/2014
- stypendium dla najlepszych doktorantów w roku akademickim 2013/2014, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
- stypendium dla najlepszych doktorantów w roku akademickim 2012/2013, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
- stypendium dla najlepszych nowo przyjętych doktorantów w roku akademickim 2011/2012, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska



POLITECHNIKA WARSZAWSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
Zakład Mikrobioanalitiky



Prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, tel.: 022-234-5657, e-mail: ejmal@ch.pw.edu.pl

Warszawa, 7 grudnia 2015 r.

OPINIA O PRACY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. KAMILI KONOPIŃSKIEJ

W rozprawie doktorskiej pt. „Badania wybranych kompleksów porfiryn do zastosowania w roli znaczników białek” sprawdzone zostały możliwości użycia (metalo)porfiryn do znakowania białek oraz przedstawione zostały wyniki badań dotyczących charakterystyki i zastosowania uzyskanych koniugatów porfiryna-białko.

W ramach niniejszej rozprawy Doktorantka na podstawie przeprowadzonych badań wybrała takie pochodne porfirynowe, które mogą być wykryte i oznaczone przy użyciu trzech technik detekcji: spektrofotometrii UV-Vis, spektrofluorymetrii oraz woltamperometrii. Wyselekcjonowane związki spełniające to kryterium zostały następnie zbadane pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako znaczników. Autorka przebadła dużą grupę porfiryn, zarówno wodnorozpuszczalnych jak i nierozpuszczalnych w wodzie, zawierających w swojej strukturze różne kationy metali i podstawniki pierścieni.

Mgr inż. Kamila Konopińska scharakteryzowała właściwości redoks wybranych (metalo)porfiryn, uwzględniając wpływ różnorodnych parametrów (materiał elektrody pracującej, rozpuszczalnik, elektrolit podstawowy) na sygnały elektrochemiczne. Istotną część badań Autorki stanowiło sprawdzenie wpływu obecności białek – naśladujących składniki warstwy receptorowej lub czynniki blokujące powierzchnię wykorzystywane w konstrukcji biosensorów – na uzyskiwane sygnały. Równocześnie mgr inż. Kamila Konopińska przeprowadziła badania właściwości spektroskopowych wybranych związków (za pomocą spektrofotometrii UV-Vis oraz spektrofluorymetrii). Także w tym przypadku sprawdzała wpływ białek na uzyskiwane widma. Badania te pozwoliły Autorce wybrać analitycznie użyteczne sygnały porfiryn, które nie ulegają zmianom na skutek oddziaływań porfiryny z białkami.

Doktorantka sprzęgała wyselekcjonowane porfiryny z modelowymi białkami - BSA oraz IgG, a także przeprowadziła charakteryzację koniugatów przy zastosowaniu odpowiednio dobranych technik.

Zwieńczenie badań stanowiło skonstruowanie przez Autorkę modelowego immunotestu wykorzystującego przeciwciała znakowane porfirynami – karboksylowaną pochodną tetrafenyloporfiryny oraz jej kompleksem zawierającym kation manganu(III). Mgr inż. Kamila Konopińska potwierdziła zarówno możliwość bezpośredniego optycznego oznaczenia porfiryny na podstawie pasma Soreta i spektrofluorymetrii, jak również detekcji pośredniej z wykorzystaniem właściwości katalitycznych porfiryny manganowej. Uzyskane przez Autorkę wyniki dowiodły, iż wybrane porfiryny mogą być z powodzeniem dowiązywane do białek i wykorzystywane w roli ich znaczników w testach i sensorach powinowactwa.

Podjęta przez Autorkę tematyka badawcza jest aktualna i doskonale wpisuje się w obecny nurt rozwoju chemii bioanalitycznej. Biosensory oraz biotesty są dziś powszechnie używanymi narzędziami umożliwiającymi analizę środowiskową, przemysłową, a przede wszystkim kliniczną. Badania Doktorantki przyczyniają się do rozwoju metod znakowania związków pochodzenia biologicznego i stanowią silną konkurencję dla powszechnie stosowanych znaczników enzymatycznych oraz radioizotopów.

Ponadto, Doktorantka proponuje zastosowanie porfiryn jako znaczników hybrydowych, które umożliwiają użycie sensora w układach z więcej niż jedną techniką detekcji. Takie podejście przyczynia się do zwiększenia wiarygodności wykonywanej analizy oraz, jak wykazała Autorka, do znacznego poszerzenia całkowitego zakresu prostoliniowej odpowiedzi testu.

Zaproponowany przez Doktorantkę układ pracy jest przejrzysty i logiczny, zaś przytoczona literatura naukowa została dobrze dobrana do zilustrowania poruszanych zagadnień. Przedłożona praca wskazuje na umiejętność syntetycznego i krytycznego spojrzenia Doktorantki na problemy poruszane w literaturze oraz potwierdza, iż mgr inż. Kamila Konopińska jest dojrzałą eksperymentatorką, potrafiącą nie tylko zaplanować doświadczenie, ale także właściwie zinterpretować otrzymane wyniki.

W mojej opinii przedłożona praca stanowi zamkniętą całość i spełnia wszystkie wymogi formalne określone w aktualnie obowiązujących aktach prawnych oraz kryteria zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.