

Prof. Tomasz Lipniacki,
Pracownia Modelowania w Biologii i Medycynie
Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN

Warszawa, 14 stycznia 2014

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Zaprojektowanie i scharakteryzowanie biosensorów opartych na koloidalnych nanocząstkach do zastosowań w biologii i medycynie

wykonanej przez **mgr Bożenę Sikorę**

pod kierunkiem prof. Danka Elbauma (promotor) i dr Krzysztofa Fronca (promotor pomocniczy)

Charakterystyka pracy

Celem badań opisanych w pracy doktorskiej była konstrukcja i analiza biozgodnych (nietoksycznych) materiałów opartych na fluorescencyjnych nanocząstkach, które będą mogły mieć zastosowanie jako biosensory lub cząstki uśmiercające komórki nowotworowe przez emisję promieniowania ultrafioletowego. **Cel ten realizowany jest w logicznym szeregu prac polegających na tworzeniu i badaniu coraz bardziej zaawansowanych konstruktywów przybliżających Autorkę do finalnych „produktów”, nanocząstek ZnO/MgO/CMCD/Czerwień Nilowa (rozdział 4) oraz NaYF₄ domieszkowanej jonami trzech lantanowców, erbem Er³⁺, iterbem Yb³⁺ i gadolinem Gd³⁺ i pokrytej PVP (poliwinylpirolidonem), a następnie SiO₂ (rozdział 5).** Praca ma charakter doświadczalny.

Od strony formalnej praca liczy 195 stron, składa się z 7 rozdziałów i zawiera ponad 100 rysunków w większości prezentujących wyniki doświadczalne. Wyniki Autorki przedstawione są w rozdziałach 2, 3, 4 i 5. Pierwszy krótki rozdział ma na celu uświadomienie czytelnikowi problemu diagnostyki i terapii chorób nowotworowych, ostatni rozdział jest spisem publikacji i wystąpień konferencyjnych, rozdział szósty zaś jest bardzo pomocnym przeglądem metod eksperymentalnych stosowanych przez Autorkę i zespół.

W rozdziale 2 Autorka opisuje metodę otrzymywania nanocząstek tlenku cynku ZnO metodą sol-zel w roztworach koloidalnych oraz analizę nie w pełni zrozumianego zjawiska zielonej luminescencji (szeroka linia ok. 535nm). Otrzymywane nanocząstki mają rozmiar ok. 4nm (o dość szerokim rozkładzie wyznaczonym na podstawie obrazowania transmisyjnym mikroskopem elektronowym. Analizując zjawisko zielonej fluorescencji (nieodpowiadającej żadnej linii atomowej) Autorka pokazuje, że pik widma (jak i pik fali pobudzenia) przesuwa się w stronę większych długości fali wraz ze wzrostem temperatury, jak i rozmiarów nanocząstek.

Na długości fali emisji stosunkowo duży wpływ ma sposób ich powstawania; długość fali emisji jest większa dla nanocząstek powstających w obecności wody niż wodorotlenku sodu NaOH. Autorka konkluduje serię eksperymentów prowadzącą do omówionych wyników stwierdzeniem, że doświadczenia potwierdziły, iż zielona luminescencja pochodzi z rekombinacji elektronów z pasma przewodnictwa z dziurami z głębokich stanów pułapkowych. W pracy nie jest jednak przedstawione rozumowanie prowadzące do tej konkluzji. Przeprowadzone eksperymenty sugerują moim zdaniem jedynie, że istotną rolę mogą odgrywać efekty powierzchniowe.

W rozdziale 3 Autorka pokazuje, że pokrycie nanocząstek tlenku cynku tlenkiem magnezu zapobiega ich agregacji i następnie charakteryzuje powstałe nanocząstki. Stworzone nanocząstki ZnO/MgO mają średnice jądra ZnO rzędu 7nm, a grubość powłoki MgO wynosi ok. 1nm.

Najważniejsze wyniki pracy zawarte są w rozdziałach 4 i 5. W rozdziale 4 Autorka opisuje metodę tworzenia biosensorów opartą na rezonansowym transferze energii (FRET). Funkcję donora pełnią nanocząstki ZnO/MgO, a funkcję akceptora barwnik organiczny, Czerwień Nilu ulokowana pomiędzy nanocząstką ZnO/MgO a pokrywą karboksymetylo- β -cyklodestryną (CMCD). Tak powstały konstrukt wykazuje niewielkie przesunięcie termochromowe, rzędu $5.7 \pm 1.5 \text{ cm}^{-1}/\text{K}$, a zatem zdaniem Autorki może być wykorzystany jako wskaźnik temperatury. Nie bardzo rozumiem ten pomysł, patrząc na rysunek 39, łatwo zauważyć, że intensywność luminescencji jest znacznie czulszym wskaźnikiem temperatury niż położenie pików. Jednakże oba wskaźniki nie wydają się być wystarczająco dobrze odwracalne przy okresowych zmianach temperatury [rysunki 41-45] by mogły stanowić efektywny bezwzględny termometr.

W dalszej części rozdziału Autorka pokazuje, że nanocząstki ZnO/MgO/CMCD/Czerwień Nilowa można wprowadzić do komórek HeLa. Okazuje się, że widma emisji (Czerwień Nilowa) wewnątrz i na zewnątrz komórek HeLa są różne, przy czym różnica ta jest szczególnie wyraźna (ok. 25nm) przy jednofotonowym pobudzeniu (długość fali pobudzenia 355 nm) FRET (rysunek 54C). W przypadku pobudzenia dwufotonowego (linia 705nm) różnica ta jest mniejsza (ok. 15nm), a ponadto pobudzenie dwufotonowe wymaga niemal 500 razy większej mocy lasera. **Jest to bardzo ciekawy wynik! Pokazuje on wrażliwość długości fali emisji nanocząstek ZnO/MgO/CMCD/Czerwień Nilowa na środowisko.** Niemniej konkluzja Autorki: *stworzyliśmy biosensor, który pozwoli badać zmiany środowiska spowodowane procesami chorobotwórczymi pojedynczych komórek* jest nieco na wyrost. W tym celu należałoby pokazać istotną zmianę profilu emisji w zdrowej i rakowej linii komórkowej pochodzącej z tej samej tkanki. Intuicja podpowiada mi, że zmiany widma w tym przypadku byłyby znacznie mniejsze, trudne do detekcji.

W Rozdziale 5 opisane są właściwości i metody uzyskiwania najbardziej złożonych nanocząstek NaYF₄ domieszkowanych jonami trzech lantanowców erbem Er³⁺, iterbem Yb³⁺ i gadolinem Gd³⁺ i pokrytych PVP (poliwinylpirolidonem), a następnie SiO₂. Uzyskane nanocząstki dzięki domieszkowaniu 3 lantanowcami wykazują zdolność wielofotonowej konwersji podczerwieni (linia 980nm) zarówno do światła widzialnego, (czerwień ok. 680nm, i zieleń ok. 530nm, fiolet ok 410nm) jak i do ultrafioletu (UV-B, 3 zlewające się linie ok 300-320nm). Emisja światła widzialnego umożliwia lokalizację cząstek i może być przydatna i w diagnostyce. Emisja ultrafioletu może (zdaniem Autorki) pozwolić na uśmiercanie komórek nowotworowych. Obawiam się, że konkluzja ta jest nieco na wyrost, pobudzenie wielofotonowe (przejście od linii 980nm do 300-320nm wymaga przynajmniej pobudzenia cztero-fotonowego) w przypadku nanocząstek jest wyjątkowo nieefektywną metodą transferu energii. Wydajność mechanizmu maleje drastycznie wraz z ilością fotonów potrzebnych do przejścia do danego stanu. Widać to wyraźnie na wykresie zamieszczonym na Rys. 101, przy pobudzeniu 980nm intensywność linii czerwonych (ok. 650nm) wymagająca tylko dwufotonowego pobudzenia, jest 50 razy większa niż intensywność linii UV-B, do której otrzymania potrzeba wielofotonowego pobudzenia.

Aby uzyskać obserwowalną emisję w zakresie UV-B Autorka zastosowała bardzo duże natężenie wiązki laserowej ($37\text{W}/\text{cm}^2$), wydaje mi się, że taka intensywność promieniowania po prostu ugotowałaby komórki, chyba, że zastosowany byłby laser o bardzo krótkich pulsach. Jednym ze źródeł problemu, jak słusznie pisze Autorka jest stosowanie nanocząstek – wydajność konwersji linii w mikrokryształach NaYF₄ domieszkowanych Er³⁺, Yb³⁺ i Gd³⁺ jest znacznie większa.

Domieszkowanie gadolinem nadaje nanocząstkom własności paramagnetyczne, dzięki czemu mogą być wykorzystane jako czynnik zwiększający kontrast przy obrazowaniu w rezonansie magnetycznym (większość substancji zwiększających kontrast w obrazowaniu magnetycznym wykorzystuje gadolin). Własności paramagnetyczne mogą również posłużyć do kierowania nanocząstek w niejednorodnym polu magnetycznym. Z kolei pokrycie nanocząstek SiO_2 umożliwia dołączanie (nie badane już w pracy) molekuł biologicznie aktywnych – np. przeciwciał potencjalnie rozpoznających komórki określonego typu.

Opinia o pracy

Praca jest wyjątkowo czytelna i napisana starannym językiem. Przeprowadzone doświadczenia są dobrze opisane. W oparciu o tekst daje się odtworzyć rozumowanie Autorki. Bardzo imponująca jest lista eksperymentów i technik eksperymentalnych (opisanych w rozdziale 6) wykorzystanych do uzyskania wyników zaprezentowanych w pracy. Rozumiem, że przynajmniej część badań została przeprowadzona we współpracy z współautorami opublikowanych prac (prace te są wieloautorские), ale i tak zaprezentowana różnorodność technik eksperymentalnych budzi duże uznanie.

Niektóre rozdziały pracy korespondują z opublikowanymi wcześniej przez Autorkę pracami (np. najważniejszy rozdział 5 zawiera materiał z publikacji w *Nanotechnology* (B. Sikora *et al.* 2013), ale **rozprawa nie jest tłumaczeniem opublikowanych prac, a materiał w niej zawarty istotnie wykracza poza wcześniejsze publikacje Autorki**. Ponadto, dwie publikacje Autorki dotyczące nanowłókien (jedna opublikowana w *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, druga posłana do publikacji) zupełnie nie są ujęte w doktoracie i stanowią dodatkowy dorobek.

Wydaje mi się, że konkluzje zamieszczone w pracy w podsumowaniach rozdziałów 2, 4 i 5 są trochę na wyrost. Świadczy to o cennym optymizmie i jest przywilejem młodości, ale prawdopodobnie sformułowania te nie przeszłyby przez rygor recenzji w dobrym czasopiśmie naukowym, gdzie konkluzje muszą być umotywowane wynikami badań. Np. aby uprawdopodobnić możliwość uśmiercania komórek poprzez emisję promieniowania UV-B pochodzącego z konwersji podczerwieni należałoby zrobić chociaż eksperyment *in vitro* na linii komórkowej i pokazać, że promieniowanie podczerwone uśmierca linię komórek zawierającą nanocząstki, a nie uśmierca (przy tej samej dawce promieniowania) linię niezawierającą up-konwertujących nanocząstek.

Nie byłem oczywiście w stanie sprawdzić poprawności wszystkich wzorów występujących w pracy. Wrywkowa kontrola wzorów z 2 rozdziału pokazuje trochę uchybień, ale nie wydają się być one istotne dla całości wyводу. Na przykład weźmy równanie (3). Jeżeli $\epsilon=3.7\epsilon_0$, gdzie ϵ_0 to stała dielektryczna próżni, to w równaniu (3) powinno być ϵ zamiast ϵ_0 , analogicznie nie powinny występować iloczyny $m_e \cdot m_0$ oraz $m_h \cdot m_0$. Ponadto Autorka podając wzór 3, cytuje pracę Brus'a [ref. 15], w której wzór ten występuje w innej uproszczonej postaci (bez podania explicite ostatniego członu). Ostatni człon jest zresztą zaniedbany bez komentarza w równaniu (4), które z kolei napisane jest bez troski o jednostki fizyczne. Pod równaniem (3) Autorka podaje wartości ładunku elementarnego i stałej dielektrycznej próżni (z encyklopedyczną dokładnością), ale już nie podaje wartości stałej Plancka. Wydaje się, że m_h^* we wzorze na μ pod równaniem (2) to ta sama masa efektywna dziury co $m_h=0.24m_0$ na dole strony 15 (na stronie 14 masa efektywna jest oznaczana przez m_h^*) jeżeli tak to $\mu \cong m_0/6$, a nie $\mu \cong m_0/2$. Nie sprawdzałem pozostałych rozdziałów pracy pod kątem poprawności wzorów. Należy jednak podkreślić, że praca ma charakter doświadczalny i ewentualne nieścisłości we wzorach nie przekładają się na wyniki doświadczalne.

Reasumując, mimo powyższych drobnych uwag **pracę doktorską oceniam bardzo wysoko**. Pani Bożena Sikora jest współautorką 5 prac (w tym pierwszą autorką w 3 pracach), które zostały opublikowane w czasopismach z IF w przedziale od 1.6 (*Journal of Sol-Gel Science and Technology*) do 3.8 (*Nanotechnology*). Ponadto doktorantka jest współautorką jednego zgłoszenia patentowego.

W oparciu o treść pracy, sposób prezentacji wyników przez Autorkę na seminarium w IPPT PAN w styczniu 2014 oraz dorobek naukowy doktorantki, z pełnym przekonaniem wnoszę o dopuszczenie rozprawy doktorskiej do publicznej obrony, jak i o jej wyróżnienie.

T. Lipiński