

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Olszyna

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

wykonanej w Centrum NanoBioMedycznym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Macieja Wiesnera, Prof. UAM oraz Kopromotora dr hab. Larsa Dähne

W ostatnich latach nasiliło się poszukiwanie innowacyjnych tzw. technologii detekcji bezznacznikowych o zastosowaniu w zakresie technik diagnostycznych. Wśród nich obiecującą technologią okazały się bioczujniki wykorzystujące zjawisko rezonansu optycznego Whispering Gallery Mode (WGM) ze względu na ich wyjątkową czułość. Termin whispering gallery mode (WGM) został po raz pierwszy wprowadzony w celu opisanie krzywoliniowej propagacji fal dźwiękowych. Koncepcja fizyczna została obecnie uogólniona na fale świetlne, które są stale odbijane wzdłuż zamkniętej wklęsłej powierzchni wnęki optycznej, takiej jak szklana mikrosfera. Okrągła ścieżka wewnątrz odbitego światła powoduje konstruktywną interferencję i rezonans optyczny, rezonans zależny od morfologii, który jest odpowiedni do wykrywania interferometrycznego. Rezonatory WGM to miniaturowe mikrointerferometry, które wykorzystują wielokrotne przejścia światła przez wnękę do bardzo czułych pomiarów w mikroskali i nanoskali, w tym pomiarów pojedynczych cząsteczek a nawet jonów. Zastosowania tego zjawiska obejmują na przykład wykrywanie *in vivo* pojedynczych cząsteczek białek czy na przykład monitorowania dynamiki konformacyjnej białek. Zastosowanie tego zjawiska posiada przewagę nad innymi technikami z uwagi na brak konieczności znakowania badanych cząsteczek lub obserwacja zmian w niedostępnych dla innych technik skalach czasowych. Integracja mikrorezonatorów WGM z fluorescencją to ulepszona technologia stanowiąca nowatorskie podejście do wykrywania analitu, wykorzystująca nieodłączne zalety obu technik. Cząsteczki fluorescencyjne, w połączeniu z mikrorezonatorami, wykazują ulepszone właściwości emisji, umożliwiając bardzo czułe wykrywanie niewielkich stężeń analitu i przy niewielkich rozmiarach mikrorezonatora WGM. To synergiczne połączenie otwiera drogę do różnorodnych zastosowań, od diagnostyki biomedycznej po monitorowanie zjawisk zachodzących we wnętrzu komórki. To właśnie zjawisko postanowił

wykorzystać mgr Mateusz Olszyna do zbudowania zaawansowanych optycznych bioczuJNIKÓW bezznacznikowych do detekcji biomarkerów stosowanych w diagnostyce medycznej.

Recenzowana rozprawa doktorska posiada układ typowy dla prac eksperymentalnych z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych. Całość rozprawy obejmuje 129 stron maszynopisu i podzielona jest na 6 głównych rozdziałów (tj. wstęp, przegląd literaturowy, materiały i metody, wyniki i dyskusje, wnioski oraz bibliografia). Rozdziały te poprzedza wykaz skrótów i oznaczeń stosowanych w pracy oraz streszczenia w języku polskim i angielskim, natomiast na końcu pracy znajduje się CV Doktoranta oraz lista jego publikacji i wystąpień konferencyjnych. W pracy umieszczono kilkanaście tabel, kolorowych rysunków, wzorów, wykresów oraz zdjęć, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Spis piśmiennictwa obejmuje 225 pozycji a zdecydowana większość z nich to odniesienia do publikacji z XXI wieku, co świadczy o tym, że podjęty przez Doktoranta temat pracy doktorskiej jest nowatorski oraz cieszy się bardzo dużym zainteresowaniem. Praca doktorska napisana jest w języku angielskim, w sposób poprawny i przystępny. Pod względem edycyjnym praca doktorska została przygotowana bardzo starannie. W pracy znalazłam jedynie drobne niedociągnięcia edycyjne, ale nie miały one wpływu na pełne zrozumienie treści rozprawy.

Szczególną uwagę należy zwrócić na podziękowania, kierowane do współpracowników i rodziny. Ich treść sugeruje, że Doktorant wykonywał część swoich prac poza granicami Polski, a konkretnie w firmie Surffly Nanotec GmbH. Nazwa tej firmy pojawia się kilkakrotnie w dysertacji, co świadczy o jej istotnej roli w procesie realizacji pracy doktorskiej Kandydata.

Rozdział pierwszy, zatytułowany „Wstęp” to jednostronicowe opis pokazujący zalety i wyższość metody WGM nad innymi optycznymi metodami bezznacznikowymi. W mojej ocenie w rozdziale tym Doktorant uzasadnił zasadność stosowania metody WGM w swoich badaniach.

W rozdziale drugim pt. „Przegląd literaturowy”, mgr Olszyna szczegółowo opisał zasady działania diagnostycznych metod bezznacznikowych wykorzystujących zjawiska optyczne tj.: powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR), Elipsometria, interferometria biowarstw (BLI) oraz spektroskopia interferencji reflektometrycznej (RIFS). Choć metody te są powszechnie znane i stosowane od wielu lat, to chciałabym wyrazić uznanie dla opisu tych metod, ponieważ pokazuje on pełne zrozumienie zjawisk optycznych zachodzących w różnych rozwiązaniach diagnostycznych. W kolejnej sekcji tego rozdziału Doktorant omówił podstawowe aspekty fizyczne zjawiska rezonansu WGM, jego historyczne tło oraz porównanie rezonatorów WGM charakteryzujących się wysoką i niską jakością współczynnika Q, szczególnie skupiając się na metodach wprowadzania światła do wewnątrz rezonatora. Bardzo interesującym jest fakt, że pierwotnie Mody Galerii Szeptów zostały zauważone i opisane w kontekście fal dźwiękowych. Pojawienie się tych fal w obiektach o kształcie sferycznym i ich prowadzenie przez zakrzywione powierzchnie ścian takiego obiektu było znane już od drugiej połowy XIX wieku. W 1910 roku Lord Rayleigh przedstawił pierwsze znane opisy tego zjawiska pod kopułą katedry św. Pawła w Londynie. Pokazał, że fala

dźwiękowa prowadzona wzdłuż ściany takiego budynku może być opisana za pomocą funkcji Bessela. Kiedy dźwięk pokonuje drogę wokół budynku, może to prowadzić do konstruktywnej interferencji, co sprawia, że szept staje się dobrze słyszalny nawet na dużej odległości, sięgającej kilkudziesięciu metrów. Jednym z przykładów takiego miejsca w Polsce, które miałam okazję odwiedzić, jest Lublin. Tam znajduje się tzw. "Pokój Szeptów", gdzie wykorzystano specjalną akustykę i konstrukcję sufitu, aby umożliwić przekazywanie dźwięku na znaczną odległość przy minimalnym natężeniu głosu. Doświadczenie to jest niesamowite! Podobno takie pokoje były budowane dla spowiedników w czasie epidemii, aby osoba spowiadająca się i spowiadana mogły komunikować się bez bezpośredniego kontaktu. Przenosząc to zjawisko na mikroskalę i na fale elektromagnetyczne, to okazuje się że wzmocnienie fali jest nadzwyczajnie duże. W trzeciej części rozdziału „Przegląd literaturowy” stanowi opis metody warstwowych pokryć powierzchni polielektrolitami (LbL). Metoda ta polega na nakładaniu kolejnych warstw polimerowych na powierzchnię poprzez naprzemienny proces adsorpcji polielektrolitów z roztworów wodnych. Proces ten polega na zmianie ładunku powierzchni poprzez absorpcję warstw polielektrolitów o przeciwnych ładunkach elektrycznych, co prowadzi do utworzenia cienkiej warstwy polimerowej. Dzięki tej metodzie można kontrolować właściwości powierzchni, takie jak hydrofobowość, przewodność elektryczna czy zdolność do adsorpcji substancji chemicznych. Doktorant wykorzystywał tę metodę podczas konstrukcji swoich mikroczytników WGM. Należy podkreślić, że materiał zawarty we wstępie teoretycznym jest poparty bogatą literaturą naukową (182 odnośniki literaturowe) oraz liczne schematy i rysunki. Pokazuje również doskonałe przygotowanie teoretyczne Doktoranta w zakresie różnych, beznacznikowych technik diagnostycznych.

Celem badawczym recenzowanej pracy było **opracowanie i charakterystyka mikroczytników WGM o niskim współczynniku Q (low-Q WGM), które mogą być skutecznie wykorzystane w beznacznikowej detekcji wybranych biomolekuł**. Sformułowany cel pracy doktorskiej znalazłam dopiero w ostatnim rozdziale pracy doktorskiej pt.: „Wnioski”. Celem pracy doktorskiej było zbadanie wpływu różnych parametrów (takich jak rodzaj materiału rezonatora, typ polimeryzacji, rozmiar rezonatora, rodzaj i rozkład znacznika fluorescencyjnego oraz technika funkcjonalizacji powierzchni) na jakość sygnału WGM oraz wydajność detekcji. Autor skupił się na detekcji białek za pomocą układu biotylna-streptawidyna.

Następny rozdział pracy doktorskiej, zatytułowany „Materiały i metody”, został przez Doktoranta podzielony na dwa główne podrozdziały. W pierwszym z nich wymienił i opisał zastosowane przez siebie materiały. Należy nadmienić, że część polielektrolitów znakowanych fluoroforami Doktorant otrzymał samodzielnie, stosując standardowe metody chemii organicznej. Polikation C343-PAH został wyznakowany kumaryną 343, polikation Rho-PAH został wyznakowany rodaminą a polianion PMAA-biotin został wyznakowany biotyną. Czy dla otrzymanych polimerów wykonane zostały widma IR lub NMR przed i po modyfikacji? Czy sprawdzano stopień osadzenia barwników na polimerze za pomocą metod analitycznych (np. hydroliza i analiza produktów

hydrolizy)? W drugim podrozdziale mgr Olszyna opisał wszystkie stosowane przez siebie metody fizykochemiczne wraz z krótkim opisem metody oraz podając szczegóły pomiarowe i nazwy aparatów. Należały do nich następujące metody: (i) spektroskopia UV-Vis; (ii) spektroskopia fluorescencyjna; (iii) mikroskopia skaningowa z użyciem lasera konfokalnego; (iv) metoda centrifugacji dyskowej; (v) rezonans optyczny Whispering Gallery Mode wraz ze szczegółowym opisem budowy i działania aparatu oraz chipów mikrofluidycznych służących do przechowywania i kontrolowania pozycji mikroczujników WGM podczas pomiaru; (vi) mikrowaga kwarcowa; (vii) powierzchniowy rezonans plazmonowy; (viii) test HABA. Zabrakło jedynie informacji o technikach AFM i SEM, które były stosowane w trakcie badań.

W kolejnym podrozdziale zatytułowanym „Wyniki i dyskusja” Doktorant przedstawił wyniki badań w dwóch głównych podrozdziałach. Pierwszy podrozdział koncentrował się na analizie, jak poszczególne właściwości nowo zsyntetyzowanych czujników o niskim Q wpływają na jakość, czułość i efektywność sygnału WGM. Na początku Doktorant badał wpływ rodzaju materiału z którego wykonane były rezonatory. Do tego celu Kandydat przetestował następujące materiały: polistyren (PS), melamina-formaldehyd (MF), polimetakrylan metylu (PMMA), szkło borokrzemowe (BG) oraz krzemionkę (SiO_2). Najlepszym materiałem okazał się polistyren, gdyż charakteryzował się wysoką intensywnością oraz jakością sygnału WGM oraz wysokim współczynnikiem załamania światła. Zdjęcia AFM i SEM mikrokulek polistyrenowych pokazały również, że posiadają one idealną kulistość oraz gładkość. Kolejnym parametrem który badał Doktorant był wpływ sposobu polimeryzacji na jakość sygnału WGM. Doktorant testował metody polimeryzacji dyspersyjnej, polimeryzacji spęczniania oraz polimeryzacji emulsyjnej. Najlepszą metodą okazała się technika polimeryzacji spęczniania, ze względu na możliwość uzyskania mikrokulek o kontrolowanej wielkości. Kolejnym parametrem który był badany przez Doktoranta to wielkość mikrorezonatorów WGM. Okazało się, że ten parametr jest również ważny, gdyż średnica wynosząca powyżej 11 μm powoduje pojawienie się dodatkowych pików interferencyjnych. Ostatnim czynnikiem który mógł mieć znaczenie dla jakości sygnału WGM to rodzaj fluorofora oraz jego dystrybucja wewnątrz struktury rezonatora. Pan Olszyna zbadał osiem różnych fluoroforów z tym, że dwa z nich (nierozpuszczalne w wodzie) zostały zaincorporowane do mikrokulek PS, zaś pozostałe (rozpuszczalne w wodzie) do mikrokulek zbudowanych z MF. Badania te pokazały, że najlepszym fluoroforem jest Kumaryna 6, gdyż najlepiej zwiększa czułość detekcji sygnału. W przypadku zastosowania powierzchniowego powlekania mikrokulek techniką LbL, polielektrolitem z przyłączonym fluoroforem okazało się, że Kumaryna 343 pozwala na zmniejszenie wielkości sygnału tła fluorescencji. Kolejnym czynnikiem który postanowił zbadać Doktorant to wpływ ilości warstw polielektrolitów, znajdujących się na powierzchni mikrorezonatorów Low-Q WGM, na jakość sygnału WGM. Doktorant pokazał, że istnieje zależność pomiędzy ilością warstw LbL a intensywnością i jakością sygnału WGM. Czy warstwy polielektrolitowe właściwie przylegały (adhezja) do mikrokulek PS? Czy w jakiś sposób było to

sprawdzone? Dodatkowo pokazał, pozytywną zależność pomiędzy grubością warstwy LbL a stężeniem soli w roztworze polielektrolitu. Na zakończenie podrozdziału pierwszego zbadał wpływ temperatury na czułość pomiaru WGM. Okazało się, że w przeciwieństwie do innych metod optycznych, mikrorezonatory Low-Q WGM charakteryzują się bardzo niską czułością na zmiany temperatury. Wiadomo jednak, że niektóre polimery mogą być mniej stabilne termicznie lub chemicznie, co może prowadzić do degradacji mikrorezonatorów pod wpływem warunków pracy. Czy Doktorant zaobserwował jakiegokolwiek stopień degradacji polistyrenu? W jaki sposób podczas pomiarów zapewniono brak wibracji, co może mieć duże znaczenie dla pomiaru rezonansu WGM? Wyniki badań, przedstawione w pierwszej części rozdziału "Wyniki i dyskusja", zostały opisane w artykule i opublikowane w czasopiśmie *Adv. Func. Mater.*, którego pierwszym autorem jest mgr Mateusz Olszyna. Świadczy to o jego dużym udziale w badaniach oraz istotnym wkładzie w przygotowanie manuskryptu. Wyniki przeszły już proces recenzji w czasopiśmie co wyraża recenzentowi „pytania”. Mam jedno tylko pytanie: Dlaczego w powyżej opisanych badaniach optymalizacyjnych nie zawsze badane były wszystkie materiały z których wykonane były rezonatory?

W drugiej części rozdziału „Wyniki i dyskusja”, Doktorant opisał praktyczne zastosowanie wybranych fluorescencyjnych mikrorezonatorów Low-Q-WGM do identyfikacji bezznacznikowej. Do tego celu Doktorant przygotował i w pełni scharakteryzował mikrorezonatory pokryte pięcioma warstwami polielektrolitów. W dalszej części pracy doktorskiej mgr Olszyna zbadał niespecyficzne oddziaływania lizozymu (wypadkowy ładunek ujemny) z polielektrolitem (dodatnio naładowany) metodami WGM, SPR i QCM. Najbardziej czułymi metodami okazały się mikrorezonatory WGM oraz QCM. Wadą pomiarów WGM okazała się bardzo wolna kinetyka wiązania lizozymu, co w opinii Doktoranta było spowodowane ograniczeniami układu mikroprzepływowego (wolniejsza dyfuzja). Czy w opinii Doktoranta metoda pomiaru WGM nadaje się do badania oddziaływań niespecyficznych? W tym miejscu proszę również Doktoranta o wyjaśnienie, dlaczego należy używać mikrofluidycznych chipów do przechowywania mikrorezonatorów WGM? Następnym zadaniem podjętym przez Doktoranta było zbadanie niezwykle silnych oddziaływań specyficznych dla układu, w którym na powierzchni mikrorezonatora Low-Q WGM znajdowała się warstwa polielektrolitu modyfikowanego biotyną (PAH-biotyna lub PMAA-biotyna). Doktorant badał najpierw oddziaływania biotyna-streptawidyna a następnie streptawidyna-przeciwciało. Doktorant pokazał, że metoda WGM daje porównywalne wyniki do techniki SPR i QCM i porównywalnej granicy wykrywalności wynoszący 0,2 nM. Jestem pod dużym wrażeniem doskonałych wyników uzyskanych przez Doktoranta. Jestem również ciekawa, czy dla układów o wyższej wartości KD (np. na poziomie mikromoli na liter) można uzyskać równie eleganckie i powtarzalne wyniki, wykorzystując metodę WGM. Czy Doktorant testował takie układy? Ostatnim przykładem praktycznego zastosowania mikrorezonatorów WGM były badania nad analizą czystości wody. Mgr Olszyna udowodnił, że mikrorezonatory WGM mogą być również skutecznie stosowane do analizy

zanieczyszczeń wody rozpuszczalnikami organicznymi. Czy podczas tego typu analiz (np. badania środowiskowe lub żywnościowe) istnieje ryzyko, że mikrorezonatory WGM ulegną zniekształceniu lub rozkładowi?

Lektura rozdziału „Wyniki i dyskusja” pokazuje bardzo dużą dojrzałość naukową Doktoranta, gdyż wszystkie uzyskane wyniki zostały gruntownie przedyskutowane w świetle opublikowanych wcześniej badań literaturowych. Szczególnie podobają mi się badania praktycznego wykorzystania mikrorezonatorów WGM do monitorowania oddziaływań międzycząsteczkowych w czasie rzeczywistym. Ostatni rozdział pracy doktorskiej, zatytułowany „Wnioski” zawiera krótkie zestawienie uzyskanych wyników pracy doktorskiej.

Na zakończenie recenzji warto podkreślić, że p. Mateusz Olszyna jest współautorem czterech publikacji naukowych w czasopismach z listy JCR. Jedną z tych publikacji to materiał opisany w pracy doktorskiej (*Adv. Func. Mater.*, 2018). Doktorant brał także aktywny udział w prezentowaniu wyników naukowych w formie doniesień podczas ośmiu konferencji a także uczestniczył w realizacji swoich badań we współpracy z firmą zagraniczną.

Uważam, że tematyka pracy doktorskiej jest bardzo interesująca i niezwykle potrzebna w świetle poszukiwań czułych, tanich i beznacznikowych technologii do badania oddziaływań międzycząsteczkowych. Część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki doskonale przedyskutowane i zinterpretowane. Rozprawa doktorska magistra Mateusza Olszyny zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Fizyczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Mateusza Olszynę do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne.

Ponadto, mając na względzie wkład pracy Doktoranta w uzyskanie nowych w skali światowej wyników badań, dotyczących otrzymania i pełnej charakterystyki nowych i skutecznych mikrorezonatorów Low-Q WGM do badania oddziaływań międzycząsteczkowych, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

