



Prof. dr hab. Jarosław Sączewski
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
Al. Gen. Hallera 107, 80-416 Gdańsk,
tel. 58-349-16-48, e-mail: js@gumed.edu.pl

Gdańsk, dn. 23. 11. 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana Mateusza Olszyny „Development and application of fluorescent microsensors for new label-free detection method based on Low-Q Whispering Gallery Modes” wykonanej w niemieckim przedsiębiorstwie Surflay Nanotec GmbH z Berlina pod kierunkiem dra Larsa Dähne oraz prof. Stefana Jurgi i dra hab. Macieja Wiesnera z Centrum NanoBioMedycznego Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Pan Mateusz Olszyna jest absolwentem Technikum Ekonomicznego w Kaliszu oraz Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Wydział Biotechnologii. Jeszcze podczas studiów Doktorant odbył staże w Instytucie Maxa Plancka w Berlinie oraz Klinice Dermatologii Onkologicznej Uniwersytetu w Tybindze. Po ukończeniu studiów podjął pracę w przedsiębiorstwie Surflay Nanotec GmbH z Berlina, gdzie zrealizował badania będące przedmiotem ocenianej pracy doktorskiej. Kręta i wymagająca droga rozwoju zawodowego Pana Mateusza Olszyny świadczy o jego ambicji i determinacji w realizacji celów życiowych i zawodowych. Przedstawiona do oceny praca doktorska jest również ambitna i złożona, ponieważ Autor podczas realizacji badań wykorzystywał narzędzia badawcze charakterystyczne dla nauk przyrodniczych: biologii, chemii i fizyki. Celem jaki sobie postawił było opracowanie (bio)czujników opartych na Optycznych Rezonansach Modów Galerii Szeptów (ang. Whispering Gallery Modes, WGMs).

Praca doktorska została zaprezentowana w czterech artykułach opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych: *The European Physical Journal Special Topics* (Springer, IF = 1,399 (2014)), *Colloid and Polymer Science* (Springer, IF = 1,890 (2015)), *Advanced Functional Materials* (Wiley, IF = 15,621) oraz *Sensors* (MDPI, IF = 3,275 (2019)). Łączna wartość punktacji impact factor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 22,185. W najlepiej punktowanej publikacji Doktorant jest pierwszym autorem, natomiast w dwóch pracach opublikowanych przez wydawnictwo Springer drugim. Pan Mateusz Olszyna prezentował wyniki badań będące przedmiotem rozprawy na ośmiu międzynarodowych konferencjach naukowych. Właściwa rozprawa doktorska jest napisana w języku angielskim i ma

kompozycję klasyczną, tj. zawiera wyczerpujące wprowadzenie teoretyczne w tematykę badawczą oraz obszerną dyskusję uzyskanych wyników. Rozprawa doktorska obejmuje 126 stron i opiera się na 225 pozycjach literaturowych.

Historia badań nad mikrometrowymi bioczuJNIkami wykorzystującymi zjawisko optycznego rezonansu Whispering Gallery Mode (WGM) nie jest długa, ponieważ pierwszą pracą naukową opisującą tę aplikację opublikowano w połowie lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku. Pan Mateusz Olszyna w swojej rozprawie doktorskiej bardzo dokładnie i rzeczowo wprowadza czytelnika w podjęte zagadnienia, zaczynając od beznacznikowych systemów bioczuJNIków wykorzystujących mechanizm przetwornika optycznego, takich jak rezonans plazmonowy, interferometria biowarstw i spektroskopia interferencji reflektometrycznej. W dalszej części pracy przedstawiono fizyczne podstawy optycznego rezonansu oraz parametry charakteryzujące wydajność tego procesu, takie jak atrybut Q. Celem przedstawionej pracy doktorskiej było opracowanie fluorescencyjnych mikrorezonatorów WGM oraz ich wykorzystanie w beznacznikowej analizie biochemicznej. Zaproponowano małe polimerowe rezonatory o średnicy około 10 μm , ponieważ taki rozmiar cząstek warunkuje względnie duże przesunięcia rezonansowe w odpowiedzi na zmianę średnicy rezonatora. Przeprowadzone badania obejmowały syntezę, charakterystykę fizykochemiczną oraz optymalizację bioczuJNIków. Zakres przedstawionych badań jest imponujący i obejmuje techniki takie jak synteza mikrocząstek, sprzężanie chemiczne, warstwowe pokrywanie powierzchni polielektrolitami, laserową mikroskopię konfokalną, spektroskopię UV-VIS, fluorymetrię, gradientową separację cząstek - wirowanie dyskowe CPS, wykorzystanie aparatury WGM, zastosowanie kwarcowego przetwornika piezoelektrycznego typu mikrowaga kwarcowa (QCM), oraz wykorzystanie opracowanych bioczuJNIków do badania oddziaływań biotyny z streptawidyną i wykrywania zanieczyszczeń organicznych w wodzie.

Należy podkreślić, że założone cele badawcze zostały osiągnięte. Zoptymalizowane fluorescencyjne mikrorezonatory polistyrenowe znakowane kumarynami charakteryzują się dobrej jakości sygnałem rezonansowym WGM oraz małą wrażliwością na zmiany temperatury, a ich potencjał aplikacyjny potwierdzono w badaniach obejmujących wykrywanie streptawidyny oraz rozpuszczalników organicznych, takich jak tetrahydrofuran, aceton i toluen.

Praca jest napisana niezwykle starannie jednak Autorowi nie udało ustrzec się drobnych błędów.

Strona 8: „MF melaminę formaldehyde” – właściwszy byłby termin „melamine resin” albo „melamine formaldehyde resin”.

Strona 26: Podpis pod ryciną nr 9 „Adapted from []” – brak numeru odnośnika.

Strona 44: “Different polycations with defined fluorescent dyes and variable label degrees were self-synthesized.” – zastosowanie określenia “self-synthesized” w stosunku do wieloetapowej reakcji wymagającej aktywnego udziału operatora-specjalisty raczej nie jest właściwe. „rhodamin-B-isothiocyanate” zamiast „rhodamine-B-isothiocyanate”.

Strona 45: „were covalent coupled” zamiast „were covalently coupled”.

Strona 46: "biotin-amine" – właściwiej byłoby "biotin-ethylenediamine", "biotin-EDA" lub „N-(2-aminoetylo)-5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oksaheksahydro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamid”.

Strona 48: "aromatic solvent phase" – mieszanina chloroformu i 2-propanolu nie jest aromatyczna (brak sekstetu elektronowego warunkującego aromatyczność związku chemicznego).

Strona 60: „4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid (HABA) was used to quick determination the label-degree of” poprawniej byłoby „4'-Hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid (HABA) was used to quickly determine the label-degree of”. "To calculation" zamiast "to calculate".

Strona 63: Tabela 5. "PS" zamiast "PSS".

Strona 72: „independecne" zamiast „in dependence”.

Strona 73: "deterioration of the WGMs quality can also be caused by shortens the free spectral range and" – niezrozumiałe dla recenzenta zdanie, być może "shortening of the spectral range"?

Strona 79: "Although the shift is not influenced by the bleaching, the WGM signal intensity becomes lower and the signal/noise ratio is increasing." - raczej "decreasing".

Strona 105 "This remarkable facility their adsorption on the hydrophobic surface of polystyrene forms a stable basis for subsequent layers." zamiast "This remarkably facilitates their adsorption on the hydrophobic surface of polystyrene and forms a stable basis for subsequent layers"

Powyżej wymienione błędy nie wpływają na bardzo wysoką merytoryczną, edytorską i narracyjną jakość przedstawionej do oceny pracy. Opanowanie specjalistycznej terminologii w językach polskim, niemieckim i angielskim wymagało od Autora dodatkowego wysiłku, co należy podkreślić i docenić.

Przedstawione w omawianej rozprawie doktorskiej wyniki badań nad mikrometrowymi, kulistymi bioczunikami wykorzystującymi zjawisko optycznego rezonansu Whispering Gallery Mode (WGM) w celu transformacji sygnału biochemicznego na elektromagnetyczny przedstawione są w sposób wyczerpujący i niewątpliwie wpisują się w kilkudziesięcioletni nurt badań nad tym zagadnieniem. Lektura pracy, inspirująca dla recenzenta, skłania do zadania Autorowi następujących pytań:

1. Dlaczego stosując wzbudzenie laserowe 405 nm wybrano barwniki posiadające maksima absorpcji przy 440 nm i więcej? Czy nie lepiej byłoby zastosować np. barwniki wykazujące maksima absorpcji około lub poniżej 405 nm? Być może w takiej sytuacji barwniki byłby odporniejsze na fotowysielanie? Np. Benzo-kumaryna: 400 nm lub 420 nm, 7-(dimetyloamino)-4-metylokumaryna: 366 nm - związki te powinny rozpuszczać się w chloroformie, a zwłaszcza ten ostatni.
2. Dlaczego w pracy nie przedstawiono dyskusji na temat mocy zastosowanego lasera wzbudzającego? Parametr Q, który określa skumulowaną energię rezonatora, zależy od mocy wzbudzenia i warunkuje intensywność sygnału WGM (DOI: 10.1063/1.4905931).
3. Barwniki uznane za najlepsze dla zastosowań WGM, czyli kumaryna 6 i kumaryna 343 charakteryzują się względnie dużymi przesunięciami Stokesa (około 30 nm) oraz małą masą cząsteczkową (liczbą elektronów oraz poziomów oscylacyjnych). Fluorofory te posiadają dwa skondensowane pierścienie aromatyczne, które warunkują względnie wąskie pasma absorpcji i emisji w porównaniu do barwników takich jak fluoresceina i

rodamina. Barwniki wielopierścieniowe z uwagi na bardziej złożoną strukturę elektronową wykazują szerokie pasma absorpcji i emisji. Autor rozprawy podkreśla, że widmo WGM zależy bezpośrednio od maksymalnej długości fali emisji fluoroforu zawartego w cząstce. Można zatem zadać pytanie czy znane są jakieś wyniki badań wskazujące na powiązanie szerokości pasma emisji z jakością sygnału WGM? Zdaniem recenzenta, najlepszymi fluoroforami dla zastosowań WGM mikrocząstek o niskim Q są związki charakteryzujące się wąskim pasmem emisji, co warunkuje wysoki stosunek sygnału do szumu. Fluoroforami o takiej charakterystyce są np. kropki kwantowe, kumaryny, BODIPY oraz barwniki i cyjaninowe, przy czym te ostatnie z uwagi na pasma emisji w zakresie promieniowania podczerwonego wymagałyby zastosowania większych rezonatorów. W tym miejscu należy zaznaczyć, że wydajność kwantowa barwnika określana jest w odniesieniu do całego zakresu fluorescencji, a nie długości fali odpowiadającej maksimum emisji. Z tego powodu, zdaniem recenzenta, przydatność tego parametru do oceny aplikacyjności barwnika w zastosowaniach WGM jest raczej ograniczona.

4. Poza współczynnikiem załamania światła wielkością charakteryzującą dany materiał w zastosowaniach optycznych jest dyspersja, która w optyce kwantyfikowana jest liczbą Abbego. Parametr ten opisuje zdolność materiału, najczęściej soczewki, do rozszczepiania wiązki światła białego. Oznacza to, że światło niebieskie i czerwone jest trochę inaczej załamywane. W wielu miejscach rozprawy doktorskiej Autor odnosi się do znanych wartości współczynników załamania światła badanych polimerów, takich jak polistyren czy szkło borokrzemowe. W rozdziale 4.1.1.2 zatytułowanym *Wpływ współczynnika załamania światła na jakość sygnału WGM* (Effect of microresonator's RI on WGM performance) wykazano, że współczynniki załamania światła wyliczone na podstawie eksperymentów WGM są niższe niż te oznaczone dla „surowego” polimeru. Stąd rodzi się pytanie: czy obserwowane różnice mogą wynikać z małej liczby Abbego polimerowej kulistej soczewki?

5. W rozdziale 4.1.3 przedstawiono wyniki badań, na podstawie których ustalono optymalną wielkość rezonatora w odniesieniu do danego materiału polimerowego. Niestety nie podano który z barwników wykorzystano w tych badaniach. Zdaniem recenzenta optymalna wielkość cząstek powinna różnić się z zależności od zastosowanego barwnika, ponieważ każdy z przebadanych barwników charakteryzuje się inną długością (energiją) maksymalnej emisji.

6. Popuszczając nieco wodze fantazji, recenzent chciałby zapytać Kandydata, czy jest możliwe jednoczesne zastosowanie dwóch lub więcej barwników (różniących się maksimum emisji o około 10 nm) w jednym mikrorezonatorze? Być może zastosowanie równomolarnej mieszaniny barwników umożliwiłoby oszacowanie przydatności większej liczby barwników oraz opracowanie lepszych i wydajniejszych czujników.

Przedstawioną do oceny pracę oceniam jako wybitną i wnoszę o jej wyróżnienie z uwagi na złożoność podjętego tematu badawczego oraz wysoką jakość przedłożonej rozprawy doktorskiej. Dysertacja spełnia wymagania Ustawodawcy, prezentuje zarówno aspekt poznawczy jak i praktyczny, wobec tego wnoszę o dopuszczenie Pana mgra Mateusza Olszyny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.