

Poznań, 15.05.2026

Dr hab. Anna Lewandowska-Andrałojć, prof. UAM  
Zakład Chemii Fizycznej i Fotochemii  
Wydział Chemii, UAM  
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8  
Poznań, 61-614  
[alewand@amu.edu.pl](mailto:alewand@amu.edu.pl)

### Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr. inż. Agaty Hajdy**  
**pt. „Nowe znaczniki fluorescencyjne do mikroskopii jedno- i dwufotonowej ze**  
**szczególnym uwzględnieniem wykrywania amyloidów”**  
**Promotor: dr hab. inż. Joanna Olesiak-Bańska, prof. PWr**

Podstawą formalną sporządzenia niniejszej recenzji jest pismo Pana dr. hab. inż. Roberta Góry, prof. PWr, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej „Nauki Chemiczne” Politechniki Wrocławskiej. Recenzja została opracowana w oparciu o kryteria określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.).

Recenzowana rozprawa doktorska poświęcona jest projektowaniu i charakterystyce nowych znaczników fluorescencyjnych przeznaczonych do mikroskopii jedno- i dwufotonowej, ze szczególnym uwzględnieniem ich zastosowania w detekcji amyloidów. Autorka skoncentrowała się na badaniach właściwości spektroskopowych i fotofizycznych wybranych fluoroforów oraz analizie zmian tych właściwości po oddziaływaniu barwników ze strukturami amyloidowymi. Istotnym elementem pracy była również próba określenia, w jaki sposób budowa molekularna badanych znaczników, w tym rozmieszczenie grup funkcyjnych w cząsteczce, wpływa na ich właściwości optyczne, charakter oddziaływań z włóknami amyloidowymi oraz odpowiedź fluorescencyjną po związaniu z agregatami białkowymi.

Jest to zagadnienie istotne zarówno z punktu widzenia chemii fizycznej i fotochemii, jak i szeroko rozumianego bioobrazowania. Rozwój znaczników wykazujących selektywną odpowiedź fluorescencyjną na amyloidy pozostaje ważnym kierunkiem badań, ponieważ

struktury amyloidowe odgrywają znaczącą rolę w biologii agregacji białek i są powiązane z licznymi procesami patologicznymi, w tym chorobami neurodegeneracyjnymi. Dodatkowe uwzględnienie właściwości dwufotonowych badanych związków zwiększa aktualność podjętej tematyki, gdyż mikroskopia dwufotonowa stanowi obecnie jedną z kluczowych metod obrazowania układów biologicznych. W związku z tym temat rozprawy należy uznać za dobrze uzasadniony, aktualny i wpisujący się w światowe trendy badań nad nowymi sondami fluorescencyjnymi do detekcji amyloidów.

### **Ogólna charakterystyka rozprawy**

Rozprawę doktorską stanowi zbiór trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych, opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Chemical Communications*, *Chemical Science* oraz *ACS Applied Bio Materials*, opatrzonych zwięzłym opisem w formie przewodnika. Nie ulega wątpliwości, że zaprezentowany dorobek, opublikowany na łamach renomowanych czasopism naukowych, charakteryzuje się bardzo dobrą jakością pod względem merytorycznym.

Wszystkie przedstawione prace są publikacjami wieloautorskimi, przy czym Pani Hajda występuje w każdej z nich jako pierwszy autor. Wiodący wkład Doktorantki w powstanie tych publikacji został również jednoznacznie potwierdzony odpowiednimi oświadczeniami Doktorantki.

Część teoretyczna rozprawy stanowi spójną sekwencję rozdziałów, które wprowadzają czytelnika w tematykę pracy i przygotowują do lektury jej zasadniczej części. Autorka rozpoczyna od uzasadnienia podjęcia badań, jasno wskazując luki w aktualnym stanie wiedzy dotyczące fluoroforów funkcjonalizowanych grupą  $\text{BF}_2$  oraz atomowo precyzyjnych nanoklastrów  $\text{Ag}_N$ -DNA. W tej części rozprawy Autorka formułuje trzy cele badawcze, które zostały określone w sposób poprawny i wskazują na wielokierunkowe podejście Doktorantki do analizowanego zagadnienia. Istotnym elementem pracy jest również sformułowanie hipotez badawczych, które porządkują strukturę rozprawy i precyzują kierunki prowadzonych badań. Główna część literaturowa rozprawy została uporządkowana w sposób logiczny i ściśle podporządkowana tematyce pracy. Autorka najpierw wprowadza czytelnika w podstawy absorpcji dwufotonowej oraz dwufotonowej mikroskopii fluorescencyjnej, a następnie omawia grupy fluoroforów wykorzystywanych w tego typu obrazowaniu. Szczególną uwagę poświęca dwóm klasom znaczników istotnym z punktu widzenia prowadzonych badań: fluoroforom organicznym oraz nanoklastrom srebra stabilizowanym matrycą DNA. Takie ujęcie pozwala płynnie przejść od ogólnych zagadnień fotofizycznych do konkretnych układów analizowanych w rozprawie.

Odrębny fragment części teoretycznej poświęcono amyloidom. Autorka omawia w nim podstawowe cechy struktur amyloidowych, ich znaczenie biologiczne i powiązanie z chorobami, a także przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący sond fluorescencyjnych

stosowanych do ich detekcji. Dobór zagadnień w rozdziale wprowadzającym oceniam jako trafny, ponieważ umożliwia czytelnikowi zapoznanie się z najważniejszymi pojęciami, a jednocześnie dobrze nakreśla szerszy kontekst naukowy prowadzonych badań.

Przegląd literatury został przygotowany starannie i świadczy o dobrym rozeznaniu Autorki w omawianej tematyce. W rozprawie przywołano liczne przykłady prac opublikowanych przez zespoły badawcze aktywnie rozwijające obszar znaczników fluorescencyjnych, mikroskopii dwufotonowej oraz detekcji amyloidów. Większość cytowanych publikacji pochodzi z ostatnich kilku lub kilkunastu lat, co dodatkowo potwierdza aktualność podjętej problematyki oraz właściwe osadzenie badań Doktorantki w kontekście współczesnej literatury przedmiotu.

W kolejnym punkcie Autorka omówiła publikacje stanowiące trzon rozprawy doktorskiej, a następnie przedstawiła syntetyczne wnioski płynące z uzyskanych wyników. W ostatniej części rozprawy zamieszczono bibliografię, obejmującą 227 pozycji.

Pod względem edytorskim rozprawa sprawia wrażenie opracowania przemyślanego i uporządkowanego. Przyjęty układ treści jest logiczny, a kompozycja pracy sprzyja przejrzystości i ułatwia śledzenie głównych założeń oraz wyników badań. W moim odczuciu pewną słabością pracy jest brak odrębnego omówienia zastosowanej metodyki badawczej, co częściowo utrudnia ocenę, w jakim stopniu Doktorantka samodzielnie opanowała i wykorzystwała poszczególne techniki eksperymentalne. Należy jednak zaznaczyć, że może to wynikać z przyjętej formuły rozprawy, której zasadniczy trzon stanowi cykl trzech publikacji naukowych, a nie klasyczne, obszerne opracowanie monograficzne.

Na pozytywną ocenę zasługuje staranność językowa i redakcyjna pracy. Tekst został przygotowany poprawnie, a uchybienia stylistyczne i edytorskie pojawiają się jedynie sporadycznie. Dostrzegłam jedynie drobne uchybienia redakcyjne, które wymieniono poniżej:

- strona 30: zapis „260nm” powinien zostać poprawiony na „260 nm”;
- strona 36: zapis „Even thou” powinien zostać poprawiony na „Even though”;
- w materiałach uzupełniających do pierwszej pracy stosowano zapis „u” zamiast symbolu „μ”;
- strona 86, druga kolumna po prawej: występuje powtórzenie fragmentu tekstu „be a more general observations for this type of nanostructures”;
- strony 103-104: w kilku miejscach podano błędny odnośnik do rysunku — jest „Figure 19”, a właściwy odnośnik to „Figure 20”; strona 122: w podpisie do Figure S14 zapis „Concetartion” powinien zostać poprawiony na „Concentration”.

Natomiast w moim odczuciu istotnym ograniczeniem pracy jest jakość części materiału graficznego, w tym niektórych rysunków oraz załączonych publikacji. Obniżona rozdzielczość utrudniała w kilku miejscach odczytanie szczegółów i pełną analizę prezentowanych danych.

## Ocena merytoryczna pracy

Wyniki opisane w części zawierającej dyskusję zostały opublikowane w trzech artykułach w renomowanych czasopismach chemicznych: *Chemical Communications*, *Chemical Science* oraz *ACS Applied Bio Materials*. Publikacja wyników badań w uznanych czasopismach naukowych, objętych wymagającym procesem recenzji, potwierdza wysoką wartość merytoryczną przedstawionej rozprawy. Warto podkreślić, że mgr inż. Agata Hajda we wszystkich trzech publikacjach oprócz przeprowadzenia większości eksperymentów była również odpowiedzialna za przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu. Część zasadnicza rozprawy składa się z trzech podrozdziałów, z których każdy omawia najważniejsze wyniki uzyskane w poszczególnych pracach.

W pierwszej pracy wchodzącej w skład cyklu Autorka analizowała wpływ położenia grupy metoksy w rdzeniu opartym na benzotiazolu sfunkcjonalizowanym  $\text{BF}_2$  na właściwości jedno- i dwufotonowe badanych układów po ich związaniu z amyloidami. Praca ta podejmuje istotne zagadnienie zależności pomiędzy strukturą chemiczną fluoroforów a modulacją ich właściwości w zakresie absorpcji dwufotonowej. Jest to szczególnie wartościowe, ponieważ tego rodzaju systematyczne badania są w literaturze przedmiotu wciąż nieliczne. W drugiej pracy cyklu Doktorantka zbadała właściwości absorpcji dwufotonowej czterech nanoklastrów srebra stabilizowanych oligonukleotydami. Publikacja ta stanowi istotny wkład w rozwój wiedzy w tym obszarze, ponieważ po raz pierwszy przedstawiono w niej przekroje czynne na absorpcję dwufotonową dla atomowo precyzyjnych nanoklastrów  $\text{Ag}_N\text{-DNA}$  przed i po związaniu z amyloidami. W trzeciej pracy cyklu Doktorantka zaproponowała nowy znacznik fluorescencyjny amyloidów. W ramach przeprowadzonych badań Pani Hajda przedstawiła nową strukturę opartą na związkach organofluoroboranowych koordynowanych przez układ O,N,O, która wykazuje korzystniejsze właściwości optyczne niż komercyjnie dostępny standard stosowany w mikroskopii dwufotonowej. Na podstawie uzyskanych wyników oraz ich interpretacji można wskazać następujące najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej:

- 1) Zaprojektowanie nowej serii markerów amyloidowych (funkcjonalizowanych grupą  $-\text{BF}_2$  benzotiazoli), wśród których barwnik o architekturze donor-akceptor-donor wykazał aż 58-krotny wzrost wydajności kwantowej fluorescencji po związaniu z amyloidami insuliny.
- 2) Systematyczne zbadanie właściwości dwufotonowych sond opartych na benzotiazolu sfunkcjonalizowanym  $\text{BF}_2$  przed i po związaniu z białkiem, co pozwoliło wykazać, że pomiary w czystych rozpuszczalnikach organicznych nie są wystarczające do przewidywania skuteczności znaczników w obrazowaniu dwufotonowym, gdyż specyficzne mikrośrodowisko amyloidów istotnie modyfikuje ich parametry optyczne.
- 3) Ilościowe scharakteryzowanie właściwości nieliniowych czterech precyzyjnie zdefiniowanych klastrów  $\text{Ag}_N\text{-DNA}$  w szerokim zakresie długości fal. Badanie to dostarczyło pierwszych tak dokładnych danych eksperymentalnych dla atomowo

precyzyjnych klastrów  $Ag_N$ -DNA, wykazując, że posiadają one wysokie przekroje czynne na absorpcję dwufotonową sięgające nawet 582 GM dla klastra  $Ag_{21}$ -DNA.

- 4) Zaobserwowanie interesującego zjawiska odwrócenia intensywności przejść elektronowych w reżimie dwufotonowym względem jednofotonowego (dla  $Ag_{15}$ -DNA), co rzuca nowe światło na złożoną fotofizykę tych układów
- 5) Wykazanie, że dzięki połączeniu wysokiej jasności, naturalnej rozpuszczalności w wodzie oraz możliwości wzbudzenia i emisji w zakresie podczerwieni klastry  $Ag_N$ -DNA stanowią obiecujące sondy do zaawansowanego obrazowania głębokich tkanek biologicznych
- 6) Opracowanie wydajniejszego znacznika fluorescencyjnego o zoptymalizowanej topologii D–A–D, który przewyższa obecne standardy diagnostyczne. Rozszerzenie struktury do układu rozgałęzionego pozwoliło uzyskać barwnik, który po związaniu z amyloidem charakteryzuje się parametrami znacznie lepszymi niż powszechnie stosowany methoxy-X04. Barwnik 2 opisany w rozdziale 5 wykazuje emisją przesuniętą w stronę dłuższych fal (>600 nm), wyższy przekrój czynny na absorpcję dwufotonową, co w połączeniu z ponad 30-krotnym wzrostem intensywności fluorescencji po związaniu z amyloidem czyni go doskonałym narzędziem do głębokiego obrazowania w tzw. oknach biologicznych NIR-I i NIR-II.

W trakcie lektury rozprawy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania, wynikające z ciekawości poznawczej oraz mojej niewiedzy jako Recenzenta, do których proszę, aby Doktorantka odniosła się podczas publicznej obrony pracy:

- 1) Pewnego doprecyzowania w mojej opinii wymaga sposób definiowania stężenia molowego amyloidów insuliny bydlęcej. W tekście pojawiają się wartości, takie jak 122  $\mu$ M, a także stosunki  $C_{amyloids}/C_{dye}$ . W przypadku układów amyloidowych stężenie białka jest często wyrażane jako stężenie ekwiwalentów monomerycznych, a nie jako rzeczywiste stężenie fibryli jako odrębnych cząstek. Proszę zatem o wyjaśnienie, czy tak było również w niniejszej pracy.
- 2) W pracy przedstawiono wyniki badań oddziaływania barwników z amyloidami insuliny bydlęcej. Proszę o doprecyzowanie, czy przed rejestracją widm absorpcyjnych i/lub fluorescencyjnych badano kinetykę wiązania barwników do amyloidów oraz czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi lub stabilizacji sygnału spektroskopowego.
- 3) Czy przy porównywaniu intensywności emisji barwników przed i po dodaniu amyloidów uwzględniono fakt, że obecność amyloidów może zmieniać absorbcję próbki przy długości fali wzbudzenia? Innymi słowy, czy obserwowany wzrost fluorescencji został skorygowany o różnice w absorpcji światła wzbudzającego oraz o możliwy efekt filtra wewnętrznego

- 4) klaster  $\text{Ag}_{16}\text{-DNA-Cl}_2$  wykazuje wyjątkowo silną 2PA w oknie NIR-II, co odróżnia go od pozostałych badanych próbek. W jakim stopniu to właśnie obecność silnie elektroujemnych atomów chloru, a nie sama struktura rdzenia  $\text{Ag}_{16}$ , determinuje tak wysoką  $\sigma_2$ ? Autorzy wspominają o modulacji gęstości elektronowej przez chlorki – czy planowane są badania z innymi ligandami halogenkowymi (np. Br, I), aby sprawdzić wpływ polaryzowalności liganda na przekrój czynny na absorpcję dwufotonową?
- 5) W pracy postawiono hipotezę, że  $\text{Ag}_{19}\text{-DNA}$  ma geometrię sferoidalną (jako superatom 8-elektronowy), w przeciwieństwie do prętopodobnych struktur klastrów 6-elektronowych. Czy ta zmiana symetrii geometrycznej może być przyczyną nietypowego zachowania  $\text{Ag}_{19}\text{-DNA}$  przy wzbudzeniu laserem femtosekundowym, które autorzy określili jako wymagające dalszych badań? Czy sferoidalny kształt może faworyzować procesy upkonwersji kosztem czystej absorpcji dwufotonowej?
- 6) Choć klastry  $\text{Ag}_N\text{-DNA}$  są rozpuszczalne w wodzie i wykazują duży potencjał w bioobrazowaniu, ich właściwości optyczne silnie zależą od sekwencji DNA. Jak stabilne są parametry i jasność dwufotonowa w warunkach zmiennego pH, siły jonowej lub w obecności białek komórkowych, które mogłyby oddziaływać z otoczką DNA klastra?
- 7) Dlaczego wybrano właśnie symetryczną strukturę D–A–D? Czy dodanie drugiego ramienia z grupą miało na celu jedynie przesunięcie batochromowe, czy spodziewano się specyficznego "zakotwiczenia" cząsteczki w dwóch sąsiednich kieszeniach hydrofobowych włókna?
- 8) Dla Barwnika 2 w rozdziale 5 zaobserwowano, że przy wzroście stężenia amyloidu na widmie wzbudzenia jednofotonowego pasmo przy ok. 450 nm zanika, a pojawia się nowe pasmo przy 550 nm. Jaka jest fizykochemiczna natura tego nowego pasma? Czy może ono wynikać z tworzenia specyficznego kompleksu, czy też ze zmiany stanu agregacji samego barwnika po związaniu z włóknem?
- 9) Jak 5% dodatek DMSO użyty w badaniach ma się do planowanych testów *in vivo*?

Powyższe uwagi krytyczne i komentarze w żaden sposób nie umniejszają osiągnięć Autorki. Nie ulega wątpliwości, że rozprawa została przygotowana przez osobę posiadającą dogłębną wiedzę w omawianym obszarze tematycznym. Jestem pod dużym wrażeniem znajomości przez Doktorantkę różnorodnych zaawansowanych technik spektroskopowych, a także Jej umiejętności precyzyjnego formułowania hipotez oraz wyciągania poprawnych wniosków. Dyskusja wyników została przeprowadzona w sposób dojrzały i kompetentny. Należy również podkreślić, że praca wyróżnia się nie tylko wysokim poziomem merytorycznym, lecz także została przygotowana z dużą starannością pod względem językowym i redakcyjnym.

## Konkluzja recenzji

Rozprawa doktorska mgr inż. Agaty Hajdy stanowi wartościowe i oryginalne opracowanie poświęcone znacznikom fluorescencyjnym stosowanym w mikroskopii jedno- i dwufotonowej. Przedstawione w niej rezultaty wnoszą istotny wkład w rozwój tej tematyki, czego potwierdzeniem są trzy publikacje w uznanych czasopismach naukowych. Uzyskane wyniki mają zarówno znaczenie poznawcze, jak i wyraźny potencjał praktycznego zastosowania. Pracę oceniam bardzo wysoko, doceniając jej poziom merytoryczny oraz staranne przygotowanie redakcyjne. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Agaty Hajdy pt. **„Nowe znaczniki fluorescencyjne do mikroskopii jedno- i dwufotonowej ze szczególnym uwzględnieniem wykrywania amyloidów”** w pełni spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571) i wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Anna Lewandowska-Andrałojć



Signed by /  
Podpisano przez:

Anna Lewandowska-  
Andrałojć

Date / Data: 2026-  
05-15 15:40

