

Prof. dr hab. Grzegorz Celichowski
Katedra Technologii i Chemii Materiałów
Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki

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

Rozprawa doktorska napisana pod kierunkiem:
Prof. dra hab. Sebastiana Maćkowskiego
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
oraz
Prof. dr hab. inż. Joanny Niedziółki-Jönsson
Instytut Chemii Fizycznej
Polska Akademia Nauk

Wybór tematyki pracy.

Biosensory, ze względu na ich zdolność do szybkiego wykrywania specyficznych substancji biologicznych lub chemicznych, stanowią niezwykle ważny temat badań. W miarę postępującego rozwoju technologii i rosnących wyzwań w dziedzinie zdrowia i środowiska, zastosowanie biosensorów ma kluczowe znaczenie dla diagnostyki, monitoringu i analizy procesów biologicznych.

Biosensory odgrywają znaczącą rolę w zastosowaniach biomedycznych- zdolność do precyzyjnej identyfikacji biomarkerów chorobowych, wirusów czy bakterii pozwala na wczesne wykrywanie zagrożeń zdrowotnych oraz skuteczne prowadzenie terapii. W przypadku nowotworów, biosensory pozwalają na wcześniejsze wykrycie choroby, co może

znacznie zwiększać szanse pacjentów na skuteczną terapię i wyleczenie. Ponadto, ich zastosowanie jest kluczowe w bieżącym monitorowaniu stanu zdrowia pacjentów, co może prowadzić do bardziej zindywidualizowanego i skutecznego leczenia.

Kolejnym istotnym obszarem zastosowania biosensorów jest ochrona środowiska. Z wykorzystaniem zaawansowanych technologii, te czułe i selektywne urządzenia mogą być używane do monitorowania jakości powietrza, wody i gleby. Umożliwia to wczesne wykrywanie i reagowanie na zanieczyszczenia, a także zapobieganie potencjalnym katastrofom ekologicznym. Dzięki temu biosensory odgrywają kluczową rolę w działaniach na rzecz zrównoważonego rozwoju oraz zachowania czystego i zdrowego środowiska.

Szczególnie fascynującym aspektem badania biosensorów jest wykorzystanie do ich wytwarzania nanomateriałów. Charakteryzują się one wyjątkowymi właściwościami, takimi jak duża powierzchnia aktywna, wyjątkowa reaktywność chemiczna oraz w przypadku nanostruktur metalicznych posiadają ciekawe i użyteczne właściwości fotoniczne, co przyczynia się do poprawy czułości i selektywności sensorów. Ich struktura i zdolność do interakcji z analitem pozwalają na wykrywanie nawet niewielkich ilości substancji - w niektórych przypadkach są to pojedyncze cząsteczki.

Podjęcie tematyki badań związanej z wykorzystaniem fotonicznych właściwości nanostruktur metalicznych uważam za tematykę bardzo aktualną zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Cel i teza rozprawy.

Doktorantka sformułowała następujący cel pracy: „Głównym celem projektu doktorskiego było zwiększenie potencjału nanodrutów srebra jako platform dla plazmonowo wzmocnionej fluorescencyjnej biosensoryki”. Nie sformułowano jednoznacznej tezy, natomiast przedstawiony został bardzo klarowny opis planu pracy w postaci pięciu etapów rozpoczynających się od syntezy i charakterystyki nanodrutów srebra, które później wykorzystane były do budowy biosensorów o co raz bardziej kontrolowanej strukturze.

Przedstawione zostały również badania wstępne, zakończone dwoma publikacjami z udziałem Pani mgr Karoliny Sulowskiej, które nakierowały doktorantkę na podjętą w pracy doktorskiej tematykę badawczą.

Struktura i strona edytorska rozprawy.

Praca ma klasyczny układ jakiego można oczekiwać od rozprawy doktorskiej, liczy 125 stron, napisana jest w języku polskim i zawiera następujące elementy:

- Spis treści w formie klasycznej spełniający swoje funkcje.
- 2 strony wykazu skrótów i oznaczeń, który w pełni spełnia swoje zadanie.
- Zestawienie dorobku naukowego – w sumie 18 pozycji w czasopismach z listy filadelfijskiej.
- Wstęp wprowadzający do zagadnień opisywanych w pracy wraz z podaniem celów pracy.
- Część literaturową liczącą 43 strony. Przedstawione zostały opisy zagadnień związanych z biosensorami, nanostrukturami metalicznymi wraz z metodami modyfikacji ich powierzchni, opis zjawiska rezonansu plazmonowego i wpływ tego zjawiska na fluorescencje sprzężonych emiterów. W dalszej części Doktorantka przedstawiła opis wybranych biosensorów oraz używane w pracy techniki eksperymentalne.
- Ciekawie zilustrowany graficznie cel projektu doktorskiego wraz etapami jego realizacji przedstawione na kolejnych dwóch stronach.
- Część doświadczalną liczącą 51 strony zawierającą precyzyjny i bogato ilustrowany opis kolejnych etapów. Na uwagę zasługują dołączone do pracy rejestracje wideo, które bardzo dobrze ilustrują procesy przyłączania i wizualizacji fluorescencji badanego białka.
- Jednostronicowe podsumowanie zamykające rozprawę.
- Bibliografię zawierającą 156 pozycji literaturowych w większości pochodzących z okresu ostatnich 10 lat.

- Jednostronicowe streszczenie w języku angielskim.

Praca nie zawiera spisu ilustracji i załączonych plików wideo.

Podsumowując zaprezentowana struktura dysertacji w pełni odpowiada oczekiwaniom stawianym pracom doktorskim.

Ocena zawartości merytorycznej rozprawy.

Analiza stanu wiedzy - część literaturowa.

Przedstawione zagadnienia dobrze wprowadzają do tematyki rozprawy. W praktyce wstęp teoretyczny podzielony jest na trzy części.

Pierwsza część omawia podstawowe zjawiska i wprowadza do tematyki biosensorów. Szczególnie ciekawy jest fragment poświęcony wpływowi rezonansu plazmonowego na fluorescencje emiterów. Z lektury tego fragmentu wynika, że maksimum wzmocnienia fluorescencji występuje, gdy emiter znajduje się w odległości 5 nm od powierzchni nanostruktury metalicznej.

Mam w związku z tym dwa pytania:

Po pierwsze, czy odległość ta jest w jakiś sposób zależna od budowy chemicznej otoczenia takiego układu, a w szczególności materiału który znajduje się pomiędzy emiterem a powierzchnią nanostruktury metalicznej?

Drugie pytanie dotyczy badanego przez Doktorantkę układu. Czy podczas jego projektowania brano pod uwagę geometrię białka i linkerów sprzęgających to białko z powierzchnią nanodrutów srebra tak, aby zoptymalizować odległość posiadających właściwości fluorescencyjne cząsteczek chlorofilu od powierzchni metalu?

Druga część to przegląd wybranych eksperymentów. Doktorantka bardzo ciekawie opisała przykłady i dobrze zilustrowała je odpowiednimi grafikami.

Trzecia część to opis technik eksperymentalnych. Jest to ważny fragment pracy, ponieważ do badań zastosowano zaawansowane układy zmodyfikowanych na potrzeby prowadzonych badań mikroskopów optycznych. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka brała udział nie tylko w prowadzeniu pomiarów, ale również w budowie tak zaawansowanych

stanowisk badawczych. Jako wieloletni eksperymentator bardzo doceniam ten fakt i myślę, że przyczynił się on do dobrego zrozumienia istoty prowadzonych pomiarów, co ilustrują precyzyjne opisy prowadzonych pomiarów zamieszczone w części eksperymentalnej.

Mam jednak pewną generalną uwagę do części teoretycznej. Brakuje mi jej podsumowania i wskazania obszarów, w których obecne są luki w wiedzy, a które jak można się domyślić Doktorantka wraz ze swoimi promotorami celnie zdiagnozowała (o czym świadczą opublikowane prace zawierające wyniki prowadzonych badań).

Mam również kilka drobniejszych uwag dotyczących wstępu teoretycznego:

- 1) Na str. 17 można znaleźć sformułowanie „wieloaromatyczne węglowodory” – chyba chodziło o wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne?
- 2) Na str. 24 w zdaniu: „Na rys. 6. wyróżniono trzy typy nanosensorów” – powinien być rys 7.
- 3) Na str. 29 możemy przeczytać: „Do technik wykorzystywanych w tej metodzie należą między innymi litografia wiązką elektronową. Kształt pożądaných nanostruktur jest wytwarzany przy użyciu maski, na którą nanosi się fotorezyst” – proszę o komentarz – litografia wiązką elektronów nie wymaga stosowania masek.
- 4) Na str. 39 wzory (3) i (4) są identyczne a opisują różne parametry optyczne nanostruktur?
- 5) Na str. 41 możemy przeczytać: „Wzrost szybkości wzbudzenia oraz szybkości promieniowania nazywany jest plazmonowym wzmocnieniem fluorescencji” jak należy rozumieć „szybkości promieniowania”?
- 6) Na str. 50 możemy przeczytać: „Następnie obraz zanalizowano cyfrowo i generowano wynik” w moim odczuciu jest to zapis zbyt kolokwialny.

Te kilka uwag językowych i redakcyjnych zdecydowanie nie wpływają na bardzo dobry odbiór części teoretycznej recenzowanej pracy.

Cel projektu doktorskiego.

Cel projektu jest jednoznacznie wskazany, podano również w jaki sposób ma on być osiągnięty. Bardzo klarownie wskazano kolejne etapy pracy i w ciekawy sposób ten podział został zilustrowany.

Po przeczytaniu celu pracy, zawsze mnie korci (przepraszam za kolokwializm, ale jakoś on tu pasuje pomimo powagi recenzji), żeby od razu spojrzeć na wnioski końcowe i zobaczyć, czy cele zostały zrealizowane. W przypadku tej pracy, w pierwszym zdaniu podsumowania możemy przeczytać: „W niniejszej rozprawie zaprezentowana została nowatorska metoda orientacji nanodrutów srebra w kanale mikrofluidycznym”. Czytając część doświadczalną odnosi się wrażenie, że orientacja nanodrutów srebra na podłożu jest bardzo ważnym elementem tej pracy. I w istocie tak jest. Brakuje mi jednak czytelnego opisu, dlaczego tak jest. Jaki jest problem ze stochastycznie naniesionymi nanodrutami? Wiemy tylko, że trudno jest znaleźć dobre miejsce do pomiarów– ale co to znaczy? Czy nanodrutu nie mogą się krzyżować? A jeśli tak, to dlaczego? Prosiłbym o jasne sprecyzowanie tego zagadnienia, bo z pracy wynika, że jest ważne, ale nie jest klarownie napisane dlaczego. Można się tego oczywiście domyślać, ale w moim odczuciu w pracy naukowej nie powinniśmy zostawiać miejsc na domysły.

Brakuje mi również opisu lub zdefiniowania czym jest „plazmonowy czip”, oczywiście pierwsze skojarzenia mam z czipami w elektronicznych układach scalonych jakimi np. są mikroprocesory, ale opisywane w pracy układy są jednak znacząco różne.

Uwagi edytorskie:

Wyrażenie „aby otrzymać próbki o możliwie jak najbardziej monodispersyjne” wymaga korekty.

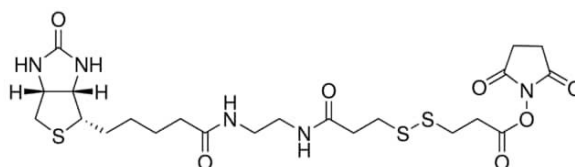
Zdanie: „Celem było wykrycie wszystkich białek w roztworze poprzez długi czas inkubacji” sprawia wrażenie, że mogą tam być obecne różne białka.

Część eksperymentalna.

Generalnie część pracy opisująca badania eksperymentalne jest bogata w treść, ciekawie napisana i bardzo dobrze zilustrowana. Prowadzi czytelnika przez kolejne etapy prac i dobrze pokazuje osiągnięte na tych etapach wyniki. Dołączone pliki wideo były dla mnie bardzo pomocne w zrozumieniu opisywanych procesów. Jedyne czego mi trochę brakuje, to wspomniany powyżej brak klarownego opisu zagadnienia orientacji nanodrutów srebra.

Mam jednak kilka drobnych pytań i uwag wymagających wyjaśnienia:

- W całej pracy konsekwentnie używany jest termin ekstynkcja zamiast absorbcja. Jako chemik jestem przyzwyczajony do mówienia o współczynniku ekstynkcji, a oś Y na widmach UV-VIS opisuję jako absorbcja.
- Trochę trudno jest mi zgodzić się z opisem Rys. 39, na którym w większym powiększeniu ma być widoczny polimer (PVP). Na jakiej podstawie to stwierdzono? W kilkakrotnie przepłukanych wodą nanodrutach srebra powłoka PVP obecna na powierzchni ma grubość kilka nm i jest to widoczne na ogół tylko poprzez obrazowanie TEM. Takie jest moje doświadczenie – proszę o komentarz.
- Na Rys. 41 przedstawiono schemat funkcjonalizacji powierzchni AgNWs. W drugim etapie grupa aminowa wykorzystywana jest do przyłączenia biotyny. W tym celu stosowany jest związek opisany jako biotyna-NHS. Przedstawiony na rysunku wzór struktury zawierający biotynę jest niezgodny z opisem. Najprawdopodobniej wynika to z uproszczenia, co jest uzasadnione ze względu na czytelność rysunku. Jest to zrozumiałe, ale powinno być jednoznacznie zaznaczone. Mam jednak pytanie dotyczące konkretnego związku wybranego do tej reakcji. Opisany on jest jako „biotyny-NHS (Sigma-Aldrich, B4531)”. Związek ten ma strukturę przedstawioną na poniższym rysunku:



Biotin disulfide N-hydroxysuccinimide ester.

Proszę o komentarz jakimi kryteriami kierowano się wybierając akurat tą pochodną jako linker. Po pierwsze są dostępne znacznie tańsze linkery tego typu, ale co najważniejsze obecność wiązania disulfidowego sprawia, że związek ten może reagować bezpośrednio z powierzchnią srebra. Jego użycie, przynajmniej teoretycznie, nie wymagałoby pierwszego etapu wprowadzania cysteiny na powierzchnię AgNWs. Chyba, że są inne powody tego wyboru. Proszę o dyskusję tego zagadnienia.

- Na str. 65 w zdaniu: „Następnie po określonym czasie koniugacji do mieszaniny dodano roztwór poli(alkoholu winylowego) (PVP).” Powinno być PVA.
- Na str. 85 można przeczytać: „Oznacza to, że PCP przyłączyło się efektywnie do powierzchni AgNWs i nie ma wolnych grup funkcyjnych.” O jakich grupach funkcyjnych jest mowa?
- Na str. 89 w tekście opisu powyżej rysunku 67 możemy przeczytać: „Krzywe zaniku fluorescencji PCP przedstawione na wykresie (rys. 67. (d)) są znacznie skrócone” na rysunku brak jest fragmentu (d).
- Na str. 92 opis rys. 68 jest niejednoznaczny. Poniżej, na tej samej stronie można przeczytać: „Następnie w jednorazowym naczyniu wymieszano bazę elastomeru silikonowego (typ SYLGARD 184, DOW) ze środkiem sieciującym w proporcji 10 : 1. Otrzymano kompozyt polidimetylosiloksan (PDMS).” Dlaczego czysty PDMS nazywany jest kompozytem? Co jest napełniaczem a co osnową?
- Na str. 103 podano skład roztworu „nadtlenku wodoru (H_2O_2 30%): amoniaku (NH_3) w proporcjach 5:1:1,” co jest trzecim składnikiem?
- Na str. 108 pierwsza część rys. 86 zawiera grafikę z pionowymi pasami. Podobna jest na rys. 88. Jak należy je interpretować? Są trzy osie: czas, rozmiar i jakaś trzecia wartość bez opisu.

Chciałbym podkreślić, że pomimo tego, że lista pytań i uwag jest dość długa nie oznacza to, że mój odbiór tej części pracy nie jest pozytywny. Wręcz przeciwnie, praca tak mnie zaintrygowała, że bardzo dokładnie ją analizowałem.

Podsumowanie rozprawy.

Część opisowa pracy zakończona jest podsumowaniem, w którym Doktorantka zebrała najważniejsze osiągnięcia. Odniosła się również do postawionego na początku pracy celu, wskazując na fakt, że nanodrut srebrego mogą pełnić rolę platformy do budowy sprawnych biosensorów. Cała zaprezentowana praca wykonana została na jednym modelowym układzie, jednak jak wskazuje Autorka pracy, zastosowanie innych aktywnych receptorów na powierzchni nanodrutów srebra, może uczynić z nich nanomateriał bardzo uniwersalny o dużym potencjale aplikacyjnym.

Wnioski końcowe.

Zaprezentowane wyniki pracy stanowią ciekawy i wartościowy materiał naukowy o wysokim poziomie oryginalności. Doktorantka posiada bardzo duży dorobek publikacyjny, w tym aż 8 prac związanych z tematyką prezentowanej rozprawy. Razem 18 publikacji.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że oceniana przeze mnie rozprawa w pełni spełnia wymagania określone w tekście „Ustawa prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”. Wnoszę więc do Wysokiej Rady wniosek o podjęcie pozytywnej decyzji w sprawie dopuszczenia mgr Karoliny Sulowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Prof. dr hab. Grzegorz Celichowski