



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Fizyki

Dr hab. Jacek Szczytko, prof. UW

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Sulowskiej pt.
*Nanodruty srebra jako platformy dla plazmonowo wzmocnionej
fluorescencyjnej biosensoryki***

Praca doktorska pani mgr Karoliny Sulowskiej dotyczy plazmonowo wzmocnionej fluorescencyjnej biosensoryki pozwalającej na wykrywanie pojedynczych białek. Praca została wykonana pod kierunkiem Prof. dra hab. Sebastiana Maćkowskiego z Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz Prof. dr hab. inż. Joanny Niedziółki-Jönsson w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk. Współpraca doktorantki z IChF zaowocowała w szczególności opracowaniem kanałów mikrofluidycznych i pozwalała na dostęp do specjalistycznej aparatury wykorzystanej w badaniach. Zagadnienia poruszone w rozprawie doktorskiej są bardzo aktualne – ilość badań poświęconych czujnikom plazmonicznym od trzech lat przekracza 900 publikacji rocznie¹.

Wykorzystanie nanostruktur w diagnostyce medycznej i badaniach biologicznych jest przedmiotem intensywnych badań na całym świecie. Wymyślono wiele strategii prowadzących do rejestracji analitu przez biosensory. W pierwszych trzech rozdziałach swojej rozprawy doktorskiej mgr Sulowska omówiła krótko te różnorodne strategie oraz pożądane parametry biosensora istotne z punktu widzenia nie tylko użytkownika, ale też producenta. Z tych wielu dostępnych opcji pani Sulowska i jej promotorzy wybrali nanodrutu ze srebra i wykorzystanie wzmocnienia plazmonowego fluorescencji. Wybór przedmiotu badań spośród szerokiego grona dostępnych technologii został przekonująco uzasadniony: chodzi o koszty syntezy i kontroli geometrii nanostruktur, skalowalność produkcji, szybkość i czułość detekcji. Rozprawa doktorska skupia się na zademonstrowaniu potencjału nanodrutów srebra do wykrywania określonych białek. Takimi modelowymi białkami były fotoaktywne kompleksy perydynina-chlorofil-białko (PCP) wyposażone w streptawidynę, natomiast nanocząstki srebra modyfikowano cysyteaminą i biotyną. Dzięki oddziaływaniu streptawidyna-biotyna i wzmocnieniu emisji światła uzyskano biosensory, które zostały przetestowane pod kątem wykrywania pojedynczych cząsteczek kompleksu barwnikowo-białkowego PCP. W przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej opisano szczegółowo cztery strategie detekcji białek PCP: wykrywanie białek w roztworze sfunkcjonalizowanych nanodrutów srebra (Rozdział 7), na podłożu szklanym z naniesionymi nanodrutami srebra (Rozdział 8),

¹ Wyniki z serwisu Web of Science „plasmonic AND sensor” przy 8 tysiącach łącznie, przy czym fraza „silver AND sensor” przekracza 10 tys. wyników i serwis Web of Science nawet nie podaje takiej ilości wyników.

w mikrokanale z naniesionymi przypadkowo oraz z uporządkowanymi nanodrutami (układzie nazwanym „mikroczipem”, Rozdział 9). Do rozprawy doktorskiej dołączono filmy pokazujące w czasie rzeczywistym pojawienie się (i zmiany) fluorescencji PCP. Dzięki dodatkowym materiałom można na własne oczy przekonać się jak czuła jest metoda pomiaru zaproponowana przez doktorantkę.

Praca pani mgr Karoliny Sulowskiej jest dość starannie zredagowana, choć przydałoby się więcej uwagi przyłożyć do ujednolicenia rysunków i wyrównania podpisów pod nimi (moim zdaniem centrowanie nie jest najszcześniejszym wyborem). Te drobne niedociągnięcia jednak nie psują ogólnie bardzo pozytywnego wrażenia na temat treści rozprawy. Praca doktorska składa się z 10 rozdziałów. Pierwsze trzy, jak już wspomniałem, skupiają się na przeglądzie literaturowym na temat biosensorów i nanostruktur metalicznych oraz eksperymentów podobnych do prowadzonych w ramach pracy badawczej doktorantki. Rozdział czwarty to omówienie wykorzystywanych w badaniach technik pomiarowych. Rozdział piąty to krótkie omówienie celów projektu doktorskiego. Obecność tego rozdziału jest bardzo dobrym pomysłem – z jednej strony oddziela wstępne części rozprawy od prezentacji własnych badań prowadzonych przez Doktorantkę, z drugiej wprowadza czytelnika w kolejne rozdziały prezentujące syntezę i funkcjonalizację srebrnych nanodrutów (Rozdział 6) oraz wspomniane wcześniej przeze mnie omówienie strategii detekcji białek PCP. Całość rozprawy kończy podsumowanie badań oraz bibliografia.

Wyniki przedstawione w rozprawie pani mgr Sulowskiej zostały uzyskane na nanodrutach, których syntezę szczegółowo opisano w Rozdziale 6. Doktorantka nie prowadziła badań nad optymalizacją rozmiarów nanodrutów, gdyż nie taki był cel jej badań. Doktorantka podkreśliła możliwość masowej produkcji podobnych nanodrutów metodą poliol, która jest skalowalna i pozostawia niewielką ilość odpadów. Metoda poliol dała pewien rozrzut rozmiarów, a zwłaszcza średnic nanodrutów. Obserwacje mikroskopowe i czasowo-rozdzielcze wykonane na różnych nanodrutach – będące centralną częścią badań i które uważam za ogromnie wartościowe – pokazują, że nie wszystkie nanodruły zachowują się tak samo. Eksperymenty optyczne nie dają niestety możliwości precyzyjnego pomiaru średnic nanodrutów, ale ciekaw jestem, czy na podstawie obecnych wyników możliwa by była wstępna optymalizacja detekcji białek – chociażby przez proste porównanie ze sobą fluorescencji drutów dłuższych/krótszych, cieńszych/grubszych. Podobały mi się pomiary zmiany natężenia fluorescencji PCP w czasie, choć w całej pracy nie znalazłem długości trwania impulsu światła (jest częstotliwość sygnału 20 MHz i długość fali 485 nm. Firma wspomniana w pracy produkuje głównie lasery pikosekundowe). Pomysłowe zastosowanie pryzmatu Amiciego pozwoliło na przestrzenną separację sygnału od biologicznych emiterów, a wykorzystanie fotodiody lawinowej umożliwiło badanie zależności czasowych w skali pikosekund. W szczególności pani mgr Sulowska zaobserwowała, że końce nanodrutów pokryte białkiem PCP są zwykle jaśniejsze niż ich środki. Z rys. 59 (str. 82) wynika, że fluorescencja zanika szybciej, więc na skutek wzmocnienia plazmonowego czas życia emitery uległ skróceniu. Końce nanodrutów mogłyby dawać jaśniejszą fluorescencję także dlatego, że

mogłoby się do nich dołączać więcej białek, jednak pomiar czasowo-rozdzielczy sugeruje, że kluczowe jest wzbudzenie plazmonowe i oddziaływanie fluoroforu z nanodrutem srebra.

W polskim systemie recenzent pracy doktorskiej nie ma wpływu na ostateczną postać pracy i niemożliwe są nawet drobne edytorskie poprawki. Jednak przyjęto się, że recenzja zawiera też listę niedociągnięć redaktorskich. Nie znalazłem ich wiele² - pewnym mankamentem wydrukowanej pracy są niewidoczne odnośniki do filmów. W wersji cyfrowej po najejchaniu na zwrot „umieszczono pod linkiem” czytnik dokumentu pdf przekierowuje do filmu znajdującego się na prywatnym dysku Google pani mgr Karoliny Sulowskiej. Moim zdaniem te filmiki są doskonałym uzupełnieniem rozprawy, ale chciałbym zaapelować do Doktorantki i jej P.T. Promotorów o umieszczenie tych wartościowych filmików w otwartym repozytorium (np. polskim RepOD), któremu można nadać unikatowy numer DOI pozwalający na odszukanie tych zasobów w przyszłości. Filmów tych nie znalazłem w materiałach dodatkowych dwóch głównych publikacji, które są podstawą rozprawy doktorskiej (*Spectrochimica Acta Part A*: 289 (2022), 122225 i *Methods and Applications in Fluorescence*, 8 (4) (2020), 045004). Przysięgam, że dostałem wszystkie filmiki na dołączonym do pracy dysku USB, ale o ile praca nie będzie utajniona, to moim zdaniem dostęp do nich powinni mieć wszyscy czytelnicy. Być może już się tego nie da zrobić (jak wspomniałem polski system oceny nie pozwala na żadne poprawki), ale jeśli praca pani Sulowskiej będzie umieszczona na stronach UMK lub IChF PAN rozważyłbym podanie stosownych numerków DOI.

Pani Sulowska starannie opisała prowadzone doświadczenia. Jednak moim zdaniem zabrakło informacji w jaki sposób próbki podczas badania na szkle (Rozdz. 7 i 8) były zabezpieczone przed wysychaniem. Doktorantka przygotowała roztwory różniące się koncentracjami PCP i rozwirowała je na szkiełkach (Rozdz. 7) lub nakropiła PCP na wyschnięte nanodruły. Film z Rys. 54 pokazuje dramatyczną zmianę luminescencji po odparowaniu wody. Oznacza to jednak, że w czasie całego pomiaru zmieniało się stężenie białek PCP w roztworze – odparowywanie rozpuszczalnika zagęszczało białka i tym samym ułatwiało detekcję. W czasie publicznej obrony chciałbym poprosić o wyjaśnienie procedury pomiarowej i skomentowanie wpływu parowania rozpuszczalnika na zależności czasowe prezentowane w Rozdz. 7 i 8, np. w kontekście czułości metody i możliwej detekcji pojedynczych białek. Przy okazji skomentuję stwierdzenie ze str. 72 „[...] czas inkubacji 5 min okazał się za krótki. Z drugiej strony wydłużenie czasu inkubacji prowadzi do degradacji białka”. Trochę niezręcznie brzmi ta „druga strona”, bo porównujemy ze sobą wyniki uzyskane dla 5 i aż 960 min. Rozumiem, że nie mamy danych dla czasów inkubacji pomiędzy 5 a 960 min, ale w pracy nie wyznaczono optymalnego czasu inkubacji białka skupiając się na praktycznym do wykonania szybkim teście. Nie jest to zarzut, raczej komentarz do zdania, które brzmiało zbyt kategorycznie. Nie zrozumiałem dlaczego urządzenie mikrofluidyczne z uporządkowanymi nanodrutami srebra autorka rozprawy nazywa „plazmonowym czipem”. Słowo „chip”

² Str. 24 odwołanie do Rys. 6 – powinno być do Rys. 7; str. 39 wzory (1) i (2) powinny mieć w mianownikach indeksy „zero”; str. 41 Rys. 23 mało czytelny; str. 61 Rys 39a powinien być 39b; str. 73 mały rysunek; Rys. 59c – dziwna kolejność 2431; Str. 103 – „octadecylotrimetoksylu” (powinno ...sylanu);

sugeruje jakąś zmianę jakościową (np. automatyczną detekcję, równoległy pomiar wielu analitów itp.). W czym istotnym – oprócz uporządkowania i ew. zagęszczenia nanodrutów – ten czip z rozdziału 9 różni się od czipu z rozdziału 10? W trakcie obrony doktorskiej będę chciał się także dowiedzieć więcej o tym, w jaki sposób będzie wyglądała detekcja białek w końcowym urządzeniu. Czy strategia wymaga najpierw opracowania molekuł, które przyczepią białka PCP do analitu? Co się stanie, jeśli rozmiar analitu istotnie zwiększy odległość fluoroforu od nanodrutu srebra – jaki rozmiar analitów jest dopuszczalny? Jaka w ogóle jest szansa na wyprodukowanie sensora – czy te technologie są już opatentowane, czy UMK i IChF PAN zadbały o ochronę własności intelektualnej wypracowanej w ramach pracy Doktorantki.

Z załączonej do rozprawy notki dotyczącej dorobku naukowego wynika, że pani mgr Karolina Sulowska jest współautorką łącznie 18 prac (jeszcze jedna pojawiła się też w czerwcu tego roku), z czego w czterech jest pierwszą autorką. Jest to doskonały wynik świadczący o szerokich zainteresowaniach badawczych doktorantki. W 2021 r. pani Karolina zdobyła grant NCN PRELUDIUM *Drukowane nanostruktury metaliczne dla wzmocnionej plazmonowo mobilnej mikroskopii fluorescencyjnej* 2021/41/N/ST7/03528. Umiejętność zdobycia funduszy na badania w prestiżowym otwartym konkursie grantowym potwierdza dojrzałość naukową mgr Karoliny Sulowskiej.

Zgodnie z Art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr Karoliny Sulowskiej prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną w naukach fizycznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i zademonstrowanie koncepcji działania biosensora opartego o funkcjonalizowane nanodruły srebra. Recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska zawiera wartościowe wyniki badań, które nie są przyczynkowe, a wnoszą nowe i istotne informacje o zastosowaniu nanodrutów srebra w biosensoryce. Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne UMK w Toruniu z wnioskiem o dopuszczenie mgr Karoliny Sulowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto uważam, że oryginalność metod i narzędzi badawczych rozprawy doktorskiej zasługuje na wyróżnienie, o co niniejszym wnioskuję.

Dr hab. Jacek Szczytko, prof. UW
Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego
ul. Pasteura 5, 02-093 Warszawa
jacek.szczytko@fuw.edu.pl

Warszawa 31.07.2023 r.