



Bydgoszcz, 22 maja 2026

dr hab. inż. Beata Jędrzejewska, prof. PBS

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agaty Hajdy zatytułowanej „Nowe znaczniki fluorescencyjne do mikroskopii jedno- i dwufotonowej ze szczególnym uwzględnieniem wykrywania amyloidów”.

Podstawę formalną do opracowania niniejszej recenzji stanowi pismo dr hab. inż. Roberta Góry, prof. uczelni, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej z dnia 19 marca 2026 r. z prośbą o opracowanie opinii wspomnianej powyżej rozprawy doktorskiej zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne PWr, która na posiedzeniu zdalnym w dniu 18 marca 2026 r. powołała mnie na recenzenta i na członka komisji doktorskiej w tym postępowaniu.

Podstawowe informacje o recenzowanej rozprawie doktorskiej

Przedłożona do oceny rozprawa Pani mgr inż. Agaty Hajdy, stanowiąca podstawę w procedurze uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne, została wykonana w Instytucie Materiałów Zaawansowanych na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod opieką promotora Pani dr hab. inż. Joanny Olesiak-Bańskiej, prof. uczelni. Ma ona formę spójnego tematycznie cyklu trzech wieloautorskich artykułów opublikowanych w latach 2023-2025 w czasopismach naukowych z wykazu ministerialnego o wysokim współczynniku oddziaływania IF, tj.: *ACS Applied Bio Materials* (IF: 4.7), *Chemical Communications* (IF: 4.2) i *Chemical Science* (IF: 7.5). Całkowita liczba cytowań tych artykułów na dzień 16 kwietnia 2026 r. wg bazy Scopus wynosi 21, a sumaryczne punkty MNIŚW – 420. Indywidualny wkład kandydatki określony w oparciu o przedłożone oświadczenia jest znaczący i dotyczy opracowania koncepcji badań i ich realizacji oraz analizy i opisu otrzymanych wyników. Ponadto Pani mgr Agata Hajda w każdej z tych prac jest pierwszym autorem.

Z formalnego punktu widzenia przedłożona do oceny rozprawa doktorska to przewodnik po opublikowanych artykułach, który zawiera wykaz publikacji naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz pozostałych publikacji, spis treści, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku angielskim i polskim, wprowadzenie teoretyczne obejmujące główne hipotezy badawcze i cele pracy wraz z przeglądem literatury i uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej, omówienie wyników badań – przewodnik po

publikacjach, podsumowanie oraz spis cytowanej literatury (227 pozycji). Ponadto w części rozprawy „Opis badań własnych” umieszczone są oświadczenia autorki i teksty artykułów naukowych wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej wraz z suplementami. W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska jest kompletna i logiczna, a jej układ – prawidłowy.

Do pracy został załączony także wykaz pozostałych artykułów naukowych Doktorantki, spełniający rolę informacyjną. Ich analiza wskazuje, że na całkowity dorobek naukowy Pani mgr inż. Agaty Hajdy składa się 9 artykułów opublikowanych zgodnie z listą MNiSW w czasopiśmie za 200 (3 prace), 140 (2 prac), 100 (2 prace) i 20 (2 prace) punktów i sumarycznym IF wynoszącym 52,7. Prace te były łącznie cytowane 41 razy wg bazy Scopus (dane na dzień 16.04.2026), indeks Hirscha – 4, co jest bardzo dobrym wynikiem na tym etapie kariery. Autorka dysertacji jednak nie podaje informacji o pozostałym dorobku naukowym.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agaty Hajdy dotyczy projektowania i charakterystyki nowych znaczników fluorescencyjnych do obrazowania amyloidów, co stanowi zagadnienie o istotnym znaczeniu zarówno poznawczym, jak i aplikacyjnym. Amyloidy są kluczowe w patogenezie wielu chorób neurodegeneracyjnych, a rozwój metod ich detekcji, zwłaszcza z wykorzystaniem mikroskopii dwufotonowej, należy do aktualnych i dynamicznie rozwijających się kierunków badań.

W pracy podjęto problem projektowania fluoroforów o zoptymalizowanych właściwościach jedno- i dwufotonowych, co jak wynika z przedstawionych publikacji, wymaga jednoczesnej kontroli wielu parametrów fotofizycznych m.in. wydajności kwantowej fluorescencji (FQY), przekrojów czynnych na absorpcję dwufotonową (σ_2) oraz wpływu środowiska. Tematyka rozprawy jest zatem aktualna, ważna i dobrze osadzona w światowym nurcie badań nad bioobrazowaniem.

Przedłożony autoreferat rozpoczyna krótkie wprowadzenie dotyczące fluoroforów, po którym Doktoranta formułuje w prosty i przejrzysty sposób trzy główne hipotezy oraz cele badawcze wraz z racjonalnym uzasadnieniem wyboru realizowanej tematyki.

W Rozdziale II, obejmującym trzy podrozdziały tematyczne, Autorka omawia zagadnienia związane z procesami nieliniowymi, fluoroforami stosowanymi w dwufotonowej mikroskopii fluorescencyjnej (2PFM) oraz amyloidami. Rozdział ten został opracowany na podstawie przeglądu literatury w sposób logiczny, spójny i świadczący o wysokich kompetencjach badawczych.

W pierwszym podrozdziale Doktorantka opisuje podstawy teoretyczne absorpcji dwufotonowej (2PA) oraz jej wykorzystanie w dwufotonowej mikroskopii fluorescencyjnej (2PFM), ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia tego zjawiska w badaniach biologicznych. Szczególną uwagę poświęca analizie diagramów energetycznych oraz reguł

wyboru dla cząsteczek centrosymetrycznych i niecentrosymetrycznych, co prowadzi do wniosków dotyczących efektywności absorpcji dwufotonowej w różnych typach chromoforów (np. układy kwadrupolowe vs dipolowe). Następnie przechodzi do charakterystyki mikroskopii fluorescencyjnej, porównując techniki jedno- i dwufotonowe, ze wskazaniem przewag 2PFM, takich jak głębsza penetracja próbki, mniejsza fototoksyczność oraz lepsze obrazowanie 3D. W kontekście aplikacyjnym podkreśla znaczenie 2PFM w badaniach biologicznych, szczególnie w neurobiologii i badaniach nad chorobami neurodegeneracyjnymi.

W kolejnym podrozdziale Doktoranta omawia zasady projektowania dwufotonowych fluoroforów oraz ich ograniczenia w zastosowaniach biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem zależności między strukturą molekularną (układy donor-akceptor, sprzężenie π -elektronowe, transfer ładunku) a właściwościami fotofizycznymi. Zwraca uwagę na brak prostych korelacji między właściwościami jedno- i dwufotonowymi oraz na trudności w ich przewidywaniu teoretycznym. Szczególną uwagę poświęca układom zawierającym fragment BF_2 , w tym barwnikom typu BODIPY jako szczególnie obiecującym fluoroforom o wysokich wartościach σ_2 i FQY. Podrozdział kończy krytyczną analizą ograniczeń klasycznych małocząsteczkowych fluoroforów organicznych, wskazując na trudność jednoczesnej optymalizacji trzech kluczowych cech: absorpcji dwufotonowej, emisji w zakresie NIR oraz rozpuszczalności w wodzie. Jako alternatywę wskazuje wykorzystanie jako sondy fluorescencyjne nanoklastrów srebra stabilizowanych oligonukleotydami DNA (Ag_N -DNA).

Stan wiedzy na temat struktury, syntezy, metod charakterystyki oraz przede wszystkim właściwości optycznych i fotofizycznych tych układów, ze szczególnym uwzględnieniem zależności między sekwencją DNA a właściwościami emisyjnymi nanoklastrów opisuje w uporządkowany sposób w kolejnym podrozdziale. Z perspektywy aplikacyjnej, uzasadnia potrzebę dalszych badań nad dwufotonową absorpcją (2PA) nanoklastrów srebra stabilizowanych oligonukleotydami DNA, wskazując na ich potencjalną przewagę nad innymi nanoklastrami (m.in. dzięki rozpuszczalności w wodzie i wysokiej wydajności kwantowej fluorescencji w zakresie NIR).

Omówienie istniejącego stanu wiedzy kończy podrozdział dotyczący amyloidów, ich struktury, mechanizmów powstawania, znaczenia biologicznego i chorobowego, ze szczególnym naciskiem na metody ich detekcji z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych, w tym przeznaczonych do mikroskopii dwufotonowej. Szczególnie ważne jest podkreślenie polimorfizmu amyloidów i jego konsekwencji biologicznych oraz analitycznych (różne odpowiedzi biologiczne, trudności w projektowaniu sond).

Najbardziej wartościowy, z perspektywy oceny naukowej pracy, jest fragment dotyczący dwufotonowych sond fluorescencyjnych do detekcji amyloidów. Autorka nie tylko systematyzuje istniejące rozwiązania, ale również krytycznie analizuje literaturę, wskazując

na brak kompletnych danych fotofizycznych (σ_2 , FQY) dla wielu sond, niedostateczne zrozumienie zależności struktura-właściwości dwufotonowe-wiązanie z amyloidami, i praktyczny brak badań zmian właściwości dwufotonowych po związaniu sondy z włóknem białkowym.

Podsumowując Rozdział II stanowi solidną podstawę teoretyczną dla badań własnych przedstawionych w dalszej części dysertacji. Omówione zagadnienia świadczą o dobrym osadzeniu pracy w aktualnych trendach badań nad zaawansowanymi fluoroforami oraz o krytycznym podejściu Autorki do danych literaturowych i umiejętności identyfikacji nierozwiązanych problemów. Jest to dobrze opracowana i krytyczna część autoreferatu, precyzyjnie definiująca nisze badawcze, których wskazanie jest szczególnie istotne, ponieważ bezpośrednio uzasadnia wybór problematyki badawczej i pokazuje jej potencjalny wkład w rozwój dyscypliny.

W ostatniej części dysertacji Doktorantka przedstawia syntetyczny opis uzyskanych wyników badań wraz z ich dyskusją i podsumowaniem. Pierwsza z prac opublikowana w ACS Applied Bio Materials (ACS Appl. Bio Mater. 2023, 6, 5676–5684) stanowi spójne i dobrze zaprojektowane studium zależności pomiędzy strukturą chemiczną pochodnych benzotiazolu funkcjonalizowanych grupą difluoroborową (BF_2) a ich właściwościami fotofizycznymi w kontekście oddziaływań z amyloidami. Autorka wybrała trzy reprezentatywne barwniki typu push-pull (DA, AD, DAD), które różnią się lokalizacją grup donorowych. Pozwoliło to na pogłębioną analizę wpływu struktury elektronowej na czułość fluorescencji względem parametrów środowiskowych, takich jak lepkość, polarność czy tworzenie wiązań wodorowych. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że charakter odpowiedzi fluorescencyjnej może być precyzyjnie kontrolowany poprzez odpowiednie rozmieszczenie grup funkcyjnych, co ma istotne znaczenie dla projektowania selektywnych sond biologicznych.

Istotnym atutem pracy jest przejście od badań w modelowych rozpuszczalnikach do bardziej złożonych układów biologicznych, jakimi są fibryle amyloidowe insuliny bydlęcej (BI) oraz lizozymu białka jaja kurzego (HEWL). Doktorantka wykazała, że trendy obserwowane w prostych układach (glicerol, CHCl_3) w dużej mierze odtwarzają zachowanie fluoroforów po związaniu z amyloidami, co potwierdza trafność zastosowanych modeli środowiskowych. Jednocześnie zidentyfikowała subtelne różnice wynikające ze specyfiki mikrośrodowiska białkowego, takie jak wygaszanie fluorescencji w obecności reszt tryptofanowych w HEWL, co świadczy o krytycznym i pogłębionym podejściu do interpretacji wyników. Na uwagę zasługuje również kompleksowa analiza parametrów kinetycznych emisji, w tym czasów życia fluorescencji oraz stałych szybkości procesów promienistych i bezpromienistych. Wykazanie zależności tych parametrów od lokalizacji grup donorowych stanowi cenny wkład w zrozumienie mechanizmów deaktywacji stanów wzbudzonych w tego typu układach.

Za szczególnie wartościowy element pracy należy uznać badania właściwości dwufotonowych (2PA) fluoroforów przed i po związaniu z amyloidami. Doktorantka wykazała, że przekrój czynny na absorpcję dwufotonową (σ_2) ulega istotnej zmianie w zależności od środowiska oraz struktury cząsteczki. Choć uzyskane wartości σ_2 są relatywnie niskie, Autorka trafnie identyfikuje przyczynę (słabe właściwości donorowe podstawników) i wskazuje kierunki dalszej optymalizacji strukturalnej.

Podsumowując, omawiane osiągnięcie cechuje się wysokim poziomem oryginalności, spójnością koncepcji badawczej oraz właściwym doбором metod eksperymentalnych. Doktorantka potwierdziła postawione hipotezy badawcze oraz dostarczyła istotnych wskazówek dotyczących projektowania nowych sond fluorescencyjnych do detekcji amyloidów, w tym także w kontekście technik dwufotonowych. Uwagi krytyczne to brak pogłębionej analizy mechanizmu wiązania fluoroforu z włóknem białkowym oraz brak porównania z klasycznymi markerami (np. tioflawiną T).

W drugiej publikacji przedstawionej w autoreferacie Autorka opisuje badania nad właściwościami dwufotonowymi (2PA) nanoklastrów srebra stabilizowanych oligonukleotydami DNA (Ag_N -DNA). Na szczególne uznanie zasługuje świadomy dobór obiektów badawczych, czterech reprezentatywnych nanoklastrów wyselekcjonowanych z większej grupy struktur scharakteryzowanych metodami HPLC oraz ESI-MS. Uwzględnienie różnic w liczbie atomów srebra, efektywnej liczbie elektronów walencyjnych, sekwencji oligomerów DNA, liczbie ligandów oligomerów DNA oraz obecności ligandów chlorkowych pozwoliło na przeprowadzenie analizy porównawczej o wysokiej wartości poznawczej. Takie podejście umożliwiło korelację właściwości optycznych z parametrami strukturalnymi, co jest kluczowe dla dalszego projektowania tego typu układów.

Istotnym elementem pracy jest kompleksowa charakterystyka właściwości jednofotonowych, obejmująca m.in. widma emisji, absorpcji i wzbudzenia fluorescencji (1PE) dla badanych nanoklastrów, jak również wyznaczenie wydajności kwantowej fluorescencji dla wybranych układów. Stanowi to cenne uzupełnienie istniejącej wiedzy i tworzy solidną podstawę do interpretacji wyników uzyskanych z pomiarów dwufotonowych.

Najważniejszą częścią osiągnięcia są badania σ_2 wykonane techniką dwufotonowo wzbudzonej luminescencji (2PEL) w szerokim zakresie spektralnym (810-1400 nm). Doktorantka wykazała dużą rzetelność metodologiczną, weryfikując dwufotonowy charakter emisji poprzez analizę zależności log-log intensywności sygnału od mocy lasera oraz krytycznie identyfikując zakresy długości fal, w których występuje wkład procesów jednofotonowych. Na uwagę zasługuje również pogłębiona analiza uzyskanych wyników dla Ag_{16} -DNA- Cl_2 , dla którego zaobserwowano nietypowo wysokie wartości σ_2 w zakresie NIR-II. Doktorantka podjęła próbę wyjaśnienia tego zjawiska, odwołując się do wyników pomiarów absorpcji przejściowej oraz danych teoretycznych, wskazujących na możliwy udział stanu trypletowego. Co istotne, hipotezę tę zweryfikowała poprzez zmianę częstości repetycji

impulsów lasera, co świadczy o bardzo dobrym warsztacie eksperymentalnym i umiejętności krytycznego testowania własnych założeń. Równie istotne było porównanie właściwości optycznych Ag_N -DNA z dostępnymi komercyjnie, rozpuszczalnymi w wodzie sondami, co potwierdziło ich potencjał jako nowej klasy znaczników do mikroskopii dwufotonowej.

Podsumowując, druga z prac również cechuje się wysokim poziomem oryginalności, dobrą jakością metodologiczną oraz istotnym znaczeniem zarówno poznawczym, jak i aplikacyjnym. Doktorantka nie tylko wypełniła istniejącą lukę badawczą, ale również zaproponowała nowe kierunki rozwoju materiałów do bioobrazowania w zakresie bliskiej podczerwieni, potwierdzając postawioną hipotezę badawczą i realizując założone cele pracy.

Trzecia publikacja dotyczy kompleksowej charakterystyki nowego fluoroforu o architekturze donor-akceptor-donor (D-A-D) zawierającego ugrupowanie BF_2 , do detekcji amyloidów w oparciu o dwufotonową mikroskopię fluorescencyjną (2PFM).

Na uznanie zasługuje racjonalne rozwinięcie wcześniejszej koncepcji strukturalnej (barwnik 1 o architekturze D-A) poprzez zastosowanie symetrycznego układu D-A-D (barwnik 2). Wprowadzenie dodatkowego fragmentu donorowego oraz wydłużenie sprzężenia elektronowego przelożyło się na wyraźną poprawę właściwości optycznych, w tym batochromowe przesunięcie emisji oraz wzrost wydajności kwantowej fluorescencji. Uzyskane wartości σ_2 , przekraczające 1000 GM dla wybranych długości fali, należy uznać za bardzo wysokie w kontekście małych cząsteczkowych fluoroforów organicznych, co potwierdza trafność przyjętej strategii projektowania.

Istotnym elementem pracy jest porównanie nowo opracowanego fluoroforu z powszechnie stosowanym standardem – MeO-X04. Doktorantka wykazała, że zaprojektowany barwnik 2, po związaniu z amyloidami, charakteryzuje się korzystniejszymi właściwościami optycznymi niż MeO-X04, w tym emisją w zakresie powyżej 600 nm, wyższymi wartościami przekroju czynnego na absorpcję dwufotonową (2PA), szerszym zakresem wzbudzenia oraz większą intensywnością emisji. Wyniki te mają istotne znaczenie aplikacyjne, ponieważ ograniczenia MeO-X04, związane z autofluorescencją oraz ograniczoną penetracją głębokich warstw tkanek wynikające ze wzbudzania światłem o długości fali 350-400 nm, są dobrze udokumentowane. Na uwagę zasługuje także kompleksowa analiza oddziaływań barwnik-amyloid, badania selektywności względem innych biocząsteczek oraz wykazanie, że parametry 2PA ulegają istotnej zmianie po związaniu z biomakrocząsteczką. Ma to istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i praktyczne, szczególnie w kontekście optymalizacji warunków obrazowania.

Należy jednak wskazać na pewne ograniczenia przedstawionych wyników. W artykule zabrakło dyskusji dotyczącej potencjalnej toksyczności oraz stabilności biologicznej

proponowanych układów, co ogranicza możliwość pełnej oceny ich przydatności aplikacyjnej.

W odniesieniu do całości ocenianej dysertacji stwierdzam, że przeprowadzone badania wymagały od Dyplomantki dobrej znajomości zagadnień związanych z fluoroforami przeznaczonymi do zastosowań w mikroskopii, a także umiejętności posługiwania się szerokim wachlarzem nowoczesnych metod badawczych służących do oceny ich właściwości spektroskopowych i fotofizycznych. Nowatorstwo oraz poprawność merytoryczna badań zostały potwierdzone na etapie recenzji poprzedzających publikację wyników w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Przedstawione publikacje są ze sobą powiązane tematycznie, jednak stopień ich integracji w ramach rozprawy pozostaje niewystarczający. W szczególności zauważalne są (i) brak wyraźnie sformułowanej hipotezy badawczej spinającej wszystkie trzy prace oraz (ii) niedostatecznie rozwinięte podsumowanie syntetyczne. O ile więc spójność tematyczna jest zachowana, o tyle spójność koncepcyjna mogłaby zostać wyraźniej zaakcentowana. Uwagi te nie podważają jednak wartości naukowej pracy jako całości – rozprawa doktorska porusza ważny i aktualny problem badawczy oraz zawiera szereg interesujących wyników.

W trakcie lektury recenzowanej rozprawy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania:

1. Jakie mechanizmy odpowiadają za wzrost intensywności fluorescencji po związaniu znacznika z amyloidem?
2. Czy obserwowane zmiany właściwości dwufotonowych wynikają głównie ze zmian struktury elektronowej, czy raczej z efektów środowiskowych?
3. Jak można jednocześnie zoptymalizować wysoką fluorescencję i dobrą rozpuszczalność w środowisku biologicznym?
4. Który z uzyskanych wyników uważa Pani za najważniejszy i dlaczego?
5. Co jest największą barierą w przejściu od badań *in vitro* do zastosowań *in vivo* w przypadku Pani znaczników?

Podsumowanie

Przedstawiona rozprawa doktorska wnosi istotny wkład poznawczy do aktualnego stanu wiedzy w obszarze spektroskopii optycznej i chemii materiałowej, prezentując nowe rozwiązania w zakresie projektowania znaczników fluorescencyjnych. Stanowi ona wartościowe i oryginalne osiągnięcie naukowe w dyscyplinie nauk chemicznych.

Cykl publikacji będący podstawą rozprawy jest spójny tematycznie, merytorycznie uzasadniony oraz charakteryzuje się bardzo wysokim poziomem naukowym. Autorka wykazała się wysokim stopniem dojrzałości naukowej, bardzo dobrą znajomością literatury przedmiotu oraz umiejętnością zastosowania różnorodnych technik eksperymentalnych.

Przedstawione wyniki potwierdzają, że mgr inż. Agata Hajda posiada kompetencje do samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Reasumując stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wymagania ustawowe określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. 2024, poz. 1571) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Agaty Hajdy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne.

Dodatkowo, biorąc pod uwagę wykonany zakres prac, osiągnięte wyniki oraz wpływ pracy na dyscyplinę, wnoszę do Rady Dyscypliny o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agaty Hajdy.



dr hab. inż. Beata Jędrzejewska
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej
Politechniki Bydgoskiej