

dr hab. inż. Barbara Kościelska, prof. PG
Zakład Fizyki Nanomateriałów
Instytut Nanotechnologii i Inżynierii Materiałowej
Wydział Fizyki Technicznej i Matematyki Stosowanej
Politechnika Gdańska

Gdańsk, 25 lipca 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Sulowskiej pt.

Nanodrut srebro jako platformy dla plazmonowo wzmocnionej fluorescencyjnej biosensoryki

wykonanej w Katedrze Nanofotoniki, w Instytucie Fizyki Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pod kierunkiem prof. dr. hab. Sebastiana Maćkowskiego (Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika) oraz prof. dr. hab. Joanny Niedziółki-Jönsson (Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk).

Tematyka przedstawionej mi do recenzji pracy związana jest z wykorzystaniem nanostruktur metalicznych w charakterze biosensorów służących do wykrywania białek. Jest to niezmiernie szybko rozwijająca się w ostatnich latach dziedzina nauki, zwłaszcza o odniesieniu do biosensorów do wykonywania szybkich testów. Należy jednak podkreślić, że projektowanie biosensorów, zwłaszcza takich, których działanie oparte jest na zjawisku rezonansu plazmonowego, nie jest sprawą prostą. Wymagana jest tu wiedza z zakresu wielu dyscyplin naukowych, jak fizyka, chemia, biologia, nanotechnologia czy inżynieria materiałowa. Praca ma zatem charakter interdyscyplinarny, a Autorka rozprawy postawiła sobie bardzo ambitny cel, jakim jest *wykazanie potencjału nanodrutów srebra jako platform biosensorowych umożliwiających wykrywanie pojedynczych białek dzięki plazmonowo wzmocnionej fluorescencji*. Uzyskane wyniki mogłyby mieć wkład w rozwój szeroko pojętej biosensoryki, jak również prowadzić do rozwiązań aplikacyjnych. Cel pracy Doktorantka postanowiła zrealizować w kilku etapach. Pierwszym z nich było opracowanie metody syntezy nanodrutów srebra (AgNWs) w taki sposób, aby otrzymać próbki monodispersyjne, a następnie opracowanie metody modyfikacji ich powierzchni. Modyfikacja powierzchni miała umożliwiać selektywną koniugację białka do powierzchni nanodrutów, jak również umożliwić związanie ich z podłożem szklanym. Kolejnym krokiem było sprawdzenie, czy sfunkcjonalizowane nanodrutu nadają się do wykrywania białka o niskim stężeniu. W tym kroku nanodrutu wraz z

białkiem zostały umieszczone w zawieszynie. Był to moim zdaniem bardzo dobry wstęp do dalszych badań, pozwalający w prosty sposób sprawdzić możliwości sensoryczne zsyntezowanych nanodrutów. Następnym etapem badań było sprawdzenie, czy uda się zbudować z nanodrutów sensor na podłożu szklanym. W tym eksperymencie Autorka chciała sprawdzić, czy dochodzi do koniugacji pojedynczych białek do nanodrutów srebra. Kolejnym krokiem była orientacja nanodrutów srebra i sprawdzenie wielkości „sygnału” wskazującego na detekcję białka. Ostatnim zadaniem, które postawiła przed sobą Doktorantka, było zbudowanie czipu ze zorientowanymi nanodrutami srebra, który umożliwiłby wykrywanie białka w niskich stężeniach, dzięki wykorzystaniu rezonansu plazmonowego nanodrutów. Wszystkie etapy badań są ze sobą powiązane, a wnioski uzyskane na poszczególnych etapach pozwalają projektowanie kolejnych doświadczeń, prowadzących do osiągnięcia celu pracy.

Rozprawa doktorska została napisana na 120 stronach (wraz ze streszczeniem, bibliografią, wykazem stosowanych skrótów oraz dorobkiem naukowym Doktorantki), zawiera 88 rysunków (do 14 z nich dodane zostały linki uruchamiające filmy pokazujące kinetykę zachodzących procesów), 1 tabelę oraz 156 pozycji literaturowych, związanych z problemami poruszonymi w recenzowanej rozprawie. W skład dwóch publikacji, których Doktorantka jest pierwszym autorem wchodzi wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie (pozycje [150] i [154]). W pozostałych 5 publikacjach, których wyniki są związane z tematyką niniejszej rozprawy doktorskiej, Doktorantka jest pierwszym autorem (pozycja [110]) lub drugim autorem (pozycje [103], [117], [122] i [137]). Szósta publikacja, która znalazła się w wykazie prac, których wyniki są związane z tematyką niniejszej rozprawy (*D. Kowalska, M. Szalkowski, K. Sulowska, D. Buczyńska, J. Niedziółka-Jönsson, M. Jönsson-Niedziółka, J. Kargul, H. Lokstein, S. Maćkowski "Silver Island Film for Enhancing Light Harvesting in Natural Photosynthetic Proteins" International Journal of Molecular Sciences, 21 (7) (2020), 2451*) nie została w rozprawie zacytowana i nie ma jej w Bibliografii.

Układ pracy jest właściwy i odpowiada przyjętym standardom prac doktorskich. Rozprawę rozpoczyna wstęp, pokazujący cel prowadzonych badań oraz przedstawiający strukturę pracy. Rozdziały 1 i 2 stanowią wprowadzenie teoretyczne do tematyki rozprawy. W rozdziale 1 opisane zostały biosensory, zaś w rozdziale 2 Autorka przedstawiła nanostruktury metaliczne i zachodzący w nich zlokalizowany rezonans plazmonowy. W kolejnym rozdziale, rozdziale 3, aby pokazać trendy badań nad nanosensorymi i wskazać potencjalne problemy, które wymagają rozwiązań, Doktorantka przedstawiła wybrane eksperymenty naukowe. Kilka z nich powstało w zewnętrznych ośrodkach naukowych [127, 132-135], a jeden [122] powstał w zespole kierowanym przez promotorów niniejszej rozprawy, którego uczestniczką była

Doktorantka. Jest to bardzo dobry pomysł wskazujący w jaki sposób badania Autorki wpisują się w prowadzone na świecie badania i dlaczego są one innowacyjne. Wydaje mi się, że prace te miały duży wpływ na pomysł badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy. Rozdział 4 zawiera opisy wszystkich technik eksperymentalnych wykorzystywanych przez Doktorantkę. W rozdziale 5 opisane zostały cele projektu doktorskiego, wraz z rozpisaniem etapami ich realizacji. Każdy z etapów został w rozprawie zilustrowany prostym schematem, co zwiększa czytelność rozdziału. Część doświadczalną otwiera rozdział 6, w którym przedstawiono materiały wykorzystane w eksperymentach, syntezę nanodrutów srebra, ich właściwości optyczne, schemat funkcjonalizacji powierzchni wytwarzanych nanodrutów oraz informacje o wykorzystywanym do badań emiterze - kompleksie fotoaktywnym perydynina-chlorofil-białko. Rozdziały 7-10 poświęcone są eksperymentom związanym z wykrywaniem białka, a każdy z tych rozdziałów zakończony jest krótkim podsumowaniem, wskazującym również w jakim kierunku powinny iść dalsze eksperymenty. Po tych rozdziałach znajduje się podsumowanie całej rozprawy. Każdy z rozdziałów opatrzony jest krótkim wstępem, streszczającym zawartość rozdziału, co zwiększa przejrzystość pracy. Pracę kończy bibliografia oraz streszczenie pracy napisane w języku angielskim. Dobór źródeł literaturowych oraz umiejętność polemiki z przedstawionymi w nich wynikami, potwierdzają bardzo dobre przygotowanie teoretyczne doktorantki w jej tematyce badawczej.

Oceniając część eksperymentalną rozprawy chciałabym zauważyć, że Autorka przeprowadziła szereg eksperymentów, wszystkie badania wykonała prawidłowo, zgodnie z obowiązującymi standardami. Uważam, że wykorzystane w pracy techniki badawcze, takie jak spektrofotometria UV-vis, fluorescencyjna mikroskopia szerokiego pola oraz fluorescencyjna mikroskopia konfokalna i spektroskopia czasowo-rozdzielcza wystarczają do osiągnięcia wyznaczonego celu pracy. Uwagę zwraca konsekwencja i systematyczność przeprowadzonych badań. Interpretacja wyników została starannie przeprowadzona w oparciu o aktualny stan wiedzy. Autorka nie boi się krytycznej oceny wyników swoich eksperymentów i potrafi wyciągać z nich wnioski. Widać to zwłaszcza w rozdziale 7, gdzie przedstawione są wyniki badań wydajności wykrywania białka fotoaktywnego przez nanodrut Ag podczas inkubacji w zawieszynie. Doktorantka stwierdziła, że założenie dotyczące obserwacji kilkunastu nanodrutów jako reprezentatywnej próby dla całej próbki, w założonych warunkach eksperymentu, jest błędne. Wskazała jednakże na możliwe przyczyny, jak nierównomierne pokrycie nanoprętów białkiem, tworzenie się aglomeratów PCP na powierzchni nanoprętów czy degradacja białka przy 16 godzinnym czasie inkubacji. W rezultacie Doktorantka postanowiła skupić się na wydajności wykrywania białka in-situ przez nanodrut srebra osadzone na podłożu szklanym

(rozdział 8). Doktorantka stwierdziła, że w tym przypadku możliwa jest obserwacja przyłączania pojedynczych białek PCP skoniugowanych z nanodrutami Ag. Czas koniugacji wynosił kilka sekund. Aby poprawić efektywność detekcji zaproponowała kontrolę orientacji nanodrutów. Wykazała, że możliwa jest orientacja nanodrutów srebra w kanale mikrofluidycznym, przy zachowaniu zdolności nanodrutów srebra do wykrywania białka. Orientacja nanodrutów w kanale mikrofluidycznym jest bardzo ciekawym i nowatorskim rozwiązaniem. Zaproponowana metoda pozwala zapobiegać wysychaniu rozpuszczalnika, jak też pozwala na usunięcie nieskoniugowanego białka, zwiększając tym samym kontrast. Kończącym etapem pracy było zbudowanie plazmonowego czipu opartego na AgNWs. Autorka rozprawy skupiła się tu na uproszczeniu metody modyfikacji podłoża oraz sprawdzeniu, czy zmiana modyfikacji podłoża umożliwia orientację nanodrutów srebra. Wykazała, że *srebrne nanodruty mogą zostać wykorzystane jako platformy biosensorowe dla plazmonowo wzmocnionej fluorescencyjnej biosensoryki, w szczególności mogą być wykorzystywane do wykrywania pojedynczych białek*. Jest to najważniejszy moim zdaniem wniosek wynikający z rozprawy. Ponadto, ponieważ powierzchnia nanodrutów Ag może być sfunkcjonalizowana różnymi bioreceptorami, rozmieszczone na podłożu stałym AgNWs stają się uniwersalnymi platformami.

Lektura recenzowanej rozprawy doktorskiej nasuwa mi jednakże kilka uwag, raczej polemicznych niż krytycznych.

1. Przedstawiając dorobek naukowy Doktorantka podaje publikacje z podziałem na trzy grupy. Ze względu na rozprawę doktorską bardzo istotne są dwie z nich: publikacje w których skład wchodzi wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej oraz publikacje których wyniki są związane z tematyką niniejszej rozprawy doktorskiej. Publikacjom z obu tych grup nie zostały przypisane numery. Znajdują się one jednak w Bibliografii, a przyporządkowane im numery związane są z kolejnością ich pojawiania się w rozprawie. Można było publikacjom Doktorantki przypisać osobną numerację (np. cyfry rzymskie, litery itp.), co ułatwiłoby ocenę, kiedy Doktorantka w swej rozprawie powołuje się na swoje wyniki, a kiedy cytuje bądź polemizuje z wynikami innych grup badawczych.

2. Niektóre rysunki w pracy nie są dobrej jakości, np. rys. 25, 34 b itp. Chodzi głównie o rysunki zaczerpnięte z prac innych grup badawczych. Nawet przy powiększaniu na monitorze komputera nie widać dobrze szczegółów.

3. Oprócz metod badawczych opisanych w rozdziale 4 Doktorantka wykorzystuje do obrazowania nanodrutów skaningową mikroskopię elektronową SEM. Metodą tą, oczywiście

przy odpowiednim powiększeniu, można również zobaczyć ułożenie nanodrutów na powierzchni szkła. Czy takie badania zostały przeprowadzone?

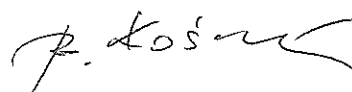
4. Na rysunku 38 b pokazane jest przykładowe widmo ekstynkcji zawiesiny nanodrutów srebra. Autorka rozprawy stwierdziła, że *Otrzymane widmo ekstynkcji jest podobne do tych zaprezentowanych w literaturze, dlatego można stwierdzić, że są to AgNWs [138]*. Trochę zabrakło mi w pracy dyskusji szczegółów tego widma, np. tego skąd pochodzi mniejsze maksimum przy około 350 nm oraz długiego „ogona” w kierunku podczerwieni.

5. Na rysunku 51c zostały przedstawione krzywe zaniku fluorescencji PCP skoniugowanego do AgNWs, zmierzone w punktach o różnym natężeniu fluorescencji. Doktorantka pisze, że *W przypadku miejsc o dużym natężeniu fluorescencji PCP czas jest coraz dłuższy (1 ns), a sama krzywa zaniku fluorescencji przybiera jednowykładniczy charakter*. Zdanie to sugeruje, że w krzywe zaniku fluorescencji zmierzone w punktach o małym natężeniu fluorescencji mają inny charakter. Jeśli tak, to jaki jest to zanik i w jaki sposób został zmierzony średni czas zaniku? Mam również pytanie o charakter krzywych pokazanych na rysunku 59 c.

Wskazane w recenzji uchybienia, poczynione z obowiązku recenzenta, w najmniejszym stopniu nie umniejszają wartości rozprawy, którą oceniam bardzo pozytywnie. Mogę śmiało stwierdzić, że założone cele pracy zostały zrealizowane, stwierdzenia i wnioski zostały sformułowane prawidłowo i w pełni wynikają z uzyskanych wyników badań. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi gruntownej wiedzy teoretycznej i praktycznej Autorki w zakresie Dyscypliny Nauki Fizyczne, a także umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Ponadto, uzyskane wyniki badań wnoszą istotny wkład w rozwój badań nad plazmonowo wzmocnioną biosensoryką.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Sulowskiej pt. *Nanodruły srebra jako platformy dla plazmonowo wzmocnionej fluorescencyjnej biosensoryki* spełnia prawne wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z art. 187 ust. 1 i 2 *ustawy prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc po uwagę interdyscyplinarność pracy, oryginalność pomysłu badawczego, sposób rozwiązywania problemów naukowych wynikających z tej pracy doktorskiej oraz uzyskane wyniki i wysoki poziom merytoryczny ich dyskusji, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



Barbara Kościelska

