

dr hab. Arkadiusz Ptak, prof. PP
Instytut Fizyki
Wydział Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej
Politechnika Poznańska
e-mail: arkadiusz.ptak@put.poznan.pl
tel.: +48 61 665-3233

Poznań, 12 stycznia 2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Mateusza Olszyny pt.

„Development and application of fluorescent microsensors for new label-free detection method based on Low-Q Whispering Gallery Modes”

Wstęp

Praca doktorska pana mgr. Mateusza Olszyny wykonana została pod kierunkiem śp. prof. dr. hab. Stefana Jurgi oraz prof. UAM dr. hab. Macieja Wiesnera. Kopromotorem pracy był dr hab. Lars Dähne. Badania realizowane były w Centrum NanoBioMedycznym (CNBM) Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu oraz w Surflay Nanotec GmbH w Berlinie.

Tematyka podjęta przez Doktoranta wpisuje się w nurt badań poświęconych rozwojowi beznacznikowych (*label-free*) technik diagnostycznych wykorzystujących specyficzne biocujniki. W przeciwieństwie do powszechnie stosowanych metod diagnostycznych wymagających znakowania cząsteczek receptorów lub ligandów markerami (najczęściej fluorescencyjnymi lub radioaktywnymi), metody beznacznikowe wykorzystują różnego rodzaju przetworniki (np. optyczne, elektryczne lub mechaniczne) umożliwiające uzyskanie informacji o oddziaływaniach międzycząsteczkowych na podstawie mierzalnego sygnału. Pozwala to na uniknięcie modyfikacji cząsteczek receptorów lub ligandów, zachowując ich natywną strukturę i tym samym funkcję.

Doktorant skoncentrował się na optymalizacji technologii wytwarzania mikrorezonatorów wykorzystujących zjawisko optycznego rezonansu prowadzącego do powstania specyficznych modów określanych jako mody galerii szeptów (*Whispering Gallery*

Mode – WGM) w celu transformacji sygnału biochemicznego (oddziaływań międzycząsteczkowych) na elektromagnetyczny. Czujniki tego typu posiadają wiele zalet w stosunku do klasycznych czujników beznacznikowych. Ze względu na niewielkie rozmiary pozwalają na diagnostykę *in vivo* w tkankach, a nawet komórkach biologicznych. Ponadto, z uwagi na ich małą wrażliwość na zmiany temperatury otoczenia, nie wymagają stosowania często kłopotliwej i podwyższającej koszty izolacji termicznej. Pomimo, że technologie czujników WGM wydają się być obiecującą koncepcją, wiele problemów badawczych pozostaje jeszcze do rozwiązania, zarówno w odniesieniu do zachodzących zjawisk fizycznych, jak i technologii wytwarzania. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska podejmuje istotne kwestie z obszaru nowej generacji beznacznikowych bioczujników optycznych z uwzględnieniem ich potencjalnego zastosowania, w tym w diagnostyce medycznej.

Opis i ocena zawartości pracy

Rozprawa doktorska ma formę pracy pisemnej, zawierającej m.in. wyniki z opublikowanego artykułu naukowego w *Advanced Functional Materials 2018*, którego pan Mateusz Olszyna jest pierwszym autorem. Załączone oświadczenia współautorów szczegółowo informują o wkładzie Doktoranta w przygotowanie wymienionego artykułu, który można uznać za większościowy. Gorzej jest z oceną udziału w drugim z artykułów przedstawionych jako dorobek w postępowaniu o nadanie stopnia doktora (R. Bischler, M. Olszyna, M. Himmelhaus, and L. Dähne, *Eur. Phys. J. Spec. Top.* 2014, 223, 2041–2055), czego powodem jest brak oświadczeń pierwszego i trzeciego współautora. Niemniej, na podstawie oświadczeń pozostałych współautorów, w tym pana mgr. Olszyny, można wnioskować o jego znaczącym udziale. Należy przy tym dodać, że w rozprawie znalazły się głównie wyniki pierwszego z artykułów.

Rozprawa napisana została w języku angielskim, ale zgodnie z ustawowym wymogiem zawiera streszczenie – i to obszerne – w języku polskim. Na stronie tytułowej zamieszczona została adnotacja informująca, że praca uzyskała wsparcie Federalnego Ministerstwa Oświaty i Badań Naukowych w Niemczech (BMBF) w ramach inicjatywy badawczej KMU *Innovativ-BioChance*.

Temat pracy zwięźle opisuje jej zawartość. Szczegółowy spis treści ułatwia czytelnikowi poruszanie się po sekcjach rozprawy. Struktura jest klasyczna, z podziałem na sześć rozdziałów oraz wiele podrozdziałów. Ostatni rozdział stanowi bibliografia (*References*). Łącznie z nią

rozprawa liczy 126 stron. Za bibliografią zamieszczone zostało *curriculum vitae* Doktoranta, lista jego publikacji oraz lista wystąpień konferencyjnych.

W pierwszym – jednostronicowym – rozdziale (*Introduction*) Autor przedstawił krótkie wprowadzenie do optycznych metod detekcji bezznacznikowych, które szczegółowo omawia w pierwszym podrozdziale rozdziału drugiego, nazwanego *Literature review*. Po kolei omawiane są następujące metody: i) wykorzystującą zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR), ii) elipsometrię, iii) interferencyjną spektroskopię odbiciową (*reflectometric interference spectroscopy* – RIfS), iv) interferometrię biowarstw (*biolayer interferometry* – BLI) oraz v) metodę wykorzystującą mody galerii szeptów (*whispering gallery modes* – WGMs). W każdym z podrozdziałów omówione zostały fizyczne podstawy wykorzystywanych zjawisk oraz krótko zastosowania i ograniczenia, przy czym podrozdział 2.1.5, z oczywistych względów jest najobszerniejszy. Oprócz opisu zjawiska rezonansu WGM zawiera krótki rys historyczny oraz porównanie rezonatorów WGM o wysokiej i niskiej wartości współczynnika dobroci Q, z uwzględnieniem technik wprowadzania fali świetlnej do rezonatora.

W drugiej części rozdziału drugiego Doktorant opisał technikę wytwarzania cienkich pokryć metodą „warstwa po warstwie” (*layer-by-layer* – LbL), będącą powszechną techniką wykorzystywaną do funkcjonalizacji powierzchni biosensorów WGM. W opisie zwrócił szczególną uwagę na dobór polielektrolitów oraz wielofunkcyjne właściwości filmów LbL.

Rozdział trzeci, zatytułowany *Materials and Methods*, zgodnie z nazwą przedstawia opis użytych materiałów, przygotowania próbek oraz zastosowanych metod analitycznych. W pierwszych podrozdziałach Doktorant opisał materiały i odczynniki chemiczne użyte w eksperymentach, następnie metody syntezy polielektrolitów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi oraz biotyną oraz procedury modyfikacji powierzchni biosensorów *Low-Q WGM*. W ostatnim podrozdziale przedstawione zostały metody i aparatura pomiarowa wykorzystana w pracy doktorskiej; wśród nich: spektrometr UV-Vis, spektrofluorymetr, konfokalny laserowy mikroskop skaningowy (CLSM), układ dyskowej wirówki CPS do analizy rozmiarów cząstek, układ WhisperSense, mikrowaga kwarcowa (QCM), układ pomiarowy rezonansu plazmonów powierzchniowych (SPR) oraz test HABA.

Rozdział czwarty (*Results and Discussion*), przedstawiający wyniki przeprowadzonych badań wraz z ich dyskusją, jest najobszerniejszym z rozdziałów rozprawy. Podzielony został na dwie części. W pierwszym podrozdziale Autor opisuje wpływ sześciu parametrów i czynników

związanych z wytwarzaniem mikrosensorów WGM na ich czułość i wydajność. Pierwszą analizowaną cechą był rodzaj materiału rezonatorów, w szczególności charakteryzowany przez współczynnik załamania światła. Zbadane zostały mikrocząstki wykonane z pięciu rodzajów materiału: polistyrenu (PS), melamino-formaldehydu (MF), polimetakrylanu metylu (PMMA), szkła borokrzemowego (BG) i krzemionki (SiO₂). Ponadto określany był wpływ wielkości i chropowatości powierzchni cząstek, typ zastosowanej polimeryzacji, rodzaj i rozmieszczenie barwnika oraz liczba naniesionych warstw polielektrolitu. Znaczna część przedstawionych wyników została opublikowana w artykule naukowym (Olszyna *et al.* *Advanced Functional Materials* 2018). Na końcu podrozdziału Autor zamieścił podsumowanie tej części wyników i ich dyskusji, co ułatwia czytelnikowi śledzenie na bieżąco najważniejszych osiągnięć rozprawy.

W drugiej części rozdziału czwartego Autor przedstawił praktyczne zastosowanie fluorescencyjnych mikrorezonatorów *Low-Q WGM* w analizie bezznaczkowej. W pierwszej sekcji badana była niespecyficzna adsorpcja polielektrolitów na powierzchni mikrorezonatorów WGM dla dwóch rodzajów oddziaływań wykorzystywanych przy osadzaniu warstw: oddziaływań elektrostatycznych (kombinacje PAH/PSS i PDADMAC/PSS) oraz wiązań wodorowych (PVP/PMAA). Następnie wyznaczona została czułość sensorów na niewielkie zmiany współczynnika załamania światła w otaczającym roztworze, której wartość określono jako 2×10^{-4} . W kolejnej sekcji Doktorant dokonał analizy porównawczej metody WGM z QCM i SPR badając niespecyficzne wiązania białka lizozym o różnym stężeniu. Następnie badał oddziaływania specyficzne receptor-ligand na przykładzie jednych z najsilniejszych tego typu oddziaływań, a mianowicie wiązania streptawidyna-biotyna, określając m.in. wpływ liczby cząsteczek biotyny oraz zastosowanych polielektrolitów na ilość wiązanej streptawidyny. Ostatnim testem było wykrywanie zanieczyszczeń wody wywołanych rozpuszczalnikami organicznymi takimi jak THF, toluen i aceton. Również na końcu tego podrozdziału Autor zamieścił podsumowującą dyskusję.

Rozdział piąty, *Conclusions*, stanowi końcowe podsumowanie wyników badań w formie wypunktowanych wniosków. Pozwolę sobie przytoczyć w skróconej formie kilka – w mojej ocenie – najistotniejszych i najciekawszych, dodając swoje komentarze. Otóż, najlepszym rodzajem materiału do produkcji mikrorezonatorów *Low-Q WGM* – należy dodać z pięciu przebadanych przez Doktoranta (!) – jest polistyren (PS). Mikrocząstki PS mają kulisty kształt, gładką powierzchnię oraz wysoki współczynnik załamania światła. Optymalna średnica

mikrorezonatorów PS zawiera się w przedziale 8,5–11 μm . W tym zakresie mikrorezonatory charakteryzują się najwyższą intensywnością sygnału oraz najmniejszą szerokością połówkową modów rezonansowych. Nie występują też dodatkowe piki interferencyjne utrudniające analizę widma rezonansu WGM.

Ciekawym, zarówno pod względem badawczym, jak i naukowym, jest wniosek dotyczący immobilizacji barwnika fluorescencyjnego na powierzchni mikrorezonatorów PS. Autor wykazał, że osadzając kumarynę 343 z wykorzystaniem techniki LbL na powierzchni sfer, można znacząco zmniejszyć wielkość tła fluorescencji, zachowując przy tym małą szerokość spektralną modów rezonansowych, w porównaniu do mikrorezonatorów z inkorporowanym barwnikiem do wnętrza sfery.

Innym istotnym wnioskiem jest zaobserwowana bardzo niską czułość na zmiany temperatury w porównaniu do innych bezznacznikowych czujników optycznych wykorzystujących zjawisko SPR lub elipsometrię. Zaobserwowane przez Autora przesunięcie widmowe rezonansu WGM mieści się w zakresie 0,004–0,007 $\text{nm}/^\circ\text{C}$.

Kolejne wnioski końcowe dotyczą przeprowadzonych testów aplikacyjnych biosensorów WGM. W detekcji niespecyficzej adsorpcji białka lizozym biosensory WGM dorównywały czułością biosensorom QCM, jednak charakteryzowały się wolniejszą kinetyką reakcji wiązania lizozymu, co Autor tłumaczy ograniczeniami układu mikroprzepływowego. Również dużą czułość mikrorezonatory WGM wykazały w detekcji wiązań specyficznych receptor-ligand, a konkretnie streptawidyna-biotyna. Granica wykrywalności dla streptawidyny została określona na ok. 0,2 nM, co jest wynikiem porównywalnym z metodą SPR. Ponadto, Autor pokazał, że mikrorezonatory WGM mogą być stosowane w analizie zanieczyszczeń wody rozpuszczalnikami organicznymi takimi jak aceton, toluen czy tetrahydrofuran.

Ogólnie rozprawa sprawia pozytywne wrażenie, zarówno pod względem merytorycznym, jak i redakcyjnym. Struktura pracy jest przejrzysta, a podział na rozdziały generalnie logiczny, choć czasami brakuje konsekwencji w nazewnictwie, o czym w uwagach szczegółowych. Praca jest poprawna metodycznie, nie znalazłem błędów w interpretacji wyników. Rozprawę czyta się płynnie, dyskusja prowadzona jest logicznie, a wyciągane wnioski mają oparcie w otrzymanych wynikach. Pod względem językowym jest poprawna (z małymi usterkami, o czym wspomnę w uwagach szczegółowych), również pod względem redakcyjnym z wyjątkiem technicznego przygotowanie schematów i wykresów. Na wielu z nich czcionka jest zdecydowanie zbyt mała, często na granicy możliwości odczytania (np. Rys. 5, 6 i wiele innych).

Na wielu obrazach, szczególnie CLSM, brakuje skali lub jest nie do odczytania (np. rys. 33, 41, 55), co utrudnia ocenę wielkości cząstek. Bibliografia jest bogata, odpowiednio dobrana i aktualna. Brakuje jedynie tytułów w danych bibliograficznych cytowanych artykułów, co ułatwiłoby czytelnikowi określić kontekst cytowanej publikacji.

Znalazło się w pracy kilka uchybień i niejasności, odnośnie których swoje uwagi i pytania przedstawię poniżej w dwóch grupach.

Szczegółowe komentarze i pytania dotyczące strony merytorycznej pracy

1. W pracy zabrakło mi jasnego uzasadnienia, czym kierował się Autor wybierając do badań materiały do utworzenia mikrorezonatorów. Czy oprócz przebadanych pięciu rodzajów materiału (PS, MF, PMMA, BG i SiO₂) były brane pod uwagę – a może nawet badane – również inne, np. o jeszcze wyższym współczynniku załamania światła?
2. Bardzo interesującym wynikiem pracy jest wykazanie, że cząsteczki barwnika nie muszą być wprowadzane do wnętrza mikrocząstek, by uzyskać silny sygnał WGM. W przypadku pokrycia barwnikiem powierzchni mikrosfer, stosując metodę „warstwa po warstwie” (LbL), otrzymany sygnał jest nawet wyższej jakości. Autor wyjaśnia uzyskanie efektu WGM mechanizmem tunelowania fotonów ze wzbudzonych cząsteczek barwnika do wnętrza mikrosfer. Gdyby był to jedyny mechanizm, to wtedy intensywność sygnału WGM mierzona dla coraz grubszych powłok powinna stosunkowo szybko, już po kilku warstwach, wykazywać coraz mniejsze przyrosty wartości, ze względu na wykładniczy spadek prawdopodobieństwa tunelowania z odległością od powierzchni sfery (podobnie szybko zanikają wektory E i M bliskiego pola). Jednak nie jest to obserwowane w eksperymencie. Na rys. 43 b) widoczny jest liniowy wzrost intensywności sygnału z liczbą warstw. W jaki sposób można to pogodzić? Czy współczynnik załamania światła dla warstw PE z barwnikiem może być znacząco wyższy niż dla czystych warstw PE? Na ile można oszacować grubość tych warstw w jednostkach metrycznych?
3. W nawiązaniu do powyższego punktu, mam pytanie ogólniejsze, dotyczące przenoszenia pojęć ze skali makro, czy nawet mikro, do skali nanometrowej, a nawet molekularnej? Czy powszechna definicja współczynnika załamania światła nie „załamuje się” w skali warstw molekularnych znacznie cieńszych od długości fali światła?
4. Wysunięty wniosek dotyczący optymalnej liczby warstw osadzonych na sferach WGM nie do końca zgodny jest z danymi na wykresach (rys. 43). Otóż, Autor podaje, że jakość

sygnału WGM dla metody „warstwa po warstwie” (LbL) jest porównywalna z tą dla metody domieszkowania barwnika tylko dla liczby warstw mniejszej niż 3 podwójne warstwy (6L). Jednak z wykresu wynika, że porównywalna jest dla 4 i 5 podwójnych warstw (8L i 10L) i dopiero dla 6 (12L) jest gorsza (wzrost „mode bandwidth”). Ponadto stosunek intensywności sygnału do tła wzrasta znacząco od 4 podwójnych warstw (8L) (rys. 43 b).

5. Dlaczego tak dziwny kształt jak gwiazdka (rys. 26) brano był pod uwagę w czipie mikroprzepływowym dla sensorów WGM?
6. Proszę sprawdzić, czy odwołania do wzorów w sekcji „Calculations” na stronie 61 są poprawne.
7. Z opisu wynika, że wielkości „mode shift” i $\Delta\lambda$ na rys. 51 a) i b) są tożsame. Dlaczego zatem ich różny zapis?
8. Dlaczego wpływ pH polielektrolitów na intensywność oddziaływań niespecyficznych badany był akurat dla zakresu 4,6-5,6 (tabela 9)? Czy brano pod uwagę wpływ pH na strukturę streptawidyny? Struktury drugo- i trzeciorzędowe białek są wrażliwe na pH otoczenia.
9. Czy w eksperymentach detekcji niewielkich ilości THF i acetonu w wodzie, udało się zaobserwować powrót sygnału WGM do stanu początkowego po płukaniu wodą destylowaną (rys. 59)? Czy jednak sensory pozostają zanieczyszczone, szczególnie w przypadku THF?

Szczegółowe komentarze i uwagi dotyczące strony językowej i redakcyjnej pracy

1. Paradoksalnie, w pracy napisanej w języku angielskim, najbardziej rzucający się w oczy błąd (ortograficzny!) dotyczy polskiego słowa – choć obcego pochodzenia – „biomolekół”, powtórzonych kilkakrotnie w streszczeniu.
2. Brakuje konsekwencji w nazwach rozdziałów, np. jest „Effect of the polymerization method”, „Selection of resonator size”, a potem „Fluorescent dye”, który to tytuł za dużo nie mówi, choć dotyczy – podobnie jak poprzednie podrozdziały – selekcji, w tym przypadku – barwnika (jednego z ośmiu). Dlatego lepszym tytułem, moim zdaniem, byłby „Selection of fluorescent dye”.
3. Powinno być „eksponencjalny (lub wykładniczy) wzrost” zamiast „ekspotencjalny wzrost”. Na pocieszenie dodam, że jest to często spotykany błąd, nawet w pracach doktorskich. Po angielsku Autor zapisał poprawnie.

4. Ustalony polski termin to „całkowite wewnętrzne odbicie”, a nie „totalne wewnętrzne odbicie”.
5. W kilku miejscach pojawia się „adsorption” zamiast „absorption” (s. 30, 77, 116). Traktuję to jako literówkę, gdyż w zdecydowanej większości przypadków termin „adsorption” jest użyty właściwie.
6. Logarytm współczynnika podziału powinien być zapisany jako $\log P_{ow}$, a nie $\log p_{ow}$ (s. 112).
7. W kilku pozycjach bibliografii nie zostały podane strony artykułów, np. w 1, 2, 4, 6, 225. Dobrym zwyczajem jest również podawanie daty dostępu dla cytowanych stron internetowych (gdy nie ma innego źródła). Strony www podlegają co jakiś czas zmianom adresów, ale są archiwizowane i uwzględniając datę można odnaleźć cytowaną stronę.
8. Zdarzyły się też drobne błędy gramatyczne i niezręczności stylistyczne; na przykład w zdaniu „This remarkable facility their adsorption on the hydrophobic surface of polystyrene forms a stable basis for subsequent layers.” Nie wpływają one jednak na poprawne zrozumienie treści.

Podsumowanie

Przytoczone uchybienia oraz nieścisłości, nie umniejszają znacząco wartości rozprawy, którą oceniam wysoko, jako rzetelnie wykonaną, zarówno pod względem merytorycznym, jak i redakcyjnym. Doktorant zaplanował i wykonał zadania badawcze prowadzące do realizacji postawionego celu, którym było opracowanie wysoce czułych biosensorów Low-Q WGM zdolnych do detekcji różnorodnych cząsteczek, w tym biomolekuł. Uzyskał szereg cennych wyników pomiarowych, wskazujących na wysokie umiejętności eksperymentatorskie, zaś ich interpretacja świadczy o dojrzałości naukowej Autora. Rozprawa doktorska prezentuje wiedzę teoretyczną kandydata z zakresu nauk fizycznych, a także mikro- i nanoinżynierii.

Biorąc pod uwagę powyższą ocenę, stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim przez Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku i wnoszę o dopuszczenie pana mgr. Mateusza Olszynę do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

