

Recenzja rozprawy doktorskiej Mgr Bozeny Sikory

1. Wstep

Rozprawa doktorska Mgr Bozeny Sikory, pt.: «Zaprojektowanie i scharakteryzowanie biosensorow opartych na koloidalnych nanocząstkach do zasosowan w biologii i medycynie», wykonana w Srodowiskowym Laboratorium Fizyki Biologicznej pod kierunkiem Prof. dr Danka Elbauma (Promotor) i dr Krzysztofa Fronca (Promotor pomocniczy), dotyczy waznej dziedziny projektowania, syntezy oraz charakteryzacji nowoczesnych nanobiosensorow przewidzianych do zasosowan w biologii i medycynie.

Rozprawa zogniskowana jest wokol syntezy i charakteryzacji dwoch rodzajow nieorganicznych nanocząsteczek : (i) opartych na nanocząsteczkowym tlenku cynku (ZnO) oraz (ii) wielofunkcyjnych, optycznie i magnetycznie czynnych, nanocząsteczkowych fosforach bazujacych na strukturze gagarinitu (NaYF₄) domieszkowanego atomami pierwiastkow grupy lantanowcow (Yb, Er, Gd).

Do najwazniejszych potencjalnych zastosowan nanocząsteczkowych biosensorow, ktore zaprojektowano, wykonano i zbadano w ramach tej pracy, nalezy zaliczyc zastosowania w biologii, np. w detekcji procesow biomolekularnych z wykorzystaniem fluorescencyjnego rezonansowego transferu energii (Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET), oraz w medycynie, np. w obrazowaniu tkanek i wczesnej detekcji i terapii nowotworow. W szczegolnosci, przewiduje sie, ze wielofunkcyjne optycznie i magnetycznie czynne nanocząsteczki bazujace na fosforach NaYF₄ domieszkowanych atomami Yb, Er, Gd moga okazac sie niezwykle cenne dla obrazowania zmian chorobowych w tkankach, wczesnej detekcji nowotworow za pomoca metod optycznych oraz jądrowego rezonansu magnetycznego (Magnetic Resonance Imaging, MRI), a takze dla wykonywania niskoinwazyjnych zabiegow w ramach terapii fotodynamicznej (photodynamic therapy, PDT) oraz w selektywnym nagrzewaniu, uszkodzaniu i eliminacji chorych tkanek (hipertermia).

W tym kontekscie nalezy podkreslic bardzo trafny wybor przedmiotu tej rozprawy. Oba wspomniane wyzej materialy, tj. nanocząsteczkowy ZnO oraz nanocząsteczkowy gagarinit NaYF₄, od prawie dekady znajduja sie w centrum zainteresowania wielu grup badawczych rozwijajacych technologie nanocząsteczkowych biosensorow. Wynika to z bardzo korzystnych wlasciwosci fizykochemicznych obu materialow, oraz, jak sie powszechnie uwaza, z ich biokompatybilnosci. Przegladajac wspolczesna literature naukowa dotyczaca zarowno nanocząsteczkowego ZnO, jak i nanocząsteczkowych fosforow opartych o siec krystaliczna NaYF₄, mozna dostrzec swoisty wyscig ku otrzymaniu najkorzystniejszych wlasciwosci tych materialow oraz ich funkcjonalizacji w celu otrzymania uniwersalnych platform technologicznych. Do tej pory jednak, mimo licznych wniesionych zastrzezen technologii oraz zgloszen patentowych, nie ma na rynku latwodostepnych nanocząsteczkowych biosensorow bazujacych na tych

materialach. Wynika to z trudności wdrożenia do masowej produkcji dobrze opanowanych metod wytwarzania tych nanomaterialów, uzyskania powtarzalnych właściwości fizykochemicznych oraz selektywnej funkcjonalizacji dla określonych zastosowań. Można to wykazać na przykładzie nanocząsteczkowego NaYF₄, tj. materiału, którego parametry sieci krystalograficznej uważane są za najkorzystniejsze dla uzyskania silnej luminescencji widzialanej przy pobudzeniu światłem o niskiej energii (*ang.*: upconversion luminescence, UCL). Konkretnie, od ubiegłego roku (2013), materiały nanocząsteczkowe NaYF₄ o małych rozmiarach (~ 25 – 35 nm) i wysokiej wydajności UCL są już dostępne handlowo poprzez koncern Sigma/Aldrich. Ich ceny pozostają jednak bardzo wysokie (1'000 USD/mg), a wybór rodzaju funkcjonalizacji ich powierzchni jest bardzo ubogi.

Istnieje więc głęboki sens opracowywania nowych metod technologii tych materiałów, zrozumienia zasad ich funkcjonowania oraz ich wszechstronnej charakterystyki.

Jak widać z powyższego, w ramach tej rozprawy, zogniskowanej wokół nanocząsteczkowego ZnO oraz nanocząsteczkowego gagarinitu NaYF₄, podjęto szereg bardzo aktualnych wyzwań będących na pograniczu kilku dyscyplin naukowych, począwszy od technologii wytwarzania nanomaterialów, poprzez biochemiczne metody ich funkcjonalizacji, a kończąc na wszechstronnej charakterystyce ich właściwości fizykochemicznych zarówno *in vitro*, jak i *ex vivo* (badania na liniach komórkowych).

2. Opis rozprawy i uzyskanych w niej wyników

Rozprawa składa się z 7 rozdziałów i liczy 195 stron.

Rozprawa poprzedzona jest krótkim wstępem, który w zarysie przedstawia motywację podjętych badań oraz zasadnicze tezy i najważniejsze wyniki.

Rozdział 1 rozprawy, 'Definicja i opis chorób nowotworowych' uzupełnia wstęp, podkreślając dodatkowo motywację i ukierunkowanie tej pracy na zagadnienia dotyczące chorób nowotworowych i ich terapii.

Zasadnicze tezy naukowe rozprawy i osiągnięte wyniki przedstawione są w rozdziałach 2, 3, 4, i 5. Część naukowa rozprawy kończy 'Podsumowanie'. Ponadto, jako swoisty aneks, praca zawiera także szczegółowy opis metod technologicznych i wykorzystanych technik pomiarowych (Rozdział 6, 'Metody i materiały'). Poszczególne rozdziały rozprawy opatrzone są spisami cytowanych prac (bibliografie). Ostatni rozdział rozprawy, rozdział 7, zawiera listy publikacji, zgłoszeń patentowych, wygłoszonych referatów, nagród i wyróżnień oraz doniesień konferencyjnych.

Technologia i właściwości fizykochemiczne pierwszej grupy nanocząstek opartych na tlenku cynku (ZnO) oraz na ZnO powlekanym cienką warstwą pasywną MgO (ZnO@MgO) opisane są w rozdziałach 2 i 3.

Rozdział 4 opisuje pierwszą strategię budowy biosensorów w oparciu o opisany wcześniej (w rozdziałach 2 i 3) system ZnO@MgO, który jest tu dodatkowo funkcjonalizowany karboksymetylo- β -cyklodekstryną (CMCD) i organicznym barwnikiem, czerwienią Nilu (Nile red), prowadząc tym samym do uzyskania systemu 'ZnO@MgO@CMCD-Nile red'.

Rozdział 5 opisuje drugą strategię budowy nanobiosensorów w oparciu o wielofunkcyjne nanocząsteczki bazujące na fosforach NaYF_4 domieszkowanych atomami Yb, Er, Gd. W rozdziale tym przedstawiono również wszechstronną charakterystykę zsyntetyzowanych materiałów oraz opisano próby ich zastosowania do obrazowania komórek przy pobudzeniu światłem bliskiej podczerwieni, a więc w warunkach niskiej autofluorescencji material biologicznego.

2.1. Omówienie wyników rozprawy

Jak wspomiano, rozprawa przedstawia dwie zasadniczo różne strategię budowy nanobiosensorów. Z tego względu, w pierwszej części tej recenzji zostaną omówione wyniki rozdziałów 2, 3 i 4, w których Autorka rozprawy opisała budowę i charakterystykę nanobiosensorów bazujących na nanocząsteczkowym ZnO.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w **rozdziale 2** należy zaliczyć:

- (i) Przeprowadzenie udanej syntezy nanocząstek ZnO o strukturze wycytu, o rozmiarach 3-6 nm, za pomocą metody sol-gel, przy użyciu octanu cynku, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, jako prekursora, oraz wody lub wodorotlenku sodu (NaOH) jako substratów, stosując jako rozpuszczalniki pięć różnych alkoholi (etanol, izopropanol, 2-butanol, pentanol i heksanol). Syntezę przeprowadzono dla całego szeregu temperatur reakcji (25, 35, 45, 55 i 65 °C). Wykazano, że kinetyka wzrostu nanocząstek ZnO przebiega zgodnie z modelem zaproponowanym przez Lifshitz'a, Slyozov'a i Wagner'a (model LSW) [Lifshitz IM, Slyozov VV, *J.Phys.Chem.Solids* **19**, 35-50 (1961); Wagner C, *Z.Elektrochem.* **65**, 581-59 (1961)].
- (ii) Wykazanie, że stałe kinetyk procesu wzrostu ziaren nanokrystalitów ZnO oraz odpowiednie energie aktywacji zależą od całego szeregu czynników, a w tym: od temperatury reakcji oraz lepkości i stałej dielektrycznej środowiska. Przede wszystkim jednak, jak stwierdzono w tej pracy, stałe kinetyk oraz energie aktywacji są zdecydowanie różne dla dwóch różnych substratów – wody i NaOH.
- (iii) Wykazanie, że luminescencja widzialna w paśmie 530 nm była zdecydowanie wyższa dla nanocząstek ZnO zsyntetyzowanych w obecności NaOH.

(iv) Przeprowadzenie szczegółowej analizy zbioru wyników otrzymanych dla różnych procesów technologicznych syntezy nanocząstek ZnO. Ta szczegółowa analiza pozwoliła wysnuć wniosek, że luminescencja widzialna w pasmie 530 nm zależy w dużym stopniu od wielkości oraz stanu powierzchni ziaren nanokrystalitów ZnO. W szczególności, pokazano, że luminescencja ta maleje wraz ze wzrostem średnicy ziaren. Ten fakt, w połączeniu z obserwacją różnic w zachowaniu się luminescencji UV (pasmo 375 nm) i widzialnej (pasmo 530 nm) dla nanocząstek ZnO otrzymanych w obecności wody lub NaOH jako prekursorów, pozwolił wysnuć dodatkowy ważny wniosek dotyczący natury luminescencji w nanokrystalicznym ZnO. Konkretnie, powiązanie powstawania luminescencji widzialnej w pasmie 530 nm z mechanizmem rekombinacji promienistej elektronów z pasma przewodnictwa pulpowanych przez głębokie stany w przerwie zabronionej. Ponieważ natura tych stanów modyfikowały bardzo wyraźnie procesy chemiczne zachodzące na powierzchni nanocząstek, stwierdzono, że za luminescencje widzialną w pasmie 530 nm odpowiedzialne są defekty i stany powierzchniowe.

Rezultaty powyższych badań zostały opublikowane w artykule: Bożena Sikora *et al.*, "The growth kinetics of colloidal ZnO nanoparticles in alcohols", *J.Sol-Gel Sci. Technol.* **61**, pp. 197–205 (2012).

Do chwili obecnej publikacja ta była dwukrotnie cytowana.

Do najważniejszych osiągnięć badań przedstawionych w **rozdziałach 3 i 4** należy zaliczyć:

(i) Dokonanie udanej syntezy nanocząstek ZnO@MgO.

Celem tego zabiegu technologicznego, polegającego na pokrywaniu nanocząstek ZnO cienką powłoką pasywacyjną MgO, było polepszenie ogólnej jakości nanocząstek ZnO syntetyzowanych dla potrzeb potencjalnych zastosowań w biologii.

Opracowana technologia, przeprowadzana w jednym lub dwóch procesach reakcyjnych sol-żel, pozwoliła na uzyskanie stabilnych roztworów koloidalnych ZnO@MgO. Otrzymane nanocząsteczki ZnO@MgO, o ogólnych rozmiarach 3–6 nm i grubości warstwy pasywacyjnej około 0.6 nm, wykazały wysoką luminescencje widzialną w pasmie 530 nm oraz odporność na agregację i wzrost ziaren w funkcji czasu przechowywania.

(ii) Dokonanie kolejnej modyfikacji systemu ZnO@MgO poprzez dołączenie do niego cząstek amfifilowego związku organicznego, karboksymetylo-β-cyklodekstryny (CMCD), oraz przez funkcjonalizację powierzchni polegającą na wbudowaniu hydrofobowego barwnika, czerwieni Nilu (Nile red), w 'otwory' CMCD. Zabiegi te pozwoliły na uzyskanie nanocząsteczkowych układów ZnO@MgO@CMCD oraz 'ZnO@MgO@CMCD-Nile red'.

Wykazano, że funkcjonalizacja ZnO@MgO za pomocą CMCD prowadzi do uzyskania stabilnych wodnych roztworów koloidalnych. Pozwoliło to na

probe wprowadzenia hydrofilowych nanocząstek ZnO@MgO@CMCD (o średnicach około 6 nm) jako sond luminescencyjnych do komórek HeLa. Za pomocą mikroskopii konfokalnej uzyskano bardzo przekonujące rezultaty wskazujące na obecność nanocząstek ZnO@MgO@CMCD wewnątrz komórek HeLa po 24-godzinach inkubacji. Przy dwu-fotonowym wzbudzeniu długości fali $\lambda_{\text{ex}} = 705 \text{ nm}$ (laser femtosekundowy) obserwowano charakterystyczna dla ZnO luminescencje w pasmie 530 nm. Dla ułatwienia procesu przejmowania nanocząstek ZnO@MgO@CMCD przez komórki HeLa użyto związku chemicznego wspomagającego mechanizm transportu liposomalnego, tj. Lipofectamine 2000.

Należy tu podkreślić, że chociaż obserwacje nanocząstek ZnO w komórkach były opisywane w literaturze już wcześniej, to ich obecność nie była, jak dotąd, potwierdzona poprzez detekcję ich charakterystycznej luminescencji. **Z tego względu obserwacja luminescencji nanocząstek ZnO w komórkach jest szczególnym osiągnięciem tej pracy.**

Jak wspomiano, dodatkowa funkcjonalizacja powierzchni z zastosowaniem barwnika fluorescencyjnego, czerwieni Nilu (Nile red), pozwoliła na uzyskanie układów ' $\text{ZnO@MgO@CMCD-Nile red}$ '. Dzięki tej modyfikacji możliwe było przeprowadzenie wewnątrzkomórkowych badań procesów FRET. Procesy FRET obserwowano dla transferu energii od pobudzonych światłem 356 nm nanocząstek ZnO do molekuł czerwieni Nilu. Procesy te zachodziły zatem w obrębie nanocząsteczki ' $\text{ZnO@MgO@CMCD-Nile red}$ ' o bardzo dobrze zdefiniowanej geometrii. Zgodnie z przypuszczeniami, obserwowano wygaszanie luminescencji ZnO w pasmie 530 nm, któremu towarzyszył wzrost luminescencji barwnika czerwieni Nilu w pasmie 650 nm. Proces ten zbadano *in vitro* dla szeregu koncentracji barwnika czerwieni Nilu oraz potwierdzono jego obecność w badaniach 'fizycznych' mieszanin ZnO@MgO i czerwieni Nilu. W tym ostatnim przypadku zaobserwowano gwałtowny spadek emisji luminescencji ZnO w pasmie 530 nm w wyniku absorpcji tego promieniowania przez molekuly barwnika. Z wyników badań wydajności luminescencji FRET dla mieszanin ZnO@MgO@CMCD i czerwieni Nilu w wodzie wyznaczono krytyczną odległość R_0 dla tego układu. Odległość ta wyniosła 3.4 nm.

Opracowane w tej pracy układy nanobiosensorów ' $\text{ZnO@MgO@CMCD-Nile red}$ ' odznaczają się także tym, że proces transferu energii nie zależy, w sensie spektralnym, od wielkości nanocząstki ZnO. Jest to niewatpliwa zaleta tego układu w stosunku do bardziej rozpowszechnionych systemów FRET opartych na kropkach kwantowych (quantum dots, QDs), dla których obserwuje się przesunięcie spektralne linii emisji w funkcji średnicy QD.

(iii) Istotnym rezultatem tej części pracy są wyniki badań procesów FRET przy użyciu układów ' $\text{ZnO@MgO@CMCD-Nile red}$ ' w komórkach HeLa. Wykazano tu bardzo wyraźne zmiany wydajności procesu FRET wewnątrz i na zewnątrz komórek. Zmiany te wskazują na wpływ cytosolu na wydajność procesów FRET dla układów ' $\text{ZnO@MgO@CMCD-Nile red}$ ' na skutek zmian

pH, stałej dielektrycznej oraz siły jonowej. Pozwala to sadzić, że Autorce rozprawy udało się stworzyć uniwersalny układ nanobiosensorów reagujących na zmiany środowiska wewnątrz-komórkowego. Ponadto, dla układów 'ZnO@MgO@CMCD-Nile red' wykazano istnienie zależności wydajności procesów FRET od temperatury. Procesy te, badane *in vitro*, wykazały istnienie przesunięcia termochromowego rzędu $5.7 \pm 1.5 \text{ cm}^{-1}/\text{K}$. Można więc wnioskować, że w ramach tej rozprawy udało się skonstruować nanoskopowy termometr przydatny do badań temperatury w roztworach wodnych *in vitro* i w skali pojedynczych komórek *ex vivo*.

W sumie, powyższe rezultaty, a w szczególności pionierskie badania wewnątrzkomórkowych procesów FRET za pomocą układu 'ZnO@MgO@CMCD-Nile red', są bez wątpienia jednymi z większych osiągnięć tej rozprawy.

Rezultaty badań w części dotyczącej syntezy nanocząstek ZnO@MgO@CMCD oraz ich detekcji w komórkach HeLa zostały opublikowane w artykule: Bożena Sikora *et al.*, "Luminescence of colloidal ZnO nanoparticles synthesized in alcohols and biological application of ZnO passivated by MgO", *J. Phys.: Condens. Matter* **25**, 194104, pp. 1-8 (2013).

Do chwili obecnej, praca ta była cytowana jednokrotnie.

Rezultaty wyników otrzymanych dla badań wydajności procesów FRET w komórkach HeLa przy użyciu nanobiosensorów 'ZnO@MgO@CMCD-Nile red' nie zostały jeszcze opublikowane.

W **rozdziale 5** rozprawy, skupiono się na odmiennej strategii budowy nanobiosensorów, konstruowanych tym razem wokół nanocząsteczkowych fosforów bazujących na strukturze gagarinitu (NaYF_4), domieszkowanego atomami pierwiastków grupy lantanowców (Yb, Er, Gd).

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w **rozdziale 5** należy zaliczyć:

(i) Przeprowadzenie udanej syntezy nanocząstek NaYF_4 domieszkowanych różnymi koncentracjami atomów Yb i Er oraz funkcjonalizowanych dla uzyskania własności hydrofilowych poprzez dołączenie molekuł poliwiniloprolidonu (PVP), prowadząc tym samym do otrzymania systemu $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}/\text{PVP}$.

Domieszkowane atomami Yb i Er nanocząsteczki NaYF_4 zsyntetyzowano za pomocą kilku-etapowej syntezy hydrotermalnej. Najpierw dokonano rozkładu tlenków metali ziem rzadkich, tj. Y_2O_3 oraz Er_2O_3 , w 10% HNO_3 w celu uzyskania odpowiednich azotanów. W następnych dwóch etapach azotany te były mieszane z PVP i kolejno z NH_4F , zgodnie z recepturą zaproponowaną przez Li i Zhang [Z. Li and Y. Zhang, *Angew. Chem.* **118** 7896–9, (2006)].

Uzyskane nanocząsteczki NaYF_4 dla całego przebadanego zakresu domieszkowania jonami Yb i Er miały czystą krystaliczną fazę kubiczną (tzw.

faza α) i średnice ~25-35 nm. Zarejestrowane widma luminescencji przy wzbudzeniu $\lambda_{ex}=980$ nm (upconversion luminescence, UCL) potwierdziły obecność kubicznej fazy α . W szczególności, zaobserwowano charakterystyczna dla kubicznej fazy α przewagę intensywności luminescencji w pasmie 650 nm (pasmo czerwonej luminescencji) nad luminescencją w pasmach 525 – 545 nm (pasma zielonej luminescencji). Najwyższa luminescencja UCL zaobserwowano dla koncentracji atomów domieszek Er i Yb wynoszących odpowiednio 2% i 30%, co dobrze odpowiada wynikom licznych wcześniejszych doniesień literaturowych.

(ii) Przeprowadzenie udanej próby wprowadzenia nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er/PVP}$ do komórek HeLa.

W szczególności, badania za pomocą mikroskopu konfokalnego (pobudzenie długością fali 980 nm lasera femtosekundowego) wykazały bardzo dobry kontrast obrazów komórek inkubowanych przez 24 godziny z materiałem $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er/PVP}$ w obecności Lipofectamine 2000. Dodatkowo, obrazowanie za pomocą mikroskopu konfokalnego pozwoliło na obserwację translokacji nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er/PVP}$ w komórkach i ich wczesną lokalizację w pobliżu jąder komórkowych.

Wyniki te potwierdzają trwałość uzyskanych nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er/PVP}$ i ich wysoka przydatność dla celów obrazowania komórek oraz śledzenia procesów wewnątrzkomórkowych. Są one kolejnym dużym osiągnięciem tej pracy.

Rezultaty powyższych badań zostały opublikowane w artykule: Bożena Sikora *et al.*, "Transport of $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$, Yb^{3+} up-converting nanoparticles into HeLa cells", *Nanotechnology* **24** No. 235702, pp. 1-11 (2013).

Do chwili obecnej, praca ta była cytowana jednokrotnie.

(ii) Wkroczenie udanej syntezy wielofunkcyjnych optycznie i magnetycznie czynnych nanocząstek NaYF_4 domieszkowanych Yb, Er i Gd oraz funkcjonalizowanych powierzchniowo PVP.

W tej części pracy pojęto się ambitnego zadania syntezy luminescencyjnych nanocząstek NaYF_4 domieszkowanych dodatkowo atomami Gd. Jak pokazano to we wcześniejszych doniesieniach literaturowych, domieszkowanie paramagnetycznymi jonami Gd^{3+} (spin elektronowy $\mathbf{S} = 7/2$) nadaje nanocząsteczkom fosforu NaYF_4 silne właściwości paramagnetyczne. Właściwości te mogą być wykorzystane w polepszeniu kontrastu obrazowania za pomocą rezonansu jądrowego (magnetic resonance imaging MRI) dzięki 'paramagnetycznemu' skróceniu czasów relaksacji protonów (T_1) w obrazowanych tkankach (ang.: T_1 -weighted paramagnetic enhancement). Sądzi się, że nanocząsteczki o silnych właściwościach paramagnetycznych, jak $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Gd}$ lub superparamagnetycznych (np. nanocząsteczkowe tlenki żelaza Fe_2O_3 lub Fe_3O_4) mogą okazać się bardziej wydajnymi czynnikami

poprawy kontrastu w MRI niż obecnie stosowane związki organiczne (chelaty) zawierające jony Gd^{3+} .

Silne paramagnetyczne właściwości nanocząstek mogą być także wykorzystane w hipertermii oraz do selektywnego dostarczania leków do tkanek za pomocą gradientu pola magnetycznego.

Domieszkowanie atomami Gd prowadzi więc do otrzymania wielofunkcyjnych optycznie i magnetycznie czynnych nanocząstek opartych na fosforach typu $NaYF_4$. Dodatkowo, jak to również wykazano we wcześniejszych doniesieniach literaturowych, wprowadzenie domieszki Gd pozwala na łatwiejsze uzyskiwanie wysoce luminescencyjnej heksagonalnej fazy β w małych nanokryształach $NaYF_4$.

Z powyższych względów należy uznać więc za słuszną podjętą w tej pracy strategię domieszkowania atomami Gd nanocząstek $NaYF_4$.

Na drodze syntezy zastosowanej w ramach tej pracy nie udało się jednak uzyskać wysoko-wydajnej luminescencyjnie heksagonalnej fazy β w małych rozmiarowo nanokryształach $NaYF_4$ domieszkowanych Gd. Dlatego podjęto próby poprawy właściwości luminescencyjnych nanocząstek $NaYF_4:Yb,Er,Gd$ za pomocą wyzarzania w wiązce światła laserowego.

W szczególności, nanocząsteczki $NaYF_4:Yb,Er,Gd$ poddano wyzarzaniu w wiązce światła laserowego z zakresu bliskiej podczerwieni ($\lambda=980$ nm, gęstość mocy 37 W/cm²). Dla materiału wyzarzonego zauważono bardzo wyraźny wzrost (2-3 rzędy wielkości) luminescencji w pasmach 524-545 nm oraz 655 nm przy pobudzeniu długością fali $\lambda_{ex}=980$ nm (upconversion luminescence, UCL). Ponadto, zaobserwowano także pojawienie się luminescencji UCL w zakresie UV (pasma 256 nm, 307 nm, 313 nm oraz 319 nm). Pojawienie się luminescencji UCL w pasmach UV wytłumaczono za pomocą modelu zaproponowanego przez Zheng'a i współpracowników [K. Zheng *et al.*, *Journal of Alloys and Compounds* 509, No.19, p. 5848-5852 (2011)]. Model ten wskazuje na transfer energii z wzbudzonych atomów erbu do wysoko-energetycznych stanów elektronowych atomów gadolinu. Dodatkowo zauważono, że intensywność UCL w pasmach UV zależy w pewnym stopniu od koncentracji domieszki Gd.

Bardzo wyraźny wzrost ogólnej luminescencji UCL w pasmach 524-545 nm oraz 655 nm pod wpływem wyzarzania w wiązce światła laserowego powiązано ze wzrostem nanokryształów oraz ich częściową rekryształizacją (przeprowadzone badania XRD wykazały pojawienie się nieznacznej zawartości heksagonalnej fazy β).

Należy tu podkreślić, że luminescencja UCL w pasmach UV nie była, jak dotąd, obserwowana dla materiałów $NaYF_4:Yb,Er,Gd$ o rozmiarach nanoskopowych (np. w wyżej wspomianej pracy K. Zheng *et al.* 2011 badano kryształy o wymiarach kilku mikrometrów). Dlatego też, wyniki uzyskane w tej części rozprawy należy uznać za niezwykle ważne i interesujące.

Jesli chodzi o procedure wyzarzania w wiazce swiatla laserowego materialow nanoskopowych NaYF₄:Yb,Er, to byla ona juz opisywana w literaturze jako srodek modyfikacji lub poprawienia luminescencji UCL [np.: A. Bednarkiewicz *et al.*, 'Giant enhancement of upconversion in ultra-small Er³⁺/Yb³⁺:NaYF₄ nanoparticles via laser annealing', *Nanotechnology* **23**, 145705, pp. 1-8 (2012)]. Ten artykul, oraz najwazniejsze prace poprzedzajace, powinny byc cytowane w niniejszej rozprawie.

(iii) Zbadanie wlasciwosci magnetycznych nanocząsteczek NaYF₄:Yb,Er,Gd i wykazanie ich silnego paramagnetyzmu.

Za pomoca magnetometru typu SQUID zmierzono podatnosc nanocząsteczek NaYF₄:Yb,Er,Gd w funkcji temperatury dla roznych poziomow domieszkowania atomami Gd. Wyniki pomiarow wkonanych w temperaturach kriogenicznych oraz w temperaturze pokojowej wskazuja, ze az do poziomu domieszkowania ~50%, podatnosc magnetyczna rosnie prawie liniowo z koncentracja atomow Gd. Wyniki te sugeruja obecnose i magnetyczna aktywnosc jonow wysoko-spinowego Gd³⁺ (**S=7/2**) w otrzymanych nanocząsteczkach NaYF₄:Yb,Er,Gd.

Silny paramagnetyzm nanocząsteczek NaYF₄:Yb,Er,Gd podkresla ich przydatnosc dla polepszenia kontrastu w obrazowaniu MRI oraz dla selektywnego dostarczania czynnikow terapeutycznych do wybranych tkanek za pomoca gradientu pola magnetycznego.

Opisane w tej czesci pracy wyniki potwierdzaja zatem udana probe syntezy wielofunkcyjnych optycznie i magnetycznie czynnych nanocząsteczek NaYF₄ przydatnych dla przyszlych zastosowan biomedycznych.

3. Drobne usterki zauwazone w trakcie recenzji

Rozprawa doktorska jest przejrzyste zredagowna, a jakosc wiekszosci wykresow, zdjec oraz obrazow mikroskopowych jest zadawalajaca.

Lista nielicznych zauwazonych drobnych usterek zamieszczona jest ponizej:

Strona 14: brak definicji wszystkich symboli w Hamiltonianie oddziaływania układu elektron- dziura (rownanie 1).

Strona 22: brak konsekwencji w cytowaniu [25] w podpisie rysunku 6 przedstawiajacego zaleznosc lepkości i stałej dielektrycznej od temperatury – w tekście cytowane sa pozycje [16, 23].

Strona 43: brak miana (nm) w wyniku obliczenia grubosci warstwy MgO.

Strona 47: brak konsekwencji: rysunek 26B wskazuje na duże zmiany (~5 x) luminescencji nanocząstek ZnO@MgO przechowywanych w etanolu. W tekście poniżej rysunku mowa jest o 'małych zmianach'.

Strona 48: brak referencji w podpisie rysunku 28.

Strona 50: piąty wiersz od góry strony – błędne odniesienie do rysunku 28.

Strona 54: dziesiąty wiersz od dołu strony – błąd w słowie 'singletowe'.

Strona 115: tytuł rozdziału 5.4. Powinien on raczej brzmieć: 'Zastosowanie wielofunkcyjnych (w domyśle: aktywnych magnetycznie) materiałów up-konwertujących w biologii i medycynie'. W tekście poniżej tytułu, w pierwszym rzędzie, wymieniona jest metoda MRI, która w bezpośredni sposób nie wykorzystuje właściwości 'up-konwertujących'.

Strony 156 i 157: wydrukowane podwójnie w recenzowanym egzemplarzu rozprawy.

4. Podsumowanie

Rozprawa Mgr Bożeny Sikory opisuje procesy technologiczne wytwarzania i charakteryzacji nanocząstekowych biosensorów opartych na tlenku cynku (ZnO) i na domieszkowanym atomami pierwiastków grupy lantanowców (Yb, Er, Gd) materiale NaYF₄. Materiały te zostały zaprojektowane i wykonane pod kątem ich przyszłych zastosowań biomedycznych.

Zbadane właściwości fizykochemiczne otrzymanych materiałów w pełni potwierdzają ich zalety i przydatność do zastosowań w kategorii nanobiosensorów w biologii i oraz w roli nowoczesnych submikronowych czynników terapeutycznych w medycynie (tzw. 'nano leki').

Do najważniejszych osiągnięć tej pracy należy zaliczyć:

(i) Synteze luminescencyjnych nanocząstek ZnO@MgO oraz bardzo szczegółowa dyskusja ich właściwości fotofizycznych w funkcji parametrów procesów technologicznych.

(ii) Synteze hydrofilowych nanocząstek ZnO@MgO@CMCD oraz udana próba wprowadzenia ich do komórek HeLa - bezpośrednia obserwacja luminescencji nanocząstek ZnO w komórkach *ex vivo*.

(iii) Wytworzenie funkcjonalizowanych nanocząstek 'ZnO@MgO@CMCU-Nile red' i udana próba obserwacji procesów FRET dla układów 'ZnO@MgO@CMCD-Nile red' w komórkach HeLa *ex vivo* – potwierdzenie tym samym udanej konstrukcji uniwersalnych nanobiosensorów, czułych na zmiany parametrów chemicznych cytosolu.

(iv) Wytworzenie aktywnych luminescencyjnie przy oświetleniu światłem bliskiej podczerwieni (*ang.* upconversion luminescence, UCL) nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ powlekanych PVP ($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}/\text{PVP}$) i potwierdzenie ich wysokiej trwałości w środowisku wodnym i komórkowym; wykazanie przydatności nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}/\text{PVP}$ dla celów obrazowania komórek oraz śledzenia procesów wewnątrzkomórkowych.

(v) Wytworzenie aktywnych luminescencyjnie nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Gd}$ oraz wykazanie ich luminescencji UCL w pasmach UV; ta obserwacja została dokonana przez Autorke rozprawy poraz pierwszy dla nanocząstkowych materiałów $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Gd}$.

(vi) Uzyskanie wielofunkcyjnych optycznie i magnetycznie czynnych nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Gd}$ powlekanych PVP, $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Gd}/\text{PVP}$, przydatnych dla przyszłych zastosowań w biomedycynie. W szczególności układy te mogą być wykorzystane we wczesnej detekcji zmian nowotworowych (*ang.* photodynamic diagnosis, PDD) oraz terapii fotodynamicznej (*ang.* photodynamic therapy, PDT). Aktywność optyczna tych nanocząstek przy oświetleniu światłem bliskiej podczerwieni pozwoli na przeprowadzanie zabiegów PDD i PDT w głęboko położonych tkankach.

(vii) Opracowanie wydajnej procedury wprowadzania nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}/\text{PVP}$ do komórek w obecności Lipofectamine 2000.

(viii) Opracowanie technologii pokrywania nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ cienką warstwą SiO_2 za pomocą metody Stöber (TEOS) uzyskując tym samym poprawę ich fotostabilności, biokompatybilności i umożliwiając łatwiejszą funkcjonalizację powierzchni.

Bardzo ważnym atutem tej rozprawy, podkreślającym niezwykle aktualny kierunek przeprowadzonych badań, są trzy opublikowane artykuły, w których przedstawione zostały najważniejsze wyniki naukowe. Mgr Bożena Sikora jest pierwszą autorką tych artykułów.

Niezależnie od wspomnianych wyżej trzech publikacji, Mgr Bożena Sikora jest także współautorką trzech innych, zbliżonych tematycznie artykułów, z których dwa zostały już opublikowane, a trzeci został wysłany do druku.

Mgr Bożena Sikora jest także współautorką zgłoszenia patentowego, którego przedmiot jest bezpośrednio związany z problemami technologii nanomateriałów opisanych w tej rozprawie.

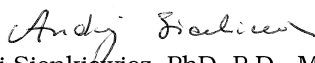
Z rozprawy doktorskiej Mgr Bożeny Sikory związanych jest też dwanaście referatów/prezentacji ustnych, których Mgr Bożena Sikora jest pierwszą autorką lub współautorką. Jeden z tych referatów został wygłoszony na ostatniej międzynarodowej konferencji E-MRS 2013 Fall Meeting (16-20 września 2013, Warszawa).

Mgr Bożena Sikora jest także współautorką imponującej listy czterdziestu jeden doniesień konferencyjnych.

W ogólnym podsumowaniu należy więc stwierdzić, że ze względu na niezwykle wysoką jakość wyników naukowych przedstawionych w tej rozprawie spełnia ona wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres podjętych badań, ich interdyscyplinarność i aktualność - potwierdzoną trzema publikacjami w renomowanych czasopiśmie, a także głębokie zrozumienie dyskutowanych problemów, wnioskuję o uznanie tej rozprawy za wyróżniającą.

EPFL, 10 lutego 2014



Andrzej Sienkiewicz, PhD, P.D., MER

Laboratory of Nanostructured and Complex Matter Physics (LPMC)
Institute of Condensed Matter Physics (ICMP)
Faculty of Basic Sciences (FSB)
PH building,
Room: PH-L1-491
Station 3
Ecole Polytechnique Fédérale (EPFL)
CH - 1015 LAUSANNE
Switzerland

Phone: (+41-21) 693-43-37
FAX : (+41-21) 693-44-70
E-mail: andrzej.sienkiewicz@epfl.ch